

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Farmacologia, de Toxicologia y de Terapèutica
U.A.B.

**PREVENCIÓN DE LA ARTERIOESCLEROSIS:
EFECTOS CELULARES Y MOLECULARES DE
INTERVENCIONES DIETÉTICAS Y
FARMACOLÓGICAS.**

Laura Casaní Arazo

CSIC-ICCC-Hospital de la Santa Creu i Sant Pau-UAB Barcelona

Barcelona, marzo de 2006

La Prof. Lina Badimon, Profesora de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Prof. Elisabeth Vila, catedrática de Farmacología de la Universitat Autònoma de Barcelona, como directora y tutora respectivamente,

CERTIFICAN: que la tesis doctoral que presenta Laura Casaní Arazo con el título: "PREVENCIÓN DE LA ARTERIOESCLEROSIS: EFECTOS CELULARES Y MOLECULARES DE INTERVENCIONES DIETÉTICAS Y FARMACOLÓGICAS" reúne las condiciones para ser leída y defendida delante del tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor.

Prof. Lina Badimon

Prof. Elisabet Vila

Laura Casaní

Barcelona, marzo de 2006.

A mons pares i a ma germana

A Roger i a la Keta

A les meues amigues

*A totes les persones que han sofert alguna malaltia cardiovascular
o encara pateixen les conseqüències.*

Gràcies a totes les persones que han estat al meu costat i m'han ajudat, siga directa o indirectament, a poder presentar la tesi.

Gràcies.

*"Buscad la belleza,
es la única protesta
que merece la pena
en este asqueroso mundo"*
Ramon Trecet.

*"The gods are just, and of our pleasant vices
make instruments to plague us"*
King Lear, William Shakespeare (1564-1616)

ÍNDICE

• LISTADO DE ABREVIACIONES	15
• DEFINICIONES	19
• PRESENTACIÓN	23
• INTRODUCCIÓN	27
• ANTECEDENTES	29
. FACTORES DE RIESGO EN LAS ENFERMEDADES	
CARDIOVASCULARES	31
. LA ENFERMEDAD ATERTROMBÓTICA	35
-FISIOPATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD ATERTROMBÓTICA	37
-El endotelio	37
-El endotelio disfuncional	39
-Formación de la estría grasa	40
-Progresión de la lesión	42
-Remodelación excéntrica	45
-Neovascularización por vasa vasorum	45
-Tipos de lesión	46
-Fases de la aterotrombosis	47
-Vulnerabilidad de la placa aterosclerótica	49
-Tamaño y consistencia del núcleo ateromatoso	50
-Estructura y dureza de la cápsula fibrosa	50
-Proceso de inflamación de la capsula fibrosa	51
-Fatiga	52
-COMPLICACIONES TROMBÓTICAS	53
-Sustrato vascular local	53
-Reología y trombosis	54
-Sangre vulnerable	55
. TROMBOSIS ARTERIAL	57
-FORMACIÓN DEL TROMBO: ADHESION, ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN ...	57
- La adhesión y activación plaquetaria	58
- Las proteínas Rho	61

- Agregación plaquetaria	62
-COAGULACIÓN	63
-FIBRINOLISIS	64
• MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ATEROTROMBOSIS	65
• APROXIMACIONES PREVENTIVAS DE LAS ENFERMEDADES	
CARDIOVASCULARES	66
-ESTRATEGIAS DE POBLACIÓN	67
-ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN	68
- Importancia de la nutrición en la prevención cardiovascular	69
- Efectos de las estatinas en la prevención cardiovascular	73
• HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
• MÉTODOS	81
-INDUCCIÓN DE HIPERCOLESTEROLEMIA	83
-EVALUACIÓN DEL RIESGO TROMBÓTICO	84
-ARTÍCULO 1: " Moderate Daily Intake Of Red Wine Inhibits Mural Thrombosis And Monocyte Tissue Factor Expression In An Experimental Porcine Model ". Circulation, 2004; FI=11.164	89
-ANEXO I	97
-ARTÍCULO 2: " Pravastatin Reduces Thrombogenicity By Mechanisms Beyond Plasma Cholesterol Lowering ". <i>Thrombosis & Haemostasis</i> , 2005; FI=4.95	105
• RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
• CONCLUSIONES	129
• REFERENCIAS	133
• ANEXO II. Otras publicaciones	159
• ANEXO III. Publicaciones pendientes	187

ABREVIACIONES

ADP	Adenosina difosfato.
ALT	Alanina aminotransferasa.
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico.
aPTT	Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada
AST	Aspartato aminotransferasa.
ATP	Adenosina trifosfato.
BUN	Nitrógeno urinario.
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico.
CE	Células endoteliales.
CML	Células musculares lisas.
CREA	Creatinina.
COX-2	Ciclooxigenasa-2.
ECM	Matriz extracelular.
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial.
ET-1	Endotelina-1.
FBG	Fibrinógeno.
FDA	Food and Drug Administration (EUA).
FITC	Fluoresceína (isotiocianato)
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
EC	Enfermedades Coronarias
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio.
GC	Guanilato ciclasa.
GP	Glicoproteína.
GSNO	S-nitrosoglutation.
HGB	Hemoglobina.
HTO	Hematócrito.
ICAM	Molécula de adhesión intercelular.
IL	Interleucinas.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
LEE	Lámina elastica externa.
LEI	Lámina elástica interna.
LOX	Lisil oxidasa.

LRP-1	Low density lipoprotein receptor-related protein.
MCP-1	Factor estimulante de colonias de monocitos.
MCV	Volumen corpuscular medio.
MCH	Volumen corpuscular hematíes.
MEC	Matriz extracelular.
MMP	Metaloproteasas.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
NO	Óxido nítrico.
NF_kβ	Factor nuclear de transcripción.
PAIs	Inhibidores del activador del plasminógeno.
PCI	Intervención Coronaria Percutánea.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PGI₂	Prostaciclina-2.
PT	Tiempo de protrombina.
RBC	Células rojas sanguíneas.
ROK	Rho Kinasa.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
TF	Factor tisular.
TNF-1	Factor de necrosis tumoral -1.
t-PA	Activador tisular del plasminógeno.
TP	Proteína total.
TRITC	Rodamina (tetrarodamina isotiocianato)
TXA₂	Tromboxano A ₂ .
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares.
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial.
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad.
vWf	Factor de von Willebrand.
WBC	Células Blancas.
WOSCOPS	West of Scotland Coronary Prevention Study.

DEFINICIONES

DEFINICIONES

Apoptosis. Muerte celular programada mediada en su mayor parte por una familia de proteínas cisteína intracelulares conocidas como caspasas.

Ateroma con cubierta fibrosa delgada e inflamación (TCFA). Placa inflamada con una cápsula fibrosa delgada cubriendo un núcleo rico en lípidos, un core necrótico. Una TCFA es sospechosa de ser una placa vulnerable/de alto riesgo.

Arteriosclerosis (o arterioesclerosis). Endurecimiento más o menos generalizado de las arterias.

Aterosclerosis (o ateroesclerosis). Enfermedad sistémica caracterizada por la formación y acúmulo de placas ricas en lípidos (ateromas) en las paredes de los vasos sanguíneos, en especial de las grandes arterias. Las manifestaciones clínicas más importantes incluyen el infarto de miocardio, ictus y enfermedad vascular periférica.

Enfermedad Cardiovascular. Complicación clínica de la arteriosclerosis cuyas manifestaciones pueden ser coronarias (síndromes coronarios), cerebrovasculares (ictus) o periféricas.

Enfermedad Coronaria. Condición en la cual las principales arterias que aportan sangre al corazón (coronarias) contienen placas ateroscleróticas y pueden provocar infarto de miocardio o angina pectoris (el flujo de sangre al corazón está reducido y provoca dolor torácico durante el ejercicio). Los síndromes coronarios agudos (SCA) incluyen la angina inestable, el infarto agudo de miocardio con/sin elevación del segmento ST y la muerte súbita.

Estatinas. Fármacos que inhiben un enzima clave en la biosíntesis del colesterol (3hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa) y, entre otros efectos más amplios, reducen los niveles plasmáticos de colesterol LDL.

Estenosis. Estrechamiento de un vaso sanguíneo, habitualmente por el crecimiento de una placa.

Infarto de miocardio. Comúnmente conocido como ataque al corazón, es la muerte parcial de una parte del corazón debido a la repentina pérdida del aporte de sangre. Típicamente, la pérdida de este aporte es causada por un bloqueo completo de una arteria coronaria producida por un trombo coronario.

Lesión activa. Lesión localizada en una arteria coronaria considerada (en base a estudios angiográficos, anatomopatológicos y otros hallazgos) responsable de los

episodios clínicos. En la angina inestable, infarto de miocardio y muerte súbita la lesión activa es normalmente una placa complicada por la trombosis que se extiende al lumen.

Macrófago. Tipo de célula blanca que está especializada en la interiorización de material de deshecho y extraño al organismo mediante fagocitosis.

Paciente de alto riesgo. Paciente con elevado riesgo (vulnerable, susceptible) de sufrir un evento cardiovascular isquémico debido a un índice aterosclerótico elevado, presencia de placas de alto riesgo/vulnerables y/o sangre trombogénica.

Placa. Lesiones dentro de la pared de las grandes arterias que contienen lípidos, lipoproteínas, macrófagos-células espumosas, linfocitos y células musculares lisas. Las lesiones avanzadas pueden estar cubiertas por una cápsula fibrosa que puede romperse o erosionarse, provocando la formación de un trombo superpuesto.

Placa con core calcificado. Una placa muy calcificada con pérdida o disfunción de las células endoteliales que cubren el core calcificado, resulta en la pérdida de la cápsula fibrosa y convierte a la placa de alto riesgo/vulnerable. Es el menos común de los tres tipos de placas vulnerables.

Placa de alto riesgo, vulnerable o susceptible a trombosis. Son términos que se usan como sinónimos y describen una placa con elevado riesgo de trombosis (o retrombosis) y una rápida progresión hacia la estenosis.

Placa erosionada. Una placa con la pérdida o disfunción de las células endoteliales en el lumen provocando así la trombosis. Normalmente no hay ningún defecto adicional o ruptura en la integridad de la placa, que suele ser rica en células musculares y proteoglicanos.

Placa rota. Una placa con un daño severo, con un defecto grave o con ruptura en la cápsula fibrosa exponiendo el núcleo ateromatoso, altamente trombogénico, a la sangre circulante. Es la causa más frecuente de trombosis.

Placa trombosada. Una placa con un trombo superpuesto extendiéndose hacia el lumen vascular. El trombo puede ser oclusivo o no.

Síndrome metabólico. Condición común asociada a un elevado riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular. El diagnóstico requiere tres o más de los siguientes síntomas: obesidad central, presión arterial elevada, bajos niveles plasmáticos de HDL, triglicéridos elevados y/o glucosa elevada en ayunas.

PRESENTACIÓN

PRESENTACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en los países industrializados y en vías de desarrollo y se prevé que ya en la próxima década constituyan la principal causa de mortalidad en el mundo entero por encima de las enfermedades infecciosas, la violencia y el hambre.

El sustrato patológico más importante en la etiología de estas enfermedades es la aterotrombosis, caracterizada por la ruptura de una lesión aterosclerótica y la trombosis superpuesta, potenciados ambos por la presencia de factores de riesgo como la dislipemia, el tabaquismo y la hipertensión.

La aterosclerosis es un proceso difuso que comienza en la niñez y progresa de manera asintomática durante la vida adulta. Es a partir de la tercera o cuarta década de vida cuando puede manifestarse clínicamente a consecuencia de la obstrucción parcial o total de una arteria por un trombo provocado por la rotura o erosión de una placa y traducirse en complicaciones clínicas secundarias a isquemia o necrosis miocárdica.

La enfermedad cardiovascular tiene una etiología multifactorial en la que influye una combinación de diferentes factores de riesgo. Debido a la complejidad y a los numerosos procesos que intervienen en esta patología no existe una terapia única destinada a su tratamiento y/o prevención. Aunque es cierto que la mayoría de los eventos cardiovasculares (De Backer G, 2004) están muy relacionados con el estilo de vida y con factores fisiológicos modificables. Y también que las modificaciones de los factores de riesgo ha demostrado inequívocamente reducir la mortalidad y morbilidad en personas con ECV detectada o no. Es por esta razón que se sugieren una serie de guías o principios generales, con el objetivo de reducir la incidencia de los eventos clínicos, tanto en su primera manifestación o en posteriores eventos recurrentes. Estas guías están esencialmente dirigidas a cambiar los estilos de vida, al manejo de los principales factores de riesgo cardiovascular y al uso de terapias con diferentes fármacos profilácticos que prevengan la aparición clínica de la enfermedad cardiovascular.

La prevención y el tratamiento de la hiperlipemia son uno de los principales objetivos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Esta tesis se centra en las dos principales estrategias de prevención de las enfermedades

cardiovasculares mediante la reducción de las concentraciones séricas de colesterol: la modificación de la dieta, centrándonos en un único componente de la dieta Mediterránea (vino tinto), y el tratamiento con fármacos hipolipemiantes (pravastatina). El trabajo se ha centrado en los mecanismos moleculares de acción de ambas estrategias preventivas en la inhibición del riesgo trombótico en el modelo porcino experimental de hipercolesterolemia inducida con dieta.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Las últimas estadísticas publicadas en 2004 (con datos recogidos en 2002) por la Organización Mundial de la Salud calculan que cada año mueren 16,7 millones de personas en todo el mundo a causa de las enfermedades cardiovasculares. Esto supone más de un tercio de la mortalidad anual mundial. Casi la mitad de las muertes anuales en la unión europea son causadas por enfermedades cardiovasculares (ECV) y de éstas casi la mitad son por enfermedades coronarias (EC) y un cuarto por ictus.

La OMS predice 11,1 millones de muertes por ECV en el año 2020. Estas predicciones señalan que la mortalidad por ECV en todos los países desarrollados se incrementará un 120% en las mujeres y en un 137% en el caso de los hombres. Las predicciones para las dos próximas décadas multiplican por tres la mortalidad existente por ECV e ictus en Latinoamérica, en el medio oriente e incluso en el África Sub-sahariana, un ratio de aumento que excede el de cualquier otra región. Por el contrario en los países más desarrollados (probablemente atribuible al envejecimiento de la población a riesgo) solamente crecerá entre 30 y 60% (Yusuf S, 2001).

Los costes económicos de las enfermedades cardiovasculares son diversos: desde el coste individual y familiar que suponen los cuidados médicos y el tiempo de baja laboral, hasta los costes que suponen para los gobiernos la salud pública y la disminución de la productividad.

Un estatus socio-económico bajo está asociado a un aumento del riesgo a sufrir ECV, ya que la transición económica, urbanización, industrialización y globalización conllevan un cambio en el estilo de vida con la adopción de hábitos propios de países desarrollados como el consumo de tabaco, el estrés, la inactividad física y el cambio a una dieta "insana" con gran contenido en grasas saturadas y azúcares refinados que favorece la enfermedad cardíaca. Podemos afirmar que el desarrollo económico es paralelo a la adquisición de factores de riesgo y a la aparición de las enfermedades cardiovasculares.

La patogenia de la enfermedad coronaria implica dos procesos independientes: la aterosclerosis y la trombosis, que definimos como aterotrombosis, principal causa subyacente de la manifestación clínica de la ECV.

La enfermedad aterotrombótica se caracteriza por el engrosamiento y endurecimiento de la pared de las arterias debido a la acumulación en el espacio subendotelial de material lipídico, tejido fibroso, depósitos de calcio y otros productos sanguíneos. Además de este fenómeno en la pared arterial, también participa el eje inmunidad-inflamación, el factor tisular (FT) y una serie de factores que favorecen la hipercoagulabilidad o vulnerabilidad de la sangre que acaban desencadenando el proceso trombótico. El engrosamiento de la pared arterial comporta una reducción del lumen arterial pudiendo llegar a disminuir el flujo sanguíneo e incluso ocasionar episodios isquémicos distales a la zona del estrechamiento. Dichos episodios isquémicos tienen repercusiones clínicas tan importantes como el infarto cerebral y de miocardio o la claudicación y gangrena de las extremidades inferiores.

FACTORES DE RIESGO EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Alrededor de 300 factores de riesgo han sido asociados con la prevalencia de ECV (The World Health Report 2002). Diferentes factores de riesgo (hiperlipemia, diabetes, tabaquismo, hipertensión, etc.) han sido reconocidos como los principales desencadenantes del desarrollo y progresión de la aterosclerosis (Ross R, 1999). Para ser considerados como factores de riesgo deben reunir tres criterios fundamentales: una elevada prevalencia en diferentes y variadas poblaciones, impacto significativo e independiente en el riesgo de ECV o ictus y que su tratamiento y control resulte en una reducción del riesgo.

Cada vez es más importante la consideración que se les da a los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares en todas las poblaciones. En los países desarrollados, por lo menos un tercio de todas las ECV son atribuibles a cinco factores de riesgo concretos: tabaquismo, alcoholismo, presión arterial elevada, niveles de colesterol elevados y obesidad.

En los países en desarrollo con bajos índices de mortalidad, como China, los riesgos de enfermedad cardiovascular también son tenidos en cuenta. Estas poblaciones deben luchar contra dos situaciones antagónicas, por un lado la desnutrición y las enfermedades transmisibles y por otro lado se enfrentan a los mismos factores de riesgo cardiovascular que los países desarrollados.

Incluso en los países en vías de desarrollo con elevada mortalidad, como los del África sub-sahariana, la presión arterial alta, los niveles elevados de colesterol, el consumo de alcohol y tabaco, además del bajo consumo en verduras y frutas, son los factores de riesgo más importantes.

Algunos de estos factores de riesgo son modificables, es decir, se pueden prevenir, tratar y controlar, por lo cual se han clasificado en factores modificables, no modificables y "nuevos" factores de riesgo cardiovascular.

Principales Factores de Riesgo Modificables. Aproximadamente el 75% de las enfermedades cardiovasculares pueden ser atribuidas a estos factores, también llamados tradicionales.

- **Presión sanguínea elevada;** es el factor más determinante en la aparición del ictus. A mayor presión, mayor riesgo.

- **Lípidos sanguíneos alterados**; niveles plasmáticos elevados de colesterol total, de colesterol LDL y triglicéridos (hipercolesterolemia) o niveles bajos de colesterol HDL.
- **Consumo de Tabaco**; tanto los fumadores antiguos, como los que fuman mucho o los fumadores pasivos tienen incrementado el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.
- **Inactividad Física**; aumenta el riesgo hasta en un 50%.
- **Obesidad**; aumenta también el riesgo a padecer diabetes.
- **Alimentación no saludable**; las dietas bajas en vegetales y frutas son las responsables del 31% y del 11% de las muertes por ECV e ictus. Las dietas ricas en grasas saturadas, mediante sus efectos directos en los lípidos sanguíneos y la trombosis, aumentan también el riesgo. El consumo excesivo de alcohol aumenta el riesgo de fibrilación auricular y puede elevar los niveles de presión arterial y triglicéridos aumentando así el riesgo de problemas cardiovasculares.
- **Diabetes Mellitus**; las complicaciones clínicas de la diabetes incluyen un riesgo elevado de sufrir episodios coronarios agudos trombóticos y peor clínica que pacientes sanos. Las plaquetas de los enfermos presentan hiperreactividad, hiperagregabilidad y adhesividad incrementada. También presentan hipertensión, retinopatía, enfermedades renales y neuropatías que aumentan el riesgo de ECV.

Otros Factores Modificables.

- **Nivel socioeconómico bajo**; tipo de ocupación, nivel educativo, etc., condicionan el acceso a la información y a la medicina con lo que el riesgo a de sufrir ECV aumenta.
- **Enfermedades mentales**; la depresión está relacionada con un aumento del riesgo a sufrir enfermedad coronaria.
- **Estrés psicosocial**; aislamiento social, estrés crónico, ansiedad, depresión, etc. Se ha comprobado que inducen un aumento en la secreción de catecolaminas, implicadas en la aparición de ECV.
- **Determinados medicamentos**; como los contraceptivos orales aumentan el riesgo.
- **Lipoproteína (a)**; especialmente con niveles elevados de cLDL.
- **Distrofia Ventricular Izquierda**; es un potente marcador de muerte cardiaca.

- **Abuso del consumo de alcohol;** una o dos bebidas alcohólicas por día pueden reducir hasta un 30% el riesgo de enfermedad cardíaca, pero un abuso del consumo de alcohol daña el músculo cardíaco.

Factores de Riesgo no Modificables.

- **Edad avanzada;** el riesgo de ictus se dobla cada década a partir de los 55 años.
- **Heredabilidad o historia familiar;** el riesgo aumenta a partir de los 55 años en hombres y 65 en mujeres si han tenido algún pariente directo con ECV
- **Sexo;** aunque la prevalencia de ictus es igual en hombres y mujeres, el riesgo de ECV es mayor en hombres que en mujeres premenopáusicas.
- **Raza o etnia;** se ha observado mayor incidencia de ictus en las poblaciones negras, hispanoamericanas, chinas y japonesas. Los surasiáticos y los afroamericanos sufren más ECV que los blancos.

Nuevos Marcadores de Riesgo.

- **Elevada homocisteína en sangre;** niveles elevados se relacionan con mayor incidencia de ECV
- **Inflamación;** varios marcadores de inflamación (proteína C reactiva elevada, procesos infecciosos) se han asociado con un aumento del riesgo a sufrir ECV.
- **Coagulación sanguínea anormal;** elevados niveles de fibrinógeno y de otros factores de la coagulación se han relacionado con el riesgo de complicaciones cardiovasculares.

Cada vez es más aparente que todos estos factores interactúan entre ellos de una manera compleja. Algunos de los factores modificables que más afectan al estilo de vida conllevan cambios adversos en determinados parámetros bioquímicos y fisiológicos (Tabla 1) que potencian el desarrollo de la aterosclerosis y la complicación trombótica asociada.

La presencia de uno o varios de estos factores de riesgo incrementa la incidencia primaria de enfermedad arteriosclerótica, promueve la manifestación de la enfermedad a una edad temprana y, una vez la patología arteriosclerótica es clínicamente aparente, contribuyen a acelerar su progresión (Fuster V, 1992a).

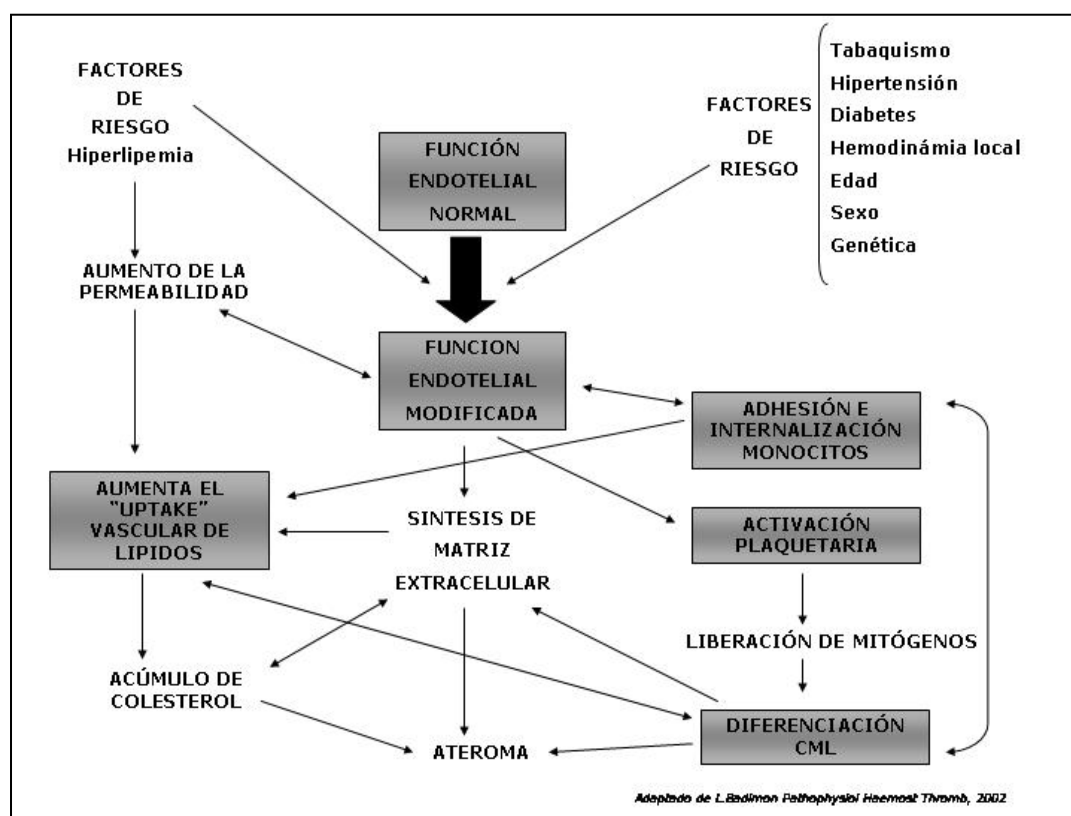
Factor de riesgo	Característica bioquímica o fisiológica	Característica personal
Dieta Tabaquismo Actividad física	Presión arterial Colesterol total (cLDL) ECVL Triglicéridos Glicemia / diabetes Sobrepeso / obesidad Factores trombogénicos Marcadores de inflamación crónica	Edad Sexo Historia familiar ECV prematura Historia personal de ECV Marcadores genéticos

Tabla 1. Estilos de vida y características asociadas con el riesgo a sufrir ECV.

El reducir o evitar los factores de riesgo, incluso en presencia de lesiones arterioscleróticas, puede reducir el riesgo de rotura de la placa. Dejar de fumar, reducir los niveles de colesterol y de presión sanguínea, comer de una manera más saludable y aumentar la actividad física son cambios que aportan beneficios tanto en mujeres como en hombres y a cualquier edad.

LA ENFERMEDAD ATEROTROMBÓTICA

La patogénesis de esta enfermedad multifactorial implica múltiples y complejas interacciones entre disfunciones celulares y mecanismos locales (hemodinámicos) y moleculares sobre los que actúan diversos factores ambientales y sistémicos, considerados como factores de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, hipertensión, etc).



Cuadro 1. Diagrama simplificado del desarrollo de una placa aterosclerótica.

(adaptado de L. Badimon. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002).

Diferentes teorías han intentado explicar el origen y las causas de la progresión de la enfermedad aterotrombótica. Entre todas ellas, las que han tenido mayor aceptación son la hipótesis lipídica y la trombogénica. La teoría trombogénica sugiere que la causa principal del inicio de la lesión sería la acumulación de depósitos de fibrina en la pared arterial que posteriormente serían remodelados por la acción de los fibroblastos (von Rokitansky K, 1852). La hipótesis lipídica se propuso al observar que los conejos alimentados con una dieta

rica en colesterol desarrollaban aterosclerosis (Anitskchow N, 1913) y sugiere que la acumulación de lípidos en las arterias es la causa fundamental de la formación de las lesiones ateroscleróticas. En la actualidad, estas hipótesis deben englobarse en una teoría multifactorial que considera la aterosclerosis como una enfermedad inflamatorio-fibroproliferativa crónica (Badimon JJ, 1993) que se produce como respuesta a la disfunción endotelial inducida por diferentes agentes (Zahman A, 2002). La disfunción endotelial se considera el primer proceso patológico de la enfermedad aterotrombótica.

FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD ATERTROMBÓTICA.

Las lesiones ateroscleróticas se forman mayoritariamente en arterias musculares grandes y medianas (coronarias y poplíteas) y en las arterias elásticas (aorta, carótidas e ilíacas). La estructura de las arterias consta de tres capas concéntricas bien diferenciadas morfológicamente que desde el lumen hacia el exterior son: la íntima, la media y la adventicia. Estas dos últimas están separadas por una malla compacta de elastina, la lámina elástica externa. La adventicia está formada por tejido conectivo y fibroblastos. En ella nos encontramos vasos de pequeño calibre, los "vasa vasorum", que en ocasiones penetran en la media con la función de aportar nutrientes y oxígeno a las capas más internas de la pared arterial (Moreno PR, 2004). La media es la capa de mayor grosor, está formada por células musculares lisas (CML) cuya principal función es mantener el tono muscular de la pared arterial y por ello tienen un citoesqueleto rico en actina y miosina. La media está separada de la íntima por otra malla de elastina, la lámina elástica interna. En la íntima el subendotelio, constituido principalmente por una matriz de proteoglicanos y colágeno, da soporte al endotelio que es una monocapa de células planas endoteliales.

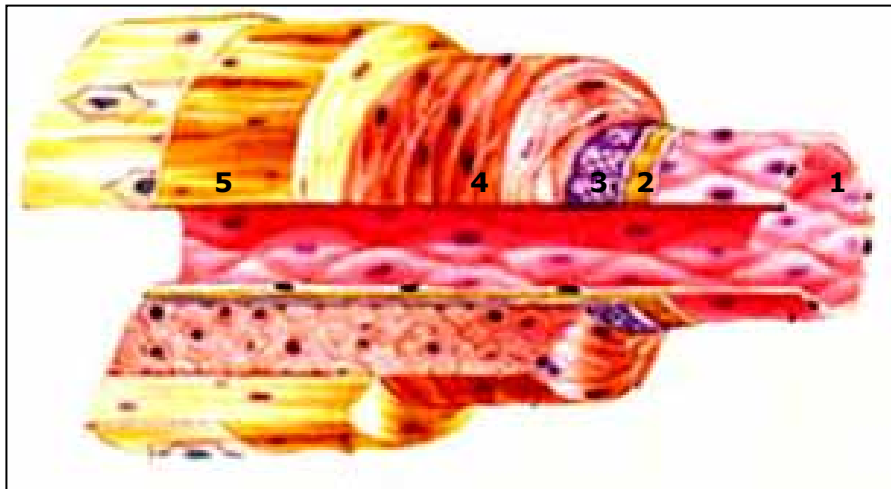


Figura 1. Sección transversal de la pared de una arteria elástica sana. **1-** células endoteliales, **2-** subendotelio, **3-** lamina elástica interna, **4-** células musculares lisas, **5-** adventicia. (Brauer H. MSM-Medical Service. München)

El endotelio

La luz de los vasos de todo nuestro árbol vascular está tapizada por células endoteliales, planas, alineadas en la misma dirección del flujo sanguíneo que separan la pared de la sangre circulante. Las células endoteliales son una barrera semipermeable al transporte de sustancias e intercambio de solutos. En vasos sanos el endotelio se constituye como una barrera anticoagulante ya que, entre otras propiedades, las células endoteliales están cargadas negativamente lo que induce la repulsión de las plaquetas, también con carga negativa, y sintetizan cofactores que inhiben la acción de la trombina y sustancias como PGI₂ y NO, inhibidores de la agregación plaquetaria. El endotelio regula una serie de procesos bioquímicos y moleculares, como la permeabilidad vascular a las lipoproteínas plasmáticas, expresión de proteínas adhesivas, reclutamiento de monócitos, liberación de agentes con actividad pro y anti-trombótica, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas. El NO que sintetizan las CE previene que el monócito sanguíneo penetre en la capa íntima, produciendo, al mismo tiempo, relajación de la célula muscular lisa subyacente y que no haya proliferación de la misma.

El endotelio es el órgano más grande de nuestro cuerpo, ocupando una superficie de más de 150m² y regulando la fluidez intraluminal de la sangre y la vasorreactividad y permeabilidad de la pared. El endotelio responde de una manera

inmediata a los cambios hemodinámicos provocados por la presión de la sangre, por la presión tangencial de la pared arterial y por las fuerzas de cizalladura (*shear rate*) del flujo de la circulación sanguínea. Los cambios en el *shear rate* regulan la expresión de ciertos genes que regulan la función endotelial mediante los elementos SSRE (*shear stress response element*) situados en el gen (Gimbrone MA, 1999). Genes reguladores del tono vascular (sintasa endotelial de óxido nítrico, eNOS, ciclooxigenasa-2, COX-2), factores trombóticos y fibrinolíticos (factor tisular, TF; activador del plasminógeno tisular, t-PA; trombosmodulina), quimiocinas (proteína quimiotáctica para monocitos tipo 1, MCP-1), moléculas de adhesión y protooncogenes (c-fos; c-myc).

Sustancias Liberadas por el Endotelio	
PROTEROGÉNICAS	ANTIATEROGÉNICAS
VASOCONSTRICTORAS Angiotensina II, endotelina, tromboxano, serotonina, trombina, etc.	VASODILATADORAS prostaciclina, histamina, bradicinina, serotonina, sustancia P
ACTIVADORAS de las SMC PDGF, bFGF, endotelina, angiotensina II	INHIBIDORES de las SMC Óxido nítrico, prostaciclina, bradicinina, TGF-β
PROTROMBÓTICAS Tromboxano, trombina, vWF	ANTITROMBÓTICAS Trombosmodulina, TFPI, tPA, pAI-I
PROINFLAMATORIAS VCAM, ICAM, ELAM, selectinas	ANTIINFLAMATORIAS Óxido nítrico

Tabla 2. Mecanismos protectores del endotelio. Mediante un equilibrio entre la síntesis y la liberación de una serie de agentes pro y antiaterogénicos el endotelio es capaz de proteger la integridad del árbol arterial (adaptado de JJBadimon. Clin Invest Arterioscl 2002).

El endotelio funciona como fuente y diana para una serie de moléculas que contribuyen a mantener la homeostasis y la hemostasis vascular mediante la regulación de la vasodilatación arterial, la inflamación y proliferación celular, y la modulación de la trombosis-fibrinólisis (Tabla 2). La disminución en la biodisponibilidad de estas moléculas vasodilatadores antiaterogénicas, principalmente el NO, es lo que caracteriza la disfunción endotelial.

El endotelio disfuncional

La continua presencia de la presión sanguínea, turbulencias en el flujo, el estrés oxidativo y los diferentes factores de riesgo cardiovascular (tabaco, hipercolesterolemia, diabetes, etc.) aceleran la disfunción endotelial alterando la respuesta vasodilatadora mediada por NO y permitiendo la alteración del equilibrio hemostático a favor de los vasoconstrictores proaterogénicos y protrombóticos, como la angiotensina II (A-II).

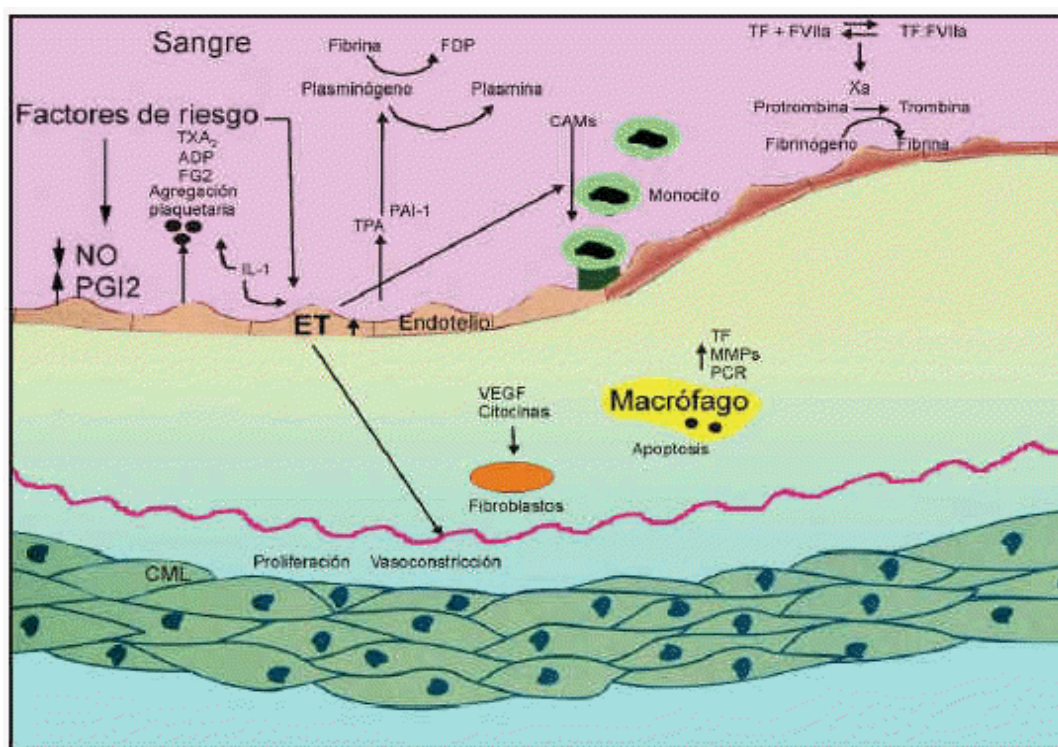


Figura 2. Disfunción endotelial severa. En la disfunción endotelial se produce vasoconstricción, las células endoteliales incrementan la expresión de VCAM e ICAM-1 facilitando la adhesión de monócitos y plaquetas a los vasos. Los mediadores inflamatorios causan apoptosis de las células endoteliales y las células musculares lisas, y producen proteinasas como las MMP-2 reguladas por las lipoproteínas oxidadas y las citocinas. Las MMP-2 contribuyen a activar la agregación plaquetaria, junto con los gránulos liberados por las propias plaquetas (TXA₂, ADP y FG2). Las células apoptóticas liberan FT activado que desencadena la cascada de la coagulación. El FT interactúa con el FVII, activa el FX, que activa la conversión de protrombina a trombina. Finalmente, se genera fibrina que, junto con las plaquetas activadas, dan estabilidad al trombo mural. El FT activado por los factores de riesgo sistémicos contribuye a la actividad procoagulante de las lesiones ateroscleróticas y a la formación del trombo.

Se ha comprobado en la hipercolesterolemia un déficit intracelular de L-Arginina que causa una menor producción de NO (Uemura S, 2000). Del mismo

modo, un aumento del estrés oxidativo (Kinlay S, 2001) como consecuencia de la presencia de especies oxígeno-reactivas (ROS) reduce la biodisponibilidad de NO.

Además de intervenir en la disfunción endotelial la producción exagerada de radicales libres contribuye a la inflamación, a la expresión del receptor LOX-1 y a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDLox) (White CR, 1994). Las LDLox son citotóxicas para las células endoteliales, inhiben la respuesta vasodilatadora mediada por NO (Liao JK, 1995) y favorecen la agregabilidad plaquetaria. Igualmente, concentraciones elevadas de LDL nativas (no oxidadas) inducen una regulación a la baja de eNOS (Vidal F, 1998) y en las CE humanas en cultivo producen una regulación transcripcional del gen y de los niveles proteicos de eNOS (Martínez-González J, 2001).

La incapacidad del endotelio de mantener la homeostasis del medio facilita la permeabilidad endotelial para el paso de lípidos, favorece la oxidación de las lipoproteínas, la inflamación, la proliferación de las CML, la deposición o lisis de la matriz extracelular, la activación plaquetaria y la trombogénesis.

Formación de la Estría Grasa

El inicio de la enfermedad se localiza fundamentalmente donde hay cambios en la velocidad y turbulencia de la sangre circulante demostrando la importancia de las condiciones hemodinámicas en el desarrollo de las lesiones. En las curvaturas y las bifurcaciones de los vasos es dónde estas turbulencias mecánicas, junto con la acción biológica de los factores de riesgo, provocan la disfunción endotelial y aumentan la permeabilidad de las CE al paso de lípidos y células plasmáticas. Como consecuencia, las partículas LDL que circulan en la sangre pasan a través del endotelio y son retenidas por los proteoglicanos (PGs) debido a la interacción electrostática de la carga negativa de los PGs y la positiva de la apolipoproteína B (Camejo G, 1998 y 2003). Las LDL acumuladas en el espacio subendotelial se modifican por procesos de oxidación, lipólisis y/o agregación favorecidos por la presencia de radicales libres y las características de los PGs de la íntima arterial. Estas LDLox son altamente inflamatorias y citotóxicas e inducen la respuesta inflamatoria con la atracción de células blancas (monócitos y linfocitos-T) hacia la lesión (Libby P, 2002).

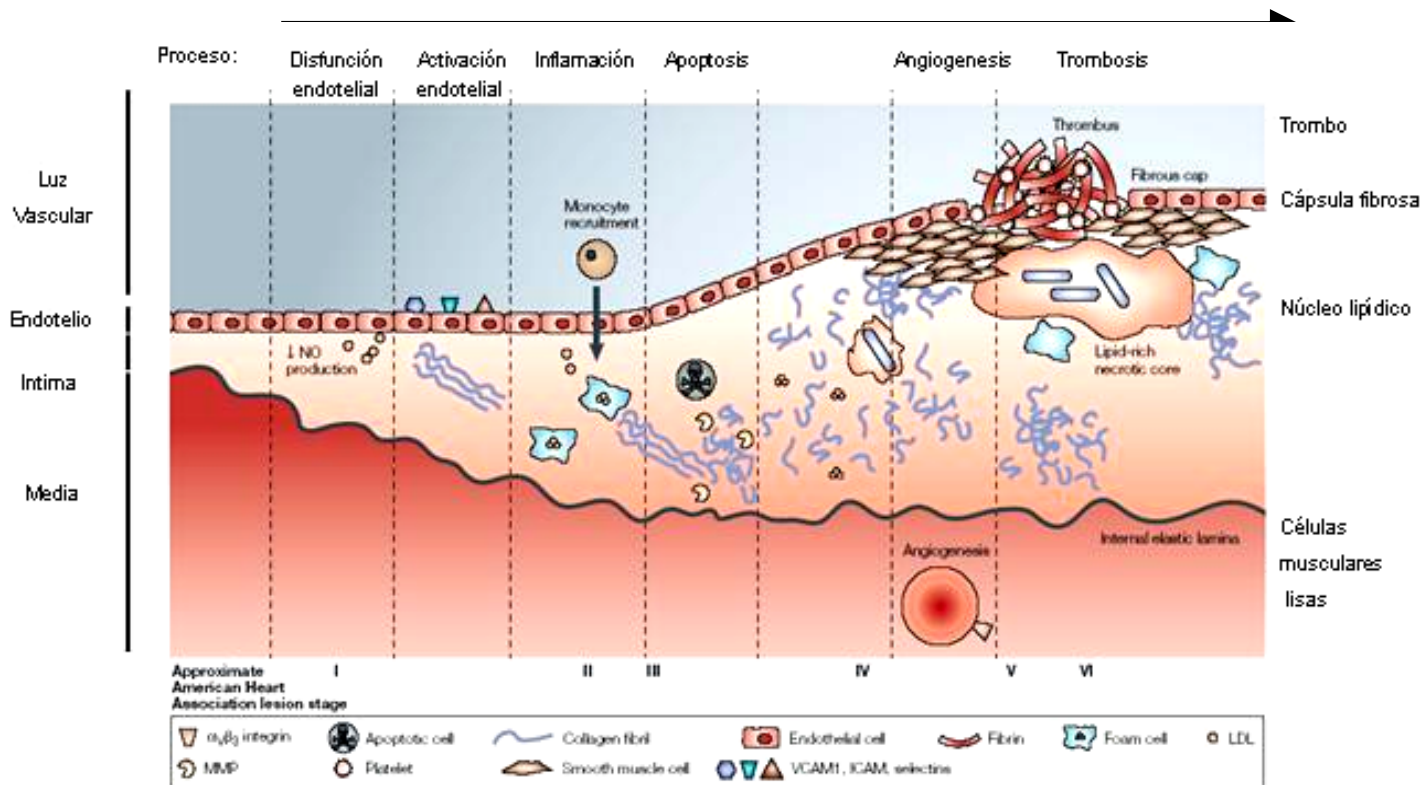


Figura 3. Inicio y evolución de la placa aterosclerótica. Tras los insultos iniciales se produce disfunción endotelial (izquierda): las CE expresan moléculas de adhesión (VCAM, ICAM) que facilitan la migración y reclutamiento de monocitos y linfocitos-T, atraídos también por MCP-1 y las LDLox. Por la acción de M-CSF los monocitos se diferencian a macrófagos, expresan los receptores *scavenger* y acumulan lípidos transformándose en células espumosas. Los macrófagos secretan citocinas (PDGF) que promueven la migración de las CML a la íntima y su proliferación, allí, activadas por el TGF-β de los macrófagos sintetizan colágeno I, principal componente de la cápsula fibrosa. En las lesiones ricas en macrófagos, éstos segregan proteasas (MMP) que degrada la cápsula fibrosa, favoreciendo la ruptura de la placa y exposición al torrente circulatorio de factores coagulantes (colageno, FT) favoreciendo el desarrollo de una placa avanzada complicada con trombosis (derecha) (*adaptado de R.P.Choudhury, 2004*).

Al mismo tiempo, como mecanismo de defensa, el endotelio expresa proteínas adhesivas (E-selectina, L-selectina y P-selectina) y quimiotácticas (MCP-1) que se unen a los ligandos de la superficie de los leucocitos y monocitos, células responsables de la eliminación del exceso de grasa, facilitando su atracción y adhesión a la superficie endotelial, en un proceso conocido como *homing*. La producción de estas selectinas estimula la expresión de proteínas adhesivas (la superfamilia de las ELAM: ICAM y V-CAM) que facilitan la interiorización de los leucocitos y monocitos adheridos a la pared vascular. Las LDLox y factores proinflamatorios (INF-γ, TNF-α) liberados por linfocitos-T, CE y CML, activan la transcripción de los genes responsables de la síntesis de factores quimiotácticos

como MCP-1 y M-CSF mediante la inducción del factor nuclear de transcripción NF κ B. El factor NF κ B también aumenta la síntesis y liberación de citocinas (IL-1, IL-2 e IL-6) que activan las células inflamatorias perpetuando de esta manera el proceso de acumulación celular en el espacio subendotelial (De Caterina, 2002). Los monócitos acumulados en la íntima de la pared fagocitan las LDLox acumuladas en la pared arterial y al incrementar su contenido lipídico se transforman en macrófagos espumosos (Ross R, 1999).

En el proceso de activación de los monócitos a macrófagos se producen cambios en su fisiología, como el aumento de la expresión en membrana de los receptores basureros o *scavenger* frente a otros (Geng YJ, 1995). Al contrario que otros receptores de LDL, los receptores *scavenger* no se regulan a la baja por las concentraciones de colesterol intracelular y permiten al macrófago fagocitar grandes cantidades de las LDLox acumuladas en la pared arterial transformándose así en células espumosas. La perpetuación de este proceso deriva en acúmulos focales de células espumosas que se observan en la superficie de la íntima, incluso en la infancia, y se denominan estrías grasas (Stary HC, 1989).

En condiciones fisiológicas los monócitos son los encargados de eliminar el acúmulo excesivo de lípidos. En este proceso también participan las lipoproteínas de alta densidad (HDL) encargándose del transporte reverso de los lípidos desde la pared vascular hasta el hígado. También se les ha atribuído otras funciones "protectoras" frente a la aterosclerosis (Linsel-Nitschke P, 2005): efecto antioxidante protector de la oxidación de las HDL, reducción de la expresión de moléculas de adhesión, aumento de la capacidad fibrinolítica endógena; aunque el más aceptado es el transporte reverso de colesterol.

Progresión de la lesión

La aparición de placas de ateroma representa el estadio intermedio entre la aparición de la estría grasa y la constitución de la placa vulnerable. La perpetuación de la respuesta inflamatoria con la acumulación de macrófagos y lípidos, y por otro lado, la proliferación y migración de las CML son los dos factores condicionantes de la progresión de la estría grasa a placa ateromatosa.

Los macrófagos y linfocitos T activados aumentan su capacidad de oxidación de lipoproteínas y la secreción de factores de crecimiento y citocinas inflamatorias (MCP-1, M-CSF, IL-1, TNF, IFN- γ) (Libby P, 1996; Ross R, 1996). Estas citocinas estimulan la expresión en las CE y CML de factores de crecimiento (bFGF, PDGF) y más citocinas originándose un círculo vicioso que perpetúa los procesos aterogénicos descritos anteriormente. Las células espumosas saturadas de lípidos acaban rompiéndose, liberando al intersticio su contenido en LDLox, radicales libres y otros materiales altamente tóxicos para el endotelio. Las LDLox y principalmente el PDGF (Ross R, 1993; Ferns GA, 1991) activan las CML de la capa media que secretan IL-1, TNF- α y TGF- β estimulando así la síntesis de PDGF y EGF (Calara F, 1996). El PDGF y otros agentes como la trombina y la Angiotensina II promueven la proliferación de las CML previa a su migración a través de la lámina elástica interna (LEI). Además el PDGF y citocinas liberadas por macrófagos activados inducen la expresión de proteasas (plasmina y metaloproteasas) en macrófagos y CML que degradan la matriz extracelular facilitando a su vez la migración de las CML. En el control de la migración de las CML intervienen una plétora de moléculas (PDGF, EGF, trombina, angiotensina II y otras) (Calara F, 1996; Berk BC, 1990; Kanthou C, 1992; Powell JS, 1989).

Este paso es tan importante como para permitir el cambio de fenotipo de estas células, de forma que dejan de ejercer una función principal en la contactibilidad celular, manteniendo la tonalidad del vaso, para adquirir fenotipo sintético que les confiere actividad funcional (migración, división, síntesis de proteínas de la matriz extracelular: colágeno, proteoglicanos y elastina, que formarán la capa fibrosa de la placa). Esta nueva funcionalidad permitirá mayor engrosamiento de la íntima y reducción del lumen arterial. Además se estimula la producción de factores de crecimiento (PDGF, IGF-I,..) y citoquinas (TGF β , IL-1) a través de las cuales las CML regulan su actividad. Así mismo, las CML, igual que los macrófagos, pueden captar y acumular intracelularmente LDL modificadas a través de receptores proteicos como LRP-1, transformándose así en células espumosas (Llorente-Cortés V, 1998 y 2002).

Cuando el endotelio se lesiona aparecen zonas focalmente denudadas, con el subendotelio expuesto, al que las plaquetas circulantes se adhieren. Las plaquetas y microtrombos formados contribuirán al crecimiento de la placa, mediante la

estimulación de las moléculas adyacentes del interior de la placa y/o su incorporación a la lesión (Falk E, 1995). Los productos de degranulación de las plaquetas (PDGF) y la trombina y fibrina (fibrinógeno) estimularán la adhesión de más plaquetas a la lesión y la migración y proliferación de las CML de la media a la íntima (Martinez-González, 2001). Estos trombos murales pueden actuar como reservorio de trombina (Meyer BJ, 1994) y liberación continuada de PDGF.

La migración de las CML hacia la íntima y la producción de fibras de colágeno resulta en la formación de una cubierta fibrosa protectora del núcleo lipídico. Esta cubierta fibrosa es uno de los componentes cruciales en la evolución de la placa aterosclerótica ya que separa el altamente trombogénico *core* lipídico de las plaquetas circulantes y otros factores de la coagulación. Las placas ateroscleróticas estables se caracterizan por un *core* lipídico necrótico y recubierto por una gruesa capa fibrosa rica en CML. Las lesiones se expanden por los laterales (hombros) mediante la continua adhesión de leucocitos (Ross R, 1999).

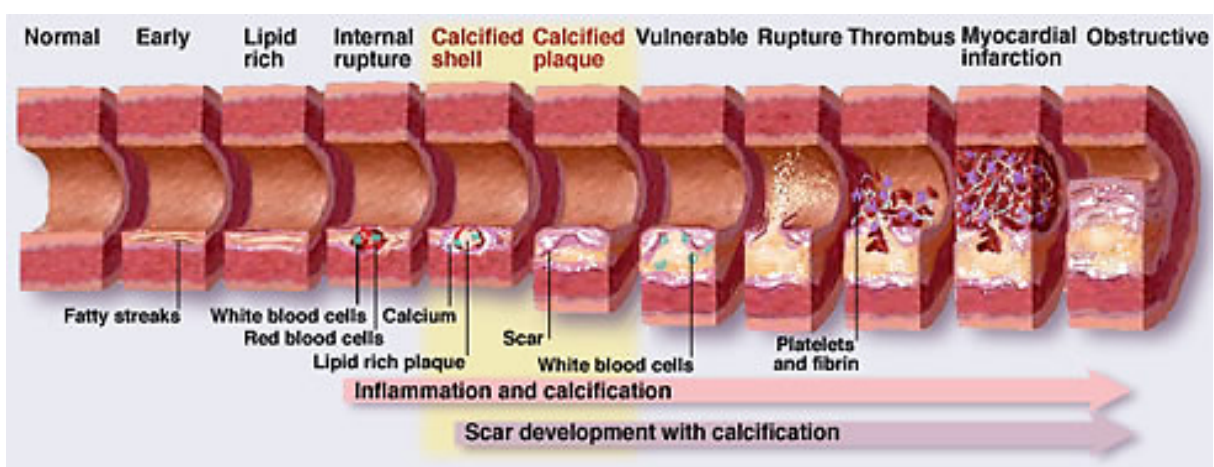


Figura 4. Evolución de la placa aterosclerótica. La aterogénesis tiene lugar a través de varias etapas, a lo largo de década, que se inicia con la aparición de la estría grasa en la primera década continuando con la estría fibrosa a partir de la segunda o tercera década y, finalmente, la placa complicada por hemorragia, trombosis o calcificación, que es el fenómeno responsable del evento clínico (infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, etc.)

La continua exposición de la placa formada al medio pro-trombótico crea un círculo vicioso que retroalimenta el crecimiento de la placa con un aumento de la quimiotaxis para los monócitos, induciendo mayor acumulación lipídica, necrosis del *core* y evolucionando la lesión hacia una aterosclerosis avanzada. El crecimiento de la placa es también la consecuencia de continuos episodios de

ruptura, generalmente subclínicos. Estas roturas generan un trombo sobre la zona que al organizarse repara la fractura, pero incrementa el volumen total de la placa, contribuyendo al crecimiento y progresión de la lesión (Fuster V, 1992b; Theroux P, 1998). Recientemente se han identificado nuevas características estructurales que definen estas lesiones, entre las que se incluye el crecimiento excéntrico de la placa con agrandamiento compensatorio del vaso (remodelado) y la neovascularización mediante el *vasa vasorum* que conduce a la expansión del *core* lipídico y a la hemorragia intra-placa.

-**Remodelación excéntrica.** Descrita por Glagov en 1987 (Glagov S, 1987) el remodelado de los vasos ha sido identificado en las lesiones ateroscleróticas responsables de los síndromes coronarios inestables. Además las placas ateroscleróticas que se están remodelando se caracterizan por tener un gran *core* lipídico, pocas CML y un aumento de la infiltración de macrófagos (Ward MR, 2000). La placa crece excéntricamente en el vaso y no concéntricamente hacia el lumen, lo que provoca cambios cruciales en la túnica media y en la adventicia. También se ha documentado un aumento de la inflamación, fibrosis y atrofia de la túnica media y de la adventicia, sobre todo en placas que han sufrido ruptura comparadas con las que no (Moreno PR, 2002). Los componentes de la placa que están más asociados con la remodelación excéntrica de la placa son la infiltración de macrófagos, la calcificación y el área que ocupa el *core* lipídico. Se asocian así los conceptos de remodelado con el de vulnerabilidad de la placa. En consecuencia, estructuras como la LEI, la túnica media y la adventicia, implicadas en la remodelación, aparecen ahora activamente implicadas en el desarrollo y posteriores complicaciones de la aterosclerosis y pueden tener también un papel importante en la aparición de los síndromes coronarios agudos.

-**Neovascularización por *vasa vasorum*.** En los vasos sanos la nutrición y oxigenación de la pared viene dada por difusión desde el lumen sanguíneo o desde los *vasa vasorum* de la adventicia. Es más, ya que su principal función es nutrir los vasos el número de *vasa vasorum* permanece constante durante la vida (Scotland RS, 2000). Pero cuando el grosor de la pared vascular impide la correcta difusión del oxígeno los *vasa vasorum* proliferan en las capas internas de la pared vascular,

dónde normalmente están ausentes. Se ha descrito que los macrófagos, atraídos por las LDLox, son responsables de la producción de citocinas que inducen el crecimiento de los neovasos (Polverini PJ, 1977, Lee WS, 1998). Históricamente se ha relacionado esta neovascularización aterotrombótica como una vía para la infiltración de macrófagos (Purushothaman KR, 2005 abstr), aunque actualmente se relaciona más con el proceso de regresión de la placa al servir potencialmente como vía para el transporte reverso de lípidos (Williams JK, 1988).

Tipos de lesión

Los estudios morfológicos han proporcionado importantes respuestas sobre la evolución de la lesión aterosclerótica (Stary HC, 2000). Todos los humanos desarrollan engrosamientos focales, excéntricos, en la capa íntima de arterias de medio y gran tamaño (engrosamiento adaptativo de la íntima), debido a la proliferación de células musculares lisas (CML) como respuesta a fuerzas mecánicas locales, inducidas por el flujo sanguíneo especialmente en zonas de bifurcaciones arteriales. Además de provocar un engrosamiento adaptativo, las fuerzas mecánicas de flujo en estas zonas favorecen la permeabilidad de moléculas circulantes como lipoproteínas plasmáticas, albúmina y fibrinógeno. Estas lesiones aparecen ya a edades tempranas, de hecho hacia final de la segunda década la mayoría de personas han desarrollado lesiones en la capa íntima (**Tipo I y II**). En tales lesiones, se encuentran grupos aislados de macrófagos, sin o con inclusiones lipídicas, sobre todo ésteres de colesterol (células espumosas). Las lesiones iniciales Tipo I consisten en células espumosas derivadas de macrófagos que contienen gotas de lípidos y son sólo identificables bioquímica y microscópicamente, mientras que las lesiones Tipo II son visibles macroscópicamente como puntos grasos o estrías mínimamente elevadas en el lumen de las arterias (estrías grasas). Presentan una mayor proporción de macrófagos cargados de lípidos que las lesiones Tipo I. Cada lesión está formada por una o más capas de células espumosas y se acompañan ocasionalmente por CML que también contienen inclusiones lipídicas. La progresión de estas placas más allá de la fase de estría grasa, se asocia con una secuencia de cambios que se inician con la aparición de acúmulos múltiples y difusos de lípidos extracelulares

(lesión de **Tipo III**), que pueden progresar a una acumulación única más grande de lípido extracelular, sobre todo como colesterol libre y sus ésteres, formando el núcleo lipídico característico de las lesiones **Tipo IV** (ateroma). Estas lesiones contienen gránulos de calcio, localizados extracelularmente en el núcleo lipídico o en el interior de algunas CML. Las lesiones **Tipo V** se caracterizan porque las CML migran hacia el núcleo lipídico y proliferan dentro del mismo formando una capa sobre su cara luminal. Esta lesión se conoce como fibroateroma. Habitualmente se produce más colágeno y la placa aumenta su tamaño haciendo que el núcleo lipídico quede sin perfusión, es decir, avascular y acelular, formado por un acúmulo de desechos pastosos que incluye macrófagos y células mesenquimales muertas con abundantes cristales de colesterol libre que constituyen el *core* lipídico. Las lesiones que tienen depósitos trombóticos visibles con o sin hemorragia, además de lípido y colágeno, se refieren como placas fibroateromatosas complicadas o lesiones complejas, y se clasifican como lesiones **Tipo VI**. La categorización de **Tipo VII** se reserva para las placas avanzadas y mineralizadas (lesión calcificada), aunque también es posible encontrar microcalcificaciones en las lesiones transitorias (de Tipo III a Tipo IV). Finalmente, las lesiones ateroscleróticas que consisten casi enteramente en colágeno fibrilar se describen como lesiones **Tipo VIII**. Éstas lesiones pueden ser consecuencia de la regresión del *core* lipídico o ser consecuencia de un trombo que se ha formado en una zona de la arteria en la que no había acumulación lipídica.

Fases de la aterotrombosis

De acuerdo con los criterios publicados por la American Heart Association (Stary HC, 1994 y 2000) la progresión de la placa puede subdividirse en cinco fases patológica y clínicamente relevantes (Figura 5).

- **Fase 1 (temprana)**. Las lesiones son pequeñas, habitualmente se observan en jóvenes, e incluye las lesiones de Tipo I, II y III.

- **Fase 2 (avanzada)**. Estas placas se categorizan morfológicamente con una de estas dos variantes: lesiones Tipo IV, confluencia de lesiones celulares con una

gran cantidad de lípido extracelular entremezclado con células “normales” de la intima, que pueden predominar como capa externa o cápsula; o lesiones de Tipo Va, con un core extracelular cubierto por una cápsula fibrosa adquirida. Las lesiones, aunque no necesariamente estenóticas, tienen tendencia a la rotura debido a su alto contenido lipídico, al aumento de inflamación y a la presencia de una capa fibrosa delgada. Las placas de la Fase 2 pueden evolucionar a las fases agudas 3 y 4.

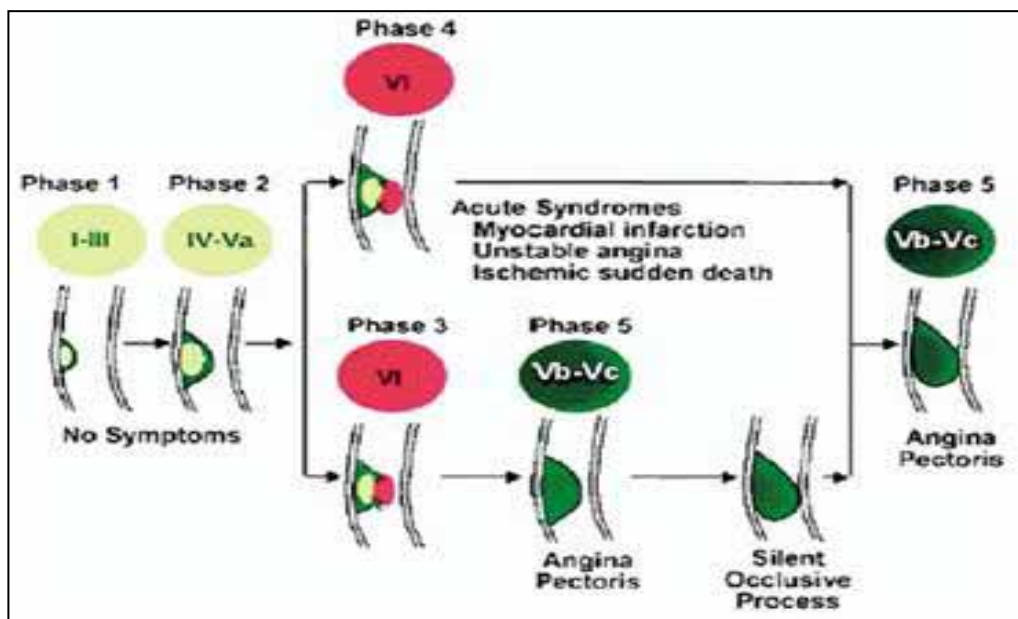


Figura 5. Correlación clínico-patológica desde la aterosclerosis asintomática (Fases 1 y 2; lesiones Tipo I á Va) hasta la aterotrombosis sintomática (tomado de Fuster V, 2005).

- Fase 3. Las lesiones de esta fase están caracterizadas por la complicación aguda de las lesiones Tipo VI que ocasionan trombosis mural no obstructiva. Las lesiones Tipo VI se originan a partir de lesiones Tipo IV o Va erosionadas o rotas. La complicación aguda de las placas Tipo VI es clínicamente silenciosa, pero puede, ocasionalmente, producir un principio de angina (Davies MJ, 1996).

- Fase 4. Estas lesiones se caracterizan por la complicación aguda de las lesiones Tipo VI, con trombosis oclusiva permanente y/o recurrente. Este proceso puede manifestarse clínicamente como un síndrome coronario agudo (SCA), aunque suele ser clínicamente silencioso (Canto JG, 2000; Sheifer SE, 2001). Alrededor del 66% de los SCA están causados por trombosis oclusiva sobre una

placa rota, aunque el otro 33% ocurre sobre la superficie de una placa erosionada (Falk E, 1995). En las fases 3 y 4 los cambios en la geometría de las placas rotas, así como la organización con tejido conectivo del trombo superpuesto, conlleva a la formación de placas fibrosas oclusivas o altamente estenóticas.

- **Fase 5.** Esta fase esta caracterizada por lesiones de Tipo Vb (calcificadas) o Vc (fibróticas) que pueden provocar angina. De todas maneras, si anteriormente se ha producido una estenosis u oclusión con isquemia asociada, el miocardio puede estar protegido por la circulación colateral originada y estas lesiones quedan silentes o clínicamente inaparentes (Pohl T, 2001; Werner GS, 2001).

Vulnerabilidad de la placa aterosclerótica.

La placa aterosclerótica puede causar complicaciones como consecuencia de su tamaño, reduciendo el diámetro de lumen vascular y el flujo sanguíneo, o por su tendencia a la erosión y/o ruptura. La rotura de una placa y la exposición de su contenido a la sangre circulante inducen la formación de un trombo agudo en el sitio de la placa que puede llegar a ocluir el lumen arterial en la misma zona de rotura o distalmente por embolización, provocando de esta manera los síndromes isquémicos agudos, el infarto de miocardio y la angina inestable. La misma formación de la placa puede incluso producir daño en las arterias, resultando en el adelgazamiento y debilidad de la pared arterial y la posible formación de aneurismas y hemorragias.

La composición de la placa, más que el porcentaje de estenosis que provoca, es el factor crítico que determina el riesgo de rotura y posterior trombogenicidad. Un *core* rico en lípido extracelular, abundancia de células inflamatorias y un reducido número de CML, una cápsula fibrosa delgada con pocas fibras de colágeno y un endotelio disfuncional caracterizan morfológicamente las placas con tendencia a la rotura. El endotelio disfuncional aumenta la propensión de las placas a romperse debido a la adquisición de sus propiedades proinflamatorias, protrombóticas y vasoconstrictivas que modulan desde la composición de la lesión hasta las repuestas al crecimiento de la placa, el tono vascular y la fuerza de cizalladura local (Ross R, 1996)

Los factores que predisponen a la ruptura de la placa pueden clasificarse en intrínsecos y extrínsecos, actuando en conjunción o independientemente. Los factores intrínsecos están relacionados con la composición celular y bioquímica de la lesión y pueden ser modulados con intervenciones dietéticas, farmacológicas y de estilo de vida. Los factores extrínsecos están relacionados con la localización geográfica de la placa y las características del flujo sanguíneo que actúa, fundamentalmente, sobre el aspecto proximal de la placa.

De entre todos los factores que pueden influir en la disrupción de la placa destacamos cuatro con una influencia mucho más decisiva: el tamaño y consistencia del núcleo ateromatoso; el grosor y contenido en colágeno de la cubierta fibrosa que recubre este *core*; la inflamación en la cubierta y del TF; y la fatiga o agotamiento de la cubierta (Falk E, 1992)

- **Tamaño y consistencia del núcleo ateromatoso.** El tamaño y la consistencia del núcleo ateromatoso es lo que determina la estabilidad de la lesión. Se ha descrito que cuanto mayor es el núcleo ateromatoso respecto al tamaño de placa, menor es el grosor de la cápsula fibrosa y mayor la vulnerabilidad de la placa (Dickson BC, 2003). De hecho, cuando el núcleo ateromatoso ocupa entre el 30-40% del total de la placa, se considera que dicha placa tiene alto riesgo para la rotura (Davies MJ, 2001; Falk E, 1995).

- **Estructura y dureza de la cápsula fibrosa.** El grosor y el contenido en colágeno de la cápsula fibrosa son importantes para la estabilidad de la placa (Loree HM, 1992). La cápsula fibrosa varía en grosor, celularidad, matriz, consistencia y rigidez, pero normalmente son más delgadas (e infiltradas de macrófagos) en las zonas de los hombros que es donde, normalmente, ocurren las rupturas (Richardson PD, 1989). El colágeno es importante para resistir la propia fuerza tensora de los tejidos y las cápsulas rotas contienen pocas CML (que son las que sintetizan el colágeno en las placas) y menos colágeno que las cápsulas intactas (Burleigh MC, 1992). La causa de esta potencialmente peligrosa falta de CML en las cápsulas rotas se desconoce, pero es posible que las CML desaparezcan como resultado de la muerte celular por senilidad y/o apoptosis (Braganza DM,

2001; Boyle JJ, 2001). También se ha descrito que los macrófagos liberan $\text{INF-}\gamma$ que inhibe la proliferación de CML además de interleucina 1β y $\text{TNF}\alpha$ que sinérgicamente son tóxicos para las CML (Libby P, 1995). Además se ha demostrado que los macrófagos activados pueden inducir la apoptosis de las CML por contacto directo célula-célula (Braganza DM, 2001). La pérdida de células y la calcificación de la cápsula fibrosa están asociadas a un aumento de la rigidez (Lee RT, 1991) que puede evolucionar hacia un debilitamiento y/o rotura de la placa, con el agravante de la exposición al torrente sanguíneo del contenido intraplaca, potente inductor trombogénico.

- **Proceso de inflamación en la cápsula fibrosa.** Si en el inicio de la lesión el papel principal de los monócitos-macrófagos es defensivo (fagocitar el material lipídico depositado en la pared), en los estadios más avanzados de las lesiones vasculares, los macrófagos son responsables de la vulnerabilidad de la lesión, ya sea mediante la degradación de la cápsula por fagocitosis directa o bien por la liberación de factores quimiotácticos y citoquinas que atraen al núcleo ateromatoso macrófagos adicionales, células T y células cebadas. Las células inflamatorias secretan numerosas enzimas proteolíticas, tales como activadores de plasminógeno y una variedad de MMP (colagenasas, gelatinasas y estromalinas) (Horton DB, 2001) que, junto a la generación de productos tóxicos (radicales libres y productos de la oxidación de los lípidos), facilitan el daño de la pared vascular contribuyendo a debilitar la cápsula fibrosa y predisponiéndola a la rotura. Se ha observado que las lesiones causantes de los síndromes coronarios agudos contienen mayor cantidad de macrófagos que las lesiones que producen angina estable (14% vs. 3% de placa ocupada por macrófagos) (Moreno PR, 1994). Diversos estudios han revelado el papel clave de la inflamación en la rotura de la placa al demostrar que los macrófagos presentes están activados (Shah PK, 1999; Tousoulis D, 2003).

La presencia de estímulos proinflamatorios (proteína C reactiva, citoquinas, etc.) también favorece la apoptosis de los macrófagos, que liberan su contenido en TF. Al entrar el TF en contacto con la sangre circulante, promueve la formación de trombina y la trombosis de la luz (Moons AH, 2002). Por ello, la apoptosis de los macrófagos podría ser considerada como el vínculo de unión entre la inflamación y

las complicaciones trombóticas que tienen lugar durante la enfermedad arteriosclerótica (Hutter R, 2004).

- **Fatiga o agotamiento.** Existe, también, una importante contribución de eventos mecánicos en la inestabilización de las placas ateroscleróticas: estiramiento, compresión, plegamiento y flexión que si son cíclicos, pueden fatigar y debilitar la cápsula fibrosa facilitando su rotura espontánea. De este modo, si se disminuye la frecuencia (ritmo cardíaco) y la magnitud de la carga (relacionada con el flujo y la presión), se reduce el riesgo de rotura de la placa (Hjalmarson A, 1990).

Las placas muy organizadas, con poco contenido en lípidos y fibrosas son duras y resistentes a la ruptura. Estas placas estables representan la mayoría de los procesos ateroscleróticos, aunque raramente ocasionan eventos clínicos, solamente determinados episodios de isquemia al comprometer el flujo.

Por el contrario, las placas fibrolipídicas contienen un importante núcleo lipídico avascularizado, hipocelular (excepto en la periferia donde se encuentran preferentemente las células espumosas), rico en ésteres de colesterol y muy blando, sin soporte estructural del colágeno. Es por ello que estas placas son más vulnerables a la ruptura y son responsables de la mayoría de los incidentes clínicos. La rotura, normalmente tiene lugar donde la cápsula fibrosa es más fina, está infiltrada con más número de células espumosas y donde la suma de las fuerzas físicas que actúan sobre la placa es más fuerte (Kolodgie FD, 2001). En el caso de las placas excéntricas, este punto es a menudo el área del extremo de la placa, donde la placa se une al vaso adyacente menos lesionado (Fuster V, 1992b).

COMPLICACIONES TROMBÓTICAS

Alrededor del 75 % de los síndromes coronarios agudos se dan sobre una placa muy rica en lípidos, probablemente por la debilidad de la pared y con la colaboración de las MMP liberadas por los macrófagos. Pero también hay episodios de trombosis sobre placas que aparentemente no son "de riesgo", es decir, placas

fibrosas y estenosantes. Diferentes factores pueden influir en el desarrollo de las complicaciones trombóticas de la placa aterosclerótica, aunque destacamos como factores modulares de la trombosis el sustrato vascular local, la influencia que ejerce la reología y la trombosis superpuesta y lo que últimamente se denomina "sangre vulnerable" o estado protrombótico sistémico.

Sustrato vascular local. De entre todos los componentes de la placa aterosclerótica se ha comprobado que tanto el material lipídico (Fernández-Ortiz A, 1994) como el FT (Toschi V, 1997) son los más trombogénicos. Incluso en estudios realizados ex vivo con la cámara de perfusión Badimon se ha podido observar que la trombogenicidad de estas lesiones lipídicas queda abolida al neutralizarse el FT arterial con el inhibidor fisiológico de la cascada metabólica del FT (TFPI) (Badimon JJ, 1999).

EL FT es una pequeña glicoproteína de bajo peso molecular que pertenece a la superfamilia de los receptores tipo citocinas (Edgington T, 1991). Esta proteína de membrana se distribuye en gran número de tejidos formando parte de las cápsulas fibrosas que rodean a los órganos (Drake TA, 1989). En las arterias el FT es abundante en la adventicia donde predominan los fibroblastos, mientras que prácticamente no se encuentran en la túnica media (Maynard JR, 1977). Las células en contacto directo con la sangre, como las células endoteliales, no lo expresan constitutivamente, pero lo pueden sintetizar tras ser inducidas por citocinas, endotoxinas, infecciones víricas, trombina y algunos factores de crecimiento (Camerer E, 1996). La trombosis se desencadena cuando se produce una lesión vascular o se exponen los componentes del interior de la placa aterosclerótica, que expresan FT, a la circulación sanguínea (Fuster V, 1996 y 1997). Trabajos recientes afirman que las moléculas de FT provienen de los restos de membranas resultantes de la muerte por apoptosis de macrófagos contenidos en el núcleo graso (Mallat Z, 1999) y de microvesículas asociadas a FT que son secretadas a partir de las CML que componen la lesión (Schechter AD, 2000) y cuya liberación se incrementa por exposición de CML a LDLox (Llorente-Cortés, 2004). Recientemente se ha descubierto que existe un *pool* de FT en la circulación sanguínea que es potencialmente activo (Suefuji H, 1997; Key NS, 1998; Giesen PL, 1999) y cuyo origen celular se desconoce.

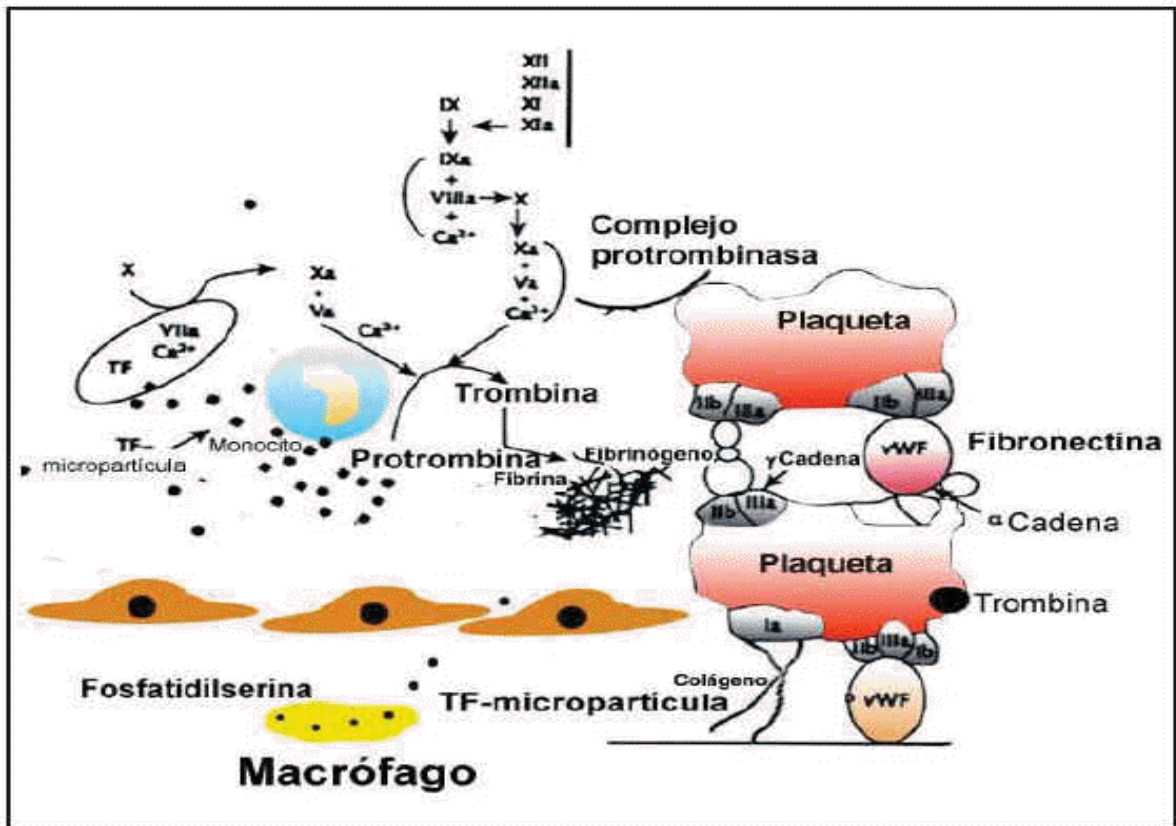


Figura 6. Factor tisular y activación de la cascada de la coagulación. La rotura de la placa pone en contacto el contenido de la placa con el torrente circulatorio, activando la hemostasis y generando trombina. Las plaquetas se unen al factor von Willebrand y al colágeno a través de los receptores GPIb y GPIa. El fibrinógeno se une a los receptores GPIIb/IIIa y se forman puentes entre plaquetas y fibrinógeno, facilitando la agregación plaquetaria. El FT de la placa aterosclerótica se activa al entrar en contacto con la fosfatidilserina en la superficie de las células apoptóticas, y forma micropartículas procoagulantes que, junto con las transportadas por los monocitos, activan la cascada de la coagulación generando trombina. La trombina generada, en asociación con las membranas celulares y las plaquetas, convierte el fibrinógeno en fibrina, activa las plaquetas y los factores V y VIII, estabilizando el crecimiento del trombo (*adaptado de Sambola A, 2003*).

Reología y trombosis. El grado de estenosis causado por la ruptura de una placa y el trombo superpuesto formado son factores clave que determinan la trombogenicidad en esa zona arterial. Especialmente, la fuerza de cizalladura está directamente relacionada con la velocidad del flujo sanguíneo e inversamente relacionada con el diámetro del lumen. En consecuencia, la deposición plaquetaria aguda tras la ruptura de la placa está modulada por el grado de estenosis post-ruptura. Los cambios en la geometría aumentan la deposición plaquetaria. El repentino crecimiento del trombo sobre la zona de la ruptura puede provocar una

estenosis del vaso e incluso llegar a una posterior oclusión trombótica. La mayor parte de las plaquetas se depositan en la zona del ápex de la estenosis que es donde las fuerzas de cizalladura son más elevadas (Badimon L, 1989; Frojmovic M, 2002).

Sangre Vulnerable. En un tercio de los casos de los accidentes coronarios agudos, especialmente en los casos de muerte súbita, no se produce rotura de la placa aterosclerótica vulnerable, sino una erosión superficial de la placa moderadamente estenótica y fibrosa (Virmani R, 2000). En estos casos la formación del trombo depende principalmente de un estado hipertrombogénico de la sangre desencadenado por factores sistémicos. En esta actividad sistémica procoagulante están mayoritariamente implicados los factores de riesgo coronario y el factor tisular circulante. Ya hemos visto la importancia que tienen los diferentes factores de riesgo sobre la incidencia de la enfermedad cardiovascular, pero veremos cómo afectan algunos de estos factores a la trombosis vascular.

El aumento de los valores séricos del cLDL incrementa la trombogenicidad de la sangre y el crecimiento del trombo en condiciones reológicas definidas (Dangas G, 1999; Rauch U, 2000). Los pacientes con valores elevados de cLDL muestran altas concentraciones de FT, lo que podría explicar este aumento de la trombogenicidad en pacientes hiperlipémicos. La hipercolesterolemia se ha asociado con la generación de LDLox y de ROS en la pared vascular (CML) y en la circulación sanguínea (monócitos y macrófagos) (Steinberg D, 1999) que pueden generar FT y su correspondiente ARNmensajero, liberándolo a la circulación (Aikawa M, 2002). La LDL agregada incrementa la expresión y liberación de FT en CML (Llorente-Cortés V, 2004).

El tabaco aumenta la actividad nerviosa simpática y, por tanto, la liberación de catecolaminas (Narkiewicz K, 1998). De esta manera se potencia la activación plaquetaria e incrementa los valores séricos de fibrinógeno, así como la oxidación de las LDL, la activación de los monócitos y la generación de trombina. En sujetos fumadores se ha observado una asociación entre disfunción endotelial e incremento de la actividad procoagulante, tal vez por una reducción de la relación t-PA/PAI-1

y de los valores TFPI (Newby DE, 2001), así como una rápida liberación de FT (Sambola A, 2003).

Los pacientes diabéticos, en especial los que tienen un control ineficiente de la enfermedad, presentan un desarrollo prematuro de la aterosclerosis y un incremento de la trombogenicidad de la sangre (Osende JI, 2001). Las plaquetas circulantes de los pacientes con diabetes tienen aumentada la reactividad y la agregabilidad debido a la expresión activa de moléculas de adhesión como GPIIb/IIIa activada, GP53 lisosomal, trombospondina o P-selectina (CD62 p) (Tschoepe D, 1997). La función plaquetaria anormal está reflejada en el incremento del consumo de plaquetas y el aumento de la acumulación de plaquetas en los vasos.

Observaciones recientes indican que los estados de hipertrombogenicidad asociados con un cLDL elevado, el hábito tabáquico y la diabetes comparten un mecanismo común de activación de la interacción leucocitos-plaquetas asociado a la liberación de FT y la activación de la trombina. Estudios recientes han encontrado un aumento de las concentraciones de antígenos del FT circulante en pacientes con enfermedad coronaria (Geslen PL, 1999), y el factor tisular circulante se ha asociado a un aumento de la trombogenicidad de la sangre en pacientes con angina inestable y enfermedad coronaria crónica (Kaikita K, 1997; Soejima H, 1999). Los niveles de factor tisular en la sangre circulante también se han considerado predictores de la evolución en pacientes con angina inestable (Soejima H, 1999; Toschi V, 1997).

Como se ha comentado con anterioridad, las placas ateromatosas ricas en lípidos contienen macrófagos y FT dentro del núcleo lipídico, que podrían ser los causantes, en gran parte, de la alta trombogenicidad de este tipo de lesiones (Badimon JJ, circ 1999). Además, el FT fue identificado dentro de los trombos formados en la luz de las arterias coronarias y la inhibición específica del FT mediante el inhibidor específico del factor tisular recombinante (tissue factor pathway inhibitor [TFPI]) reduce significativamente la trombogenicidad de la placa (Drew AF, 1997, Hutter R, 2004).

Además de los restos de macrófagos apoptóticos y de las micropartículas de las placas aterosclerosas, parece que los monocitos activados en la sangre circulante son la fuente de micropartículas de factor tisular, y podrían ser el

resultado de la activación de los factores de riesgo mencionados anteriormente y de otros, contribuyendo a los eventos trombóticos. Dentro del contexto de los posibles efectos proinflamatorios y protrombóticos de la sangre circulante con altos valores de cLDL, tabaquismo y diabetes, hay una creciente evidencia de que los monócitos circulantes y los leucocitos, en menor grado, pueden estar involucrados en la producción de factor tisular y el aumento de la trombogenicidad (Hutter R, 2004).

TROMBOSIS ARTERIAL

La fisura o rotura de una placa aterosclerótica en las arterias coronarias, ya sea de manera espontánea o inducida (intervenciones de revascularización), con la consiguiente formación del trombo, es fundamental para el desarrollo de los síndromes isquémicos agudos, como ha sido plenamente demostrado en estudios anatomopatológicos de pacientes que murieron repentinamente o poco después de un episodio de angina inestable o de infarto de miocardio (Davies MJ, 1985; Falk E, 1983). En pacientes asintomáticos y en aquellos con angina estable, la organización de dicho trombo es importante en la progresión de la arteriosclerosis.

FORMACIÓN DEL TROMBO: ADHESIÓN, ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA.

La exposición al torrente circulatorio de matriz vascular induce una rápida adhesión, activación y extensión de la plaqueta sobre la superficie lesionada y posterior agregación con otras plaquetas para formar un tapón plaquetario o trombo blanco. Finalmente, las plaquetas agregadas reclutan otras células de la sangre (eritrocitos, neutrófilos y ocasionalmente monocitos), formando un trombo mixto.

La adhesión y activación plaquetaria

El proceso de adhesión comprende el transporte por difusión de las plaquetas hacia la superficie reactiva y la interacción de los receptores de la membrana plaquetaria con sus respectivos ligandos en las estructuras de la pared lesionada. Entre las proteínas adhesivas de la matriz extracelular (ECM) se incluyen el colágeno, la fibronectina, el factor de von Willebrand (vWf), la laminina, la vitronectina y la trombospondina. En la Tabla 3 se nombran los diferentes receptores descritos que aparecen en la membrana de la plaqueta de tipo glicoproteína (GP) y sus respectivos ligandos en la matriz vascular.

LIGANDOS (matriz vascular)	RECEPTORES PLAQUETARIOS
Colágeno	-GP Ia-IIa -GP IIb-IIIa -GP IV
Fibrinógeno	-GP IIb-IIIa
Fibronectina	-GP Ic-IIa -GP IIb-IIIa
Trombospondina	-Receptor de vitronectina -GP IV
Vitronectina	-Receptor de vitronectina -GP IIb-IIIa
Factor von Willebrand	-GP Ib-IX -GP IIb-IIIa
Laminina	-Región GP Ic-IIa

Tabla 3. Receptores plaquetarios de proteínas adhesivas

El vWf es una glicoproteína multimérica que contiene una cantidad variable de subunidades con distintos dominios de interacción, como por ejemplo, el dominio A3 (interacciona con el colágeno tipo I/III) (Pareti FI, 1986; Kalafatis M, 1987; Sixma JJ, 1995), el dominio A1 (interacciona con la glicoproteína Ib) (Morí H, 1988; Berndt MC, 1992) y la secuencia arg1744 gly1745 asp1746 (RGD) (interacciona con la glicoproteína IIb/IIIa) (Peritelli P, 1992)

El vWf es sintetizado por las células endoteliales, plaquetas y megacariocitos. Las células endoteliales secretan vWf (la mayoría del cual es secretado constitutivamente) hacia la ECM (subendotelio), y luminalmente hacia el

torrente circulatorio (vWf plasmático). Las plaquetas lo secretan de sus *gránulos α* tras la activación plaquetar y liberación del contenido granular.

Se ha descrito que a velocidades de cizalladura elevadas (>650/s) (Savage B, 1996), típicas de vasos pequeños o vasos de mayor tamaño parcialmente ocluidos, el vWf plasmático juega un papel fundamental en la formación del trombo. Esto se debe principalmente a que las condiciones de alto estrés de cizalladura inducen un cambio conformacional del vWf (de circular a lineal), que permite exponer su dominio A3 al colágeno vascular. Esta unión induce otro cambio conformacional en el dominio A1 del vWf que le permite unirse a la GPIb plaquetar. Tras la adhesión plaquetar a la superficie dañada, se inicia la extensión de la plaqueta debido a la unión del vWf (región RGD) con la GPIIb/IIIa plaquetar. Esta última interacción activa mecanismos irreversibles de traducción de señales intraplaquetares, que derivan en la activación plaquetar y finalmente en la formación de agregados plaquetares. A altas velocidades de cizalladura el vWf no sólo participa en la adhesión plaquetar al subendotelio (Sakariassen KS, 1979), si no que también promueve la interacción plaqueta-plaqueta (Turitto VT, 1984).

A baja velocidad de cizalladura, la función de adhesión plaquetar la realiza principalmente el receptor del colágeno que se enlaza al receptor plaquetar GP Ia-IIa (Saelman EU, 1994). Aunque en menor grado, la fibronectina, la laminina y la vitronectina/tromboespondina también contribuyen a la adhesión plaquetar a velocidades de cizalladura entre 300 y 1600/s (Houdijk WP, 1985; Bastida E, 1987; Hindriks G, 1992). Estas proteínas se enlazan con las cuatro integrinas plaquetares; la glicoproteína Ic-IIa, los receptores para la laminina, los receptores para la vitronectina y la GPIV respectivamente.

En el proceso de activación plaquetar, además del colágeno, participan el ADP liberado por los eritrocitos hemolizados en el área de la lesión vascular, la trombina y epinefrina circulante. Todos ellos desencadenarán al menos cuatro efectos principales que perpetúan el proceso:

- 1) Se inicia la reacción de liberación del contenido de los gránulos plaquetarios (serotonina, ADP, ATP, pirofosfato, calcio, fibrinógeno, vWf, factor V y PDGF).

2) Las fosfolipasas inician la vía de activación del ácido araquidónico y la consiguiente formación de TXA_2 a través de la activación de la COX y la tromboxano sintasa.

3) Se transloca a la superficie plaquetar, la P-selectina, la que provoca la unión de las plaquetas a los monocitos, neutrófilos y algunos linfocitos.

4) Se produce un cambio drástico de la morfología de las plaquetas, de un disco liso a una esfera espinosa.

Estos cambios de forma de membrana favorecen el realineamiento de los componentes fosfolipoproteicos de membrana, que inducen la aceleración de la coagulación sanguínea (Badimon L, 1990), la formación de trombina, que amplifica el efecto activador inicial del colágeno, y la activación, liberación y reclutamiento de las plaquetas. Todo ello produce la formación de eicosanoides y la aparición de filamentos de fibrina, inicialmente en la porción exterior del trombo plaquetario, pero también en los intersticios entre las plaquetas adheridas. El enlace de la trombina a la fibrina o a la pared arterial enmascara receptores sobre la trombina para la antitrombina III, la heparina y el cofactor II, de modo que este trombo mural actúa como un potente estímulo trombogénico que favorecerá el crecimiento del trombo, que es dependiente de trombina y relativamente resistente a la heparina (Badimon L, 1992).

La mayoría de los agonistas que inducen la activación plaquetar actúan a través de la hidrólisis de fosfatidilinositoles de la membrana plaquetaria y resultan en la movilización del calcio libre del sistema tubular denso de la plaqueta. Esta liberación de calcio es responsable de la gran parte de los procesos observados en las plaquetas activadas, tales como la contracción y secreción del contenido granular de las plaquetas (Colman RW, 1987), la fosforilación de la miosina, la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana catalizado por la fosfolipasa A_2 (Pickett WC, 1976) y el cambio conformacional del receptor GPIIb-IIIa. Tras la activación, las plaquetas pierden su forma natural de disco, forman pseudópodos y se extienden sobre la zona lesionada (Escolar G, 1986). La unión de la integrina GPIb a FvW del endotelio en la adhesión activa también la pequeña proteína G, RhoA, que es responsable a su vez de la expresión "dentro-fuera" y

"fuera-dentro" y del cambio conformacional de diferentes integrinas de la membrana de la plaqueta (Leng L, 1998). RhoA es una proteína miembro de la superfamilia RAS de las proteínas de unión-GTP de la familia de las pequeñas Rho-GTPasas, proteínas regulatorias que están implicadas en la organización del citoesqueleto de actina, en la adhesión y en la migración celular.

Las proteínas Rho

Las proteínas Rho juegan un papel importante en la organización del citoesqueleto de actina (Chardin P, 1989). Un gran número de estudios ha permitido establecer la implicación de estas proteínas en la regulación de la contractilidad, motilidad y migración celulares, extensión y retracción de neuritas, adhesión celular, transducción de señal de numerosos estímulos, control del ciclo celular y de la expresión génica (Mackay DJ, 1998). Las proteínas de la familia Rho se encuentran dentro de la familia de proteínas monoméricas, capaces de unir GTP, conocidas también como proteínas G de bajo peso molecular o proteínas de la superfamilia Ras. Se trata de una familia en expansión, de la que, en mamíferos, se conocen al menos diez miembros que desempeñan funciones clave para la biología celular.

La unión de agonistas a los receptores expuestos en la superficie de las plaquetas activan las proteínas Rho-GTPasas, que inducen cambios en las concentraciones de calcio citoplasmáticas, en la organización del citoesqueleto, en la agregación y en la secreción plaquetar (Bodie S, 2001). En términos generales, la actividad de las proteínas Rho se regula de forma cíclica mediante la unión de GTP, que conduce a su activación y su hidrólisis, que devuelve a la proteína a su estado inactivo. Este ciclo se produce gracias a la asistencia de proteínas auxiliares, que promueven el intercambio de nucleótidos unidos a proteína (factores intercambiadores de nucleótidos, conocidos como GEFs) o facilitan la actividad de GTPasa (conocidas como GAPs). Por último, existen proteínas que inhiben el intercambio de nucleótidos unidos a la proteína, con lo que estabilizan la forma inactiva (GDIs) (Geyer M, 1997).

Las proteínas Rho presentan dos formas: inactiva (citoplasmática) y activa (unida a membrana). En su forma activa, las proteínas Rho activan una de sus

dianas, la quinasa dependiente de Rho, RhoK, que a su vez, fosforila e inactiva la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, que promueve el ensamblaje de los filamentos de miosina y la contractilidad celular. RhoA es una proteína miembro de la superfamilia RAS de las proteínas de unión-GTP de la familia de las pequeñas Rho-GTPasas, proteínas regulatorias que están implicadas en la organización del citoesqueleto de actina, en la adhesión y en la migración celular. En concreto Rho promueve la formación de adhesiones focales y su anclaje a las fibras de estrés (Shimokawa H, 2001).

Agregación plaquetaria

Independientemente del estímulo que produzca la activación plaquetar, ésta está regulada en su vía final a través del receptor GPIIb/IIIa. La activación de la GPIIb/IIIa, derivada de un cambio conformacional, conlleva a que éste exponga los lugares de enlace para el fibrinógeno y el vWf, favoreciendo así la interacción plaqueta-plaqueta. El fibrinógeno es la proteína que se une mayoritariamente al receptor GPIIb/IIIa y su estructura dimérica permite su interacción con 2 plaquetas simultáneamente, llevando a la agregación plaquetar. De este modo, se produce una acumulación local de plaquetas que forman una masa expandible de tamaño creciente que continua reclutando más plaquetas a medida que éstas alcanzan el microambiente protrombótico. También se produce el reclutamiento de otras células hemáticas; con frecuencia se encuentran eritrocitos, neutrófilos y algunas veces monócitos, que llegan intactos a la zona de la lesión, pero responden a la presencia de los componentes de secreción de la plaqueta, incrementando la producción de sustancias protrombóticas. Finalmente, la masa trombótica se consolida bajo la acción de la trombina, pudiendo llegar a producir la oclusión parcial o total del vaso sanguíneo.

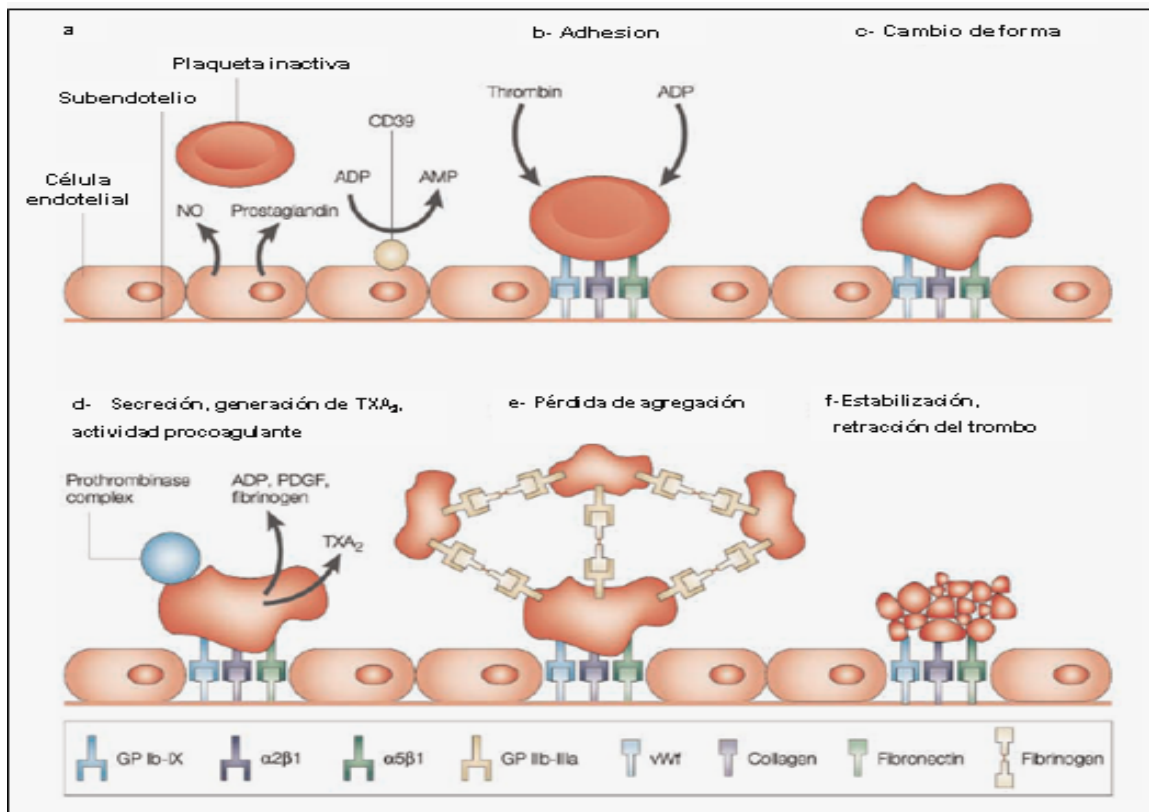


Figura 7. Diagrama de activación, adhesión y agregación plaquetaria en la formación del trombo. a) las plaquetas circulantes se mantienen en un estado inactivo por la acción de la prostaciclina y el NO, liberados por las CE vasculares. La CE también expresan CD39 que inhibe la activación plaquetaria convirtiendo el ADP, potente inductor de la activación plaquetaria, en AMP. b,c) en las zonas en las que la pared vascular está lesionada las plaquetas se adhieren al subendotelio expuesto mediante interacciones con el colágeno, el factor von Willebrand y la fibronectina y sus respectivos receptores en las plaquetas, integrina $\alpha 2\beta 1$, glicoproteína Ib-IX (GP Ib-IX) e integrina $\alpha 5\beta 1$. Tanto la trombina como el ADP inducen cambios conformacionales en las plaquetas y las vuelven activas. d) Las plaquetas activadas liberan ADP, PDGF y fibrinógeno de los gránulos de almacenaje y sintetizan TXA_2 . El ADP y el TXA_2 hacen que las plaquetas circulantes cambien de forma y se activen. e) Los receptores de la GPIIb/IIIa se exponen en las plaquetas activadas y se unen al fibrinógeno, favoreciendo la formación de puentes de fibrinógeno entre las plaquetas que resultan en la agregación final. Esto, junto con la formación de la malla de fibrina, producen el trombo plaquetario. f) La retracción posterior del trombo conlleva a la formación de un trombo estable (adaptado de R.P.Choudhury, *Nature Reviews* 2004).

COAGULACIÓN

La función fisiológica de la coagulación es prevenir las hemorragias, de manera que es un proceso que refuerza el tapón plaquetario mediante la formación de fibras insolubles de fibrina. La fibrina se forma a partir del fibrinógeno, que es soluble, por la acción de una enzima proteolítica, la trombina, que normalmente se encuentra en forma de protrombina. Ésta se activa a través del sistema de la coagulación que implica una serie de reacciones en cadena que integran zimógenos

(proteínas susceptibles de ser activadas a enzimas a través de una proteólisis limitada) y cofactores (activadores enzimáticos no proteolíticos).

Clásicamente en el mecanismo de la coagulación sanguínea se distinguían dos vías de activación: la *vía extrínseca*, que se iniciaba cuando el FT o tromboplastina tisular se exponían al plasma; y la *vía intrínseca*, que se activa por contacto con la superficie vascular erosionada, sin endotelio. Aunque inicialmente se pensó que eran vías independientes, hoy se sabe que varios enzimas interaccionan en los dos sistemas (Osterud B, 1990).

Aunque últimamente se resalta la preponderancia de la *vía del FT* (anteriormente denominada vía extrínseca), donde la expresión del FT constituye el más importante iniciador de la coagulación a través de la formación de un complejo con el factor VII. Todas las reacciones que se desencadenan cuando se activa la vía del FT se producen en la superficie de diferentes tipos celulares. Las plaquetas proveen la superficie más eficiente para la generación de trombina, por lo que el agregado plaquetario constituye una gran superficie procoagulante en la zona de lesión vascular. Además de las plaquetas, es necesaria la presencia de células o restos de membranas que expresen FT en su superficie para que pueda desarrollar todo el proceso (Monroe DM, 1994). De ahí la importancia de la ruptura de la placa y la exposición de su contenido a la circulación sanguínea.

FIBRINÓLISIS

Como en la mayoría de los sistemas fisiológicos, el sistema hemostático consiste en un delicado balance entre dos acciones contrapuestas. La función del sistema fibrinolítico consiste básicamente en degradar las mallas de fibrina y disolver el coágulo. Es un sistema complicado con muchos puntos de autorregulación en el que el enzima que degrada la fibrina es la plasmina. El plasminógeno (precursor de la plasmina) se encuentra totalmente inactivado y para su activación requiere del activador tisular del plasminógeno (t-PA) que lo activa con gran afinidad cuando ambas moléculas se encuentran enlazadas a la superficie de la fibrina para activarse. La plasmina, que se encuentra libre en el plasma, es rápidamente inactivada por α_2 -antiplasmina. El sistema fibrinolítico se regula

también mediante inhibidores específicos de los activadores del plasminógeno (PAI), como el PAI-1.

En resumen, el proceso de fisura y disrupción de una placa arteriosclerótica permite la entrada de sangre desde el lumen al núcleo de la placa con activación de las plaquetas y la cascada de coagulación, trombosis intraplaca (Davies MJ, 1996). Posteriormente, se forma un trombo con una gran cantidad de fibrina densamente empacada con plaquetas, que forma una mayor masa trombótica luminal expuesta a la sangre circulante, pero que no ocluye completamente la luz del vaso (Badimon L, 1988). La cantidad de trombo presente dependerá del flujo y de la fuerza de cizalladura ejercida en la zona lesionada y puede resultar en émbolos distales (Badimon L, 1988; Mailhac, 1994). La fase final del proceso es la oclusión total de la arteria por el trombo que crece por propagación.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ATEROTROMBOSIS

La restricción del flujo sanguíneo al miocardio puede ser causada por el estrechamiento que una placa aterosclerótica produce en una arteria coronaria. Si el diámetro de la arteria coronaria se ve reducido en más de un 50% se produce la isquemia y el paciente manifiesta dolor agudo en el pecho o tirantez (*angina pectoris*). De todas maneras una isquemia miocárdica no se acompaña siempre de dolor, es lo que llamamos *isquemia silente*. La ruptura y erosión de una placa coronaria resulta en la formación de un trombo, la composición de la placa, unida a la presencia de factores sistémicos con un efecto protrombótico, modulará tanto la estabilidad como el tamaño del trombo formado. Si el trombo es lábil, puede ser embolizado o desplazado por las fuerzas reológicas. Al desaparecer el trombo, desaparece la oclusión y también el dolor de pecho; pero la causa de la formación del trombo inicial está todavía latente y puede generar la formación de un nuevo trombo y un nuevo episodio de oclusión. Esta sucesión de episodios es la base etiopatológica del *síndrome de angina de pecho inestable* o el *infarto de miocardio sin onda Q*.

Según el tamaño del trombo o de la zona de miocardio dañada la actividad de bombeo del mismo corazón puede verse perjudicada o el ritmo cardíaco

enlentecido. Lo que resulta en un *fallo cardíaco congestivo* o, si fuera muy severo, en *muerte súbita*.

Si el trombo es embolizado puede viajar a través del árbol arterial hasta llegar a una arteria o capilar de menor calibre, donde puede llegar a ser totalmente oclusivo. Dependiendo de la localización de este trombo oclusivo, cerebral, carotídea o periférica, podría desencadenarse un *infarto cerebral*, un *ictus* o una *isquemia periférica*.

Si la rotura de la placa fuera mucho más grave, la lesión más trombogénica o el paciente presentara alguno o varios de los factores sistémicos protrómbicos, se formaría un trombo mucho más grande, pero más estable. Si este trombo fuese oclusivo podría dar origen a un *infarto agudo de miocardio* o incluso a la *muerte súbita* del paciente.

La presencia de la enfermedad aterosclerótica clínica en arterias no coronarias también conlleva un riesgo elevado de complicaciones cardiovasculares futuras, sobre todo de síndromes coronarios agudos.

Entre las formas no coronarias de afectación vascular por aterosclerosis se incluyen la *enfermedad arterial periférica*, el *aneurisma aórtico abdominal* y la *enfermedad arterial carotídea* (ataques isquémicos transitorios carotídeos, accidentes cerebrovasculares carotídeos u obstrucción de una arteria carotídea) (Norris JW, 1991).

APROXIMACIONES PREVENTIVAS DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

El tratamiento clínico y farmacológico de las ECV mediante el uso de fármacos hipolipemiantes, de agentes antiplaquetares y antitrombóticos y el uso de agentes antiisquémicos ha demostrado reducir la recurrencia de eventos coronarios agudos en pacientes con síndrome coronario agudo. Estudios clínicos con seguimiento angiográfico (Waters D, 1993; Buchwald H, 1992) han demostrado que la rápida estabilización de las placas coronarias está asociada con un buen pronóstico a largo tiempo. Las lesiones ateroscleróticas pueden estabilizarse, evitando su ruptura y posterior trombosis, con terapia antiaterogénica que incluye modificaciones en el estilo de vida y en los lípidos plasmáticos (estudio MAAS,

estudio 4S). La presentación epidémica de las ECV está estrechamente asociada con hábitos de vida y factores de riesgo modificables. Se ha demostrado de forma inequívoca que la modificación de los factores de riesgo reduce la mortalidad y la morbilidad, especialmente en personas con ECV, diagnosticada o no. El mejor tratamiento que puede hacerse actualmente para proteger la salud de los ciudadanos es la prevención para evitar que la población continúe enfermando.

El objetivo global que persigue la prevención de las ECV tanto en pacientes con ECV establecida o población general, a riesgo o no, es el mismo:

“reducir el riesgo de los principales eventos cardiovasculares (enfermedad coronaria, ictus isquémico y/o enfermedad arterial periférica) y así reducir la discapacidad y morbilidad prematura y prolongar la supervivencia y calidad de vida”.

Las guías que la Unión Europea (De Backer G, 2003) propone para la prevención de las ECV en la práctica clínica están dirigidas principalmente a sujetos con elevado riesgo cardiovascular, pero deben ser complementadas con estrategias dirigidas a toda la población general con el ánimo de reducir la incidencia de eventos clínicos coronarios.

ESTRATEGIAS DE POBLACIÓN

Estas estrategias no están dirigidas a reducir la incidencia de las ECV mediante el tratamiento farmacológico de cada individuo, sino que tienen por objeto los determinantes sociales y económicos de la enfermedad mediante acciones políticas (educación sanitaria, recomendaciones generales, medidas políticas sobre alimentación, etc.). Una buena estrategia de prevención en la población puede ser tan exitosa como la que se hizo en Finlandia (Pekkanen J, 1995) consiguiendo, a través de la educación sanitaria y el etiquetaje de alimentos, una reducción del colesterol en toda la población. También en la isla Mauricio se ha conseguido el cambio de aceite de palma por aceite de soja en la cocina (WHR, 2003). Son estrategias de prevención primaria destinadas a lograr cambios en el estilo de vida, como el cambio a una dieta más sana, evitar el abuso de alcohol,

reducir el consumo de tabaco, aumentar el número de personas que hacen ejercicio físico, etc.

Tal vez el beneficio de estas políticas no sea importante para individuos concretos que acumulen factores de riesgo o tengan elevado un determinado factor de riesgo severo, pero los beneficios en toda la población pueden ser muy amplios.

ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN

Los pacientes con ECV declaradas tienen un alto riesgo de sufrir posteriores eventos vasculares. Por ello requieren intervenciones más intensas sobre los hábitos de vida y tratamiento farmacológico adecuado.

En sujetos asintomáticos aparentemente sanos, las intervenciones preventivas deben guiarse por el grado de riesgo cardiovascular. Se debe identificar a los individuos de mayor riesgo y plantearles cambios de estilos de vida más estrictos y, cuando sea adecuado, fármacos.

El tratamiento preventivo secundario está dirigido en primer lugar a pacientes con ECV clínicamente establecida, luego a pacientes aparentemente sanos, pero con elevado riesgo de sufrir ECV porque tienen varios factores de riesgo o presentan alguno de ellos de forma severa o sufren diabetes. También son objeto de prevención secundaria los familiares de los pacientes que han sufrido ECV y los pacientes de atención primaria a los que en la exploración rutinaria se les detecta algún factor de riesgo.

Las *Guías Europeas Para La Prevención De La Enfermedad Cardiovascular En La Práctica Clínica* recomiendan el manejo y modificación de varios factores de riesgo: cambios en la dieta, control de la dislipemia, control y prevención del tabaquismo, control y tratamiento de la conducta, gestión de la actividad física, control de la hipertensión arterial, tratamiento en pacientes diabéticos, tratamiento en pacientes con síndrome metabólico y terapia farmacológica profiláctica. Aunque nos centraremos solamente en dos por ser objeto de esta tesis: los efectos de la dieta y el control de la hiperlipemia con estatinas.

Importancia de la nutrición en la prevención cardiovascular

Las modificaciones dietéticas son la primera estrategia en la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. La influencia que los alimentos ejercer sobre la enfermedad cardiovascular es un hecho que quedó constatado con el estudio de Keys (Keys A, 1970) más conocido como el "Estudio de los Siete Países". En este estudio se observó que la ingesta de grasas, sobre todo grasas saturadas, estaba fuertemente relacionada ($r^2=0,73$) con las tasas de incidencia de enfermedad coronaria en un seguimiento de entre 10 y 20 años. De este trabajo se resume que las grasas saturadas elevan los valores plasmáticos de colesterol total, especialmente cLDL, y ya hemos visto cómo el aumento de la concentración sanguínea de LDL favorece el desarrollo de la aterosclerosis. Pero el estudio de Keys también permitió identificar dos perfiles dietéticos en los países occidentales: el de los países mediterráneos (Grecia, Italia, España y Portugal) y el de los países norte y centro europeos (Finlandia, Noruega, Irlanda y Reino Unido). La disminución en la incidencia de enfermedad cardiovascular para los países del sur (incluyendo Francia) respecto a los del norte se puede explicar mediante las diferencias nutricionales entre ellos.

La llamada *Dieta Mediterránea* no constituye una dieta única, sino un conjunto de dietas que comparte fundamentalmente dos características: el aporte de macronutrientes a la ingesta calórica total (30-35% de grasas, 53-58% de hidratos de carbono y 10-12% de proteínas) y la calidad de las grasas ingeridas (15-20% de ácidos grasos monoinsaturados, 7-10% de ácidos grasos saturados y 6-8% de ácidos grasos poliinsaturados). Los alimentos que constituyen esta dieta Mediterránea (frutas, verduras, pescado, frutos secos, legumbres, vino y el uso regular de aceite de oliva como fuente de grasas) se asocian de forma inversa con la aparición y progresión de cardiopatía isquémica (Esposito K, 2004). Los efectos beneficiosos que estos alimentos pueden ejercer sobre la salud cardiovascular son diversos y la adherencia a este patrón dietético se asocia con menor riesgo de infarto de miocardio y mortalidad cardiovascular (Trichopoulou A, 2003; Martínez-González MA, 2002). Los estudios intervencionales se han centrado en demostrar los efectos pleiotrópicos del aceite de oliva, componente más característico de la dieta Mediterránea. Y han demostrado que el consumo de aceite de oliva regula el

equilibrio oxidante/antioxidante (Weinbrenner T, 2004; Marrugat J, 2004), disminuye los lípidos plasmáticos y la presión arterial, tiene efectos antiinflamatorios, previene de la ruptura de la placa y la trombosis, y confiere protección frente a las arritmias malignas y fallo cardíaco (Pérez Jiménez F, 2002).

La adhesión a la dieta Mediterránea y a un estilo de vida saludable realizando actividad física regular, evitando el tabaco y con un consumo moderado de alcohol (fundamentalmente vino tinto) se asocia con una reducción de la mortalidad global del 50% (Knoops KT, 2004) y una reducción del 82% de los acontecimientos coronarios (Stampfer MJ, 2000).

Respecto al consumo de alcohol en la salud cardiovascular estudios epidemiológicos han sugerido la existencia de una correlación inversa entre el consumo moderado de alcohol y la mortalidad total (Rimm E, 1992). Se ha encontrado una asociación en forma de *J* o de *U* entre el consumo de alcohol y la mortalidad total. Esta evidencia epidemiológica muestra que un consumo moderado de alcohol resulta beneficioso en la protección frente a las enfermedades cardiovasculares y un exceso produce efectos negativos a nivel cardiovascular, como taquiarritmias, hipertensión, miocardiopatía y fibrosis (Preedy VR, 1993). En muchos estudios prospectivos y de cohorte (Framingham Study, Honolulu Heart Study) se afirma que los consumidores moderados de alcohol manifiestan una reducción entre un 30% y un 50% del riesgo de enfermedad cardiovascular respecto a los abstemios o los grandes bebedores. Esta dualidad de los efectos del alcohol (beneficiosos respecto a indeseables), debida en parte a la dosis consumida, ha suscitado también el interés de los investigadores en estudiar los efectos de diferentes tipos de bebidas alcohólicas y de sus componentes no-alcohólicos. De hecho, varios estudios epidemiológicos han sugerido una fuerte asociación negativa entre el consumo de vino (1-2 vasos/día) y el riesgo de cardiopatía isquémica (Rimm E, 1992; Stampfer MJ, 1988). Estudios comparativos de cohortes internacionales demuestran una menor mortalidad cardiovascular en las poblaciones que habitualmente consumen vino respecto a las que consumen otro tipo de bebidas alcohólicas (St. Leger AS, 1979)

El vino tinto ha demostrado inhibir *ex vivo* la oxidación de las LDL aisladas de voluntarios sanos, incubadas con vino y oxidadas *in vitro* (Kondo K, 1994) y en LDL aisladas de voluntarios sometidos a dieta de ingesta alcohólica durante 2-4

semanas (Whitehead TP, 1995). También afirman reducir la susceptibilidad del plasma humano a la peroxidación lipídica (Furhman B, 1995; Serafini M, 1998), y elevar los niveles plasmáticos de HDL y apolipoproteína A-I (Lavy A, 1994). En todos estos estudios la administración de vino blanco o de etanol puro no mostró ningún efecto protector.

En lo que concierne a la aterogénesis existen evidencias clínicas y epidemiológicas de que el vino, a dosis bajas, produce reducción de la ateromatosis coronaria (Reed D, 1991) y de la ateromatosis carotídea (Kielch S, 1994). El alcohol también induce cambios en factores trombóticos tales como inhibición de la agregación de las plaquetas (agregometría *in vitro*), la disminución de la concentración de factor VIII, del factor VIII-von Willebrand (estudio ARIC) y del fibrinógeno plasmático (Pellegrini N, 1996). Por otra parte, la acción del alcohol sobre el flujo coronario ofrece resultados experimentales conflictivos (aumento, disminución o no modificación) dependiendo de las dosis de alcohol administradas y de las condiciones experimentales (Demrow HS, 1995). Estudios realizados con hamsters y conejos de experimentación hiperlipémicos afirman que el vino tinto reduce el área de la placa formada (daLuz PL, 1999).

Cabe pensar que no es única o necesariamente el alcohol que contiene el vino el responsable de que exista una menor agregabilidad de las plaquetas en quienes lo consumen. Puesto que hay estudios comparativos de agregación plaquetaria *in vitro* en los que se obtiene el mismo porcentaje de disminución con una cantidad de vino que contiene menos alcohol que el control. Lo que lleva a presuponer un efecto antiagregante debido a los componentes no alcohólicos del vino. En un modelo experimental estandarizado de estenosis y abrasión endotelial coronaria, aplicado a perros, se ha observado que el vino tinto en mayor grado, también el mosto, aunque en menor grado y no el vino blanco disminuían los ciclos de interrupción del flujo sanguíneo coronario provocado por trombos plaquetarios (Demrow HS, 1995). Los investigadores concluyeron que los polifenoles presentes en el vino tinto y en el mosto, pero ausentes en el vino blanco, tales como: fitoalexinas y flavonoides (los cuales poseen efectos inhibitorios de las plaquetas *in vitro*) ejercen una inhibición de la agregación de las plaquetas *in vivo*. El alcohol puro también inhibe la función plaquetar, pero se necesitan concentraciones altas

en sangre, muy superiores a las que se obtuvieron administrando vino en solución salina intravenosa (Demrow HS, 1995)

Los consumidores moderados de cerveza y licores del estudio Caerphilly en Gales (Gran Bretaña) muestran una disminución de la agregabilidad plaquetaria a la estimulación con trombina (Renaud S, 1992), pero pasadas las 12 horas de ayuno, previo a los análisis, las plaquetas presentan hiperagregabilidad. Este fenómeno de rebote no se presenta en los granjeros franceses, bebedores de vino (Renaud S, 1978) lo que sugeriría que son los polifenoles presentes en el vino los que reducen la agregabilidad de las plaquetas.

Recientemente un estudio epidemiológico danés ha relacionado a los consumidores de vino tinto con la ingesta de una dieta más saludable (fruta, verdura, aceite de oliva, pescado, etc.) y cardioprotectora que la consumida por los bebedores de cerveza (Johansen D, 2006).

Resumiendo, podemos afirmar que:

- Hay claras evidencias epidemiológicas del efecto beneficioso que dosis pequeñas-moderadas de alcohol (especialmente vino tinto) ejercen sobre la cardiopatía isquémica.
- Clínicamente el alcohol, especialmente a dosis elevadas y/o excesivas, puede producir alteraciones cardíacas y un aumento de la mortalidad, principalmente de las muertes violentas.
- La lesión ateromatosa, sustrato patológico fundamental de las ECV, tiene unos mecanismos de formación y presentación de complicaciones trombóticas complejos que el alcohol y más concretamente el vino tinto, pueden modificar.

Los mecanismos subyacentes a las interacciones entre el vino tinto, la lesión ateromatosa y la formación y regulación del trombo, deben ser investigados con distintos abordajes para esclarecer los posibles mecanismos de prevención de las ECV.

Efectos de las estatinas en la prevención cardiovascular

Múltiples estudios angiográficos y clínicos han demostrado que el uso de fármacos hipolipemiantes (estatinas, fibratos, ácido nicotínico, etc.,) inhiben la progresión de la aterosclerosis, reducen los infartos de miocardio y los eventos coronarios.

De entre estos fármacos las estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa) (Figura 8) han demostrado ser fármacos seguros, fáciles de usar y se han convertido en los más recetados para disminuir el colesterol plasmático y con ello favorecer la estabilización y regresión de la placa aterosclerótica.

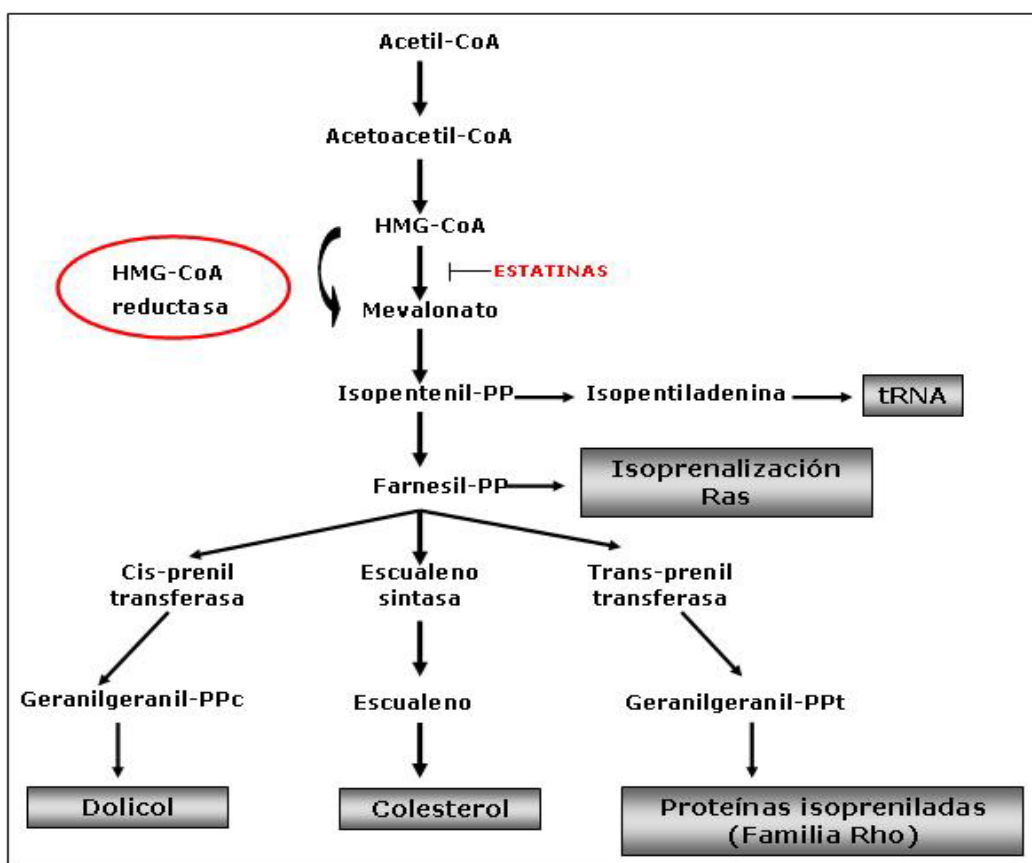


Figura 8. Vía de síntesis del colesterol. A partir del mevalonato y por acción de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, se sintetiza de manera endógena colesterol. El colesterol también puede provenir del ingerido en la dieta, que es transportado por las LDL e incorporado a la célula a través del receptor de LDL. La HMG-CoA reductasa puede inhibirse por el efecto de las estatinas y por un mecanismo de retroalimentación negativa del colesterol.

Los resultados clínicos han demostrado que los beneficios terapéuticos obtenidos con el uso de las estatinas superan el esperado por la reducción en los

niveles de colesterol plasmático, lo que sugiere que sus beneficios pueden ser independientes al efecto hipolipemiante. Estos efectos independientes o pleiotrópicos de las estatinas explicarían la temprana eficacia clínica de estos fármacos (en tres meses desde el inicio del tratamiento), tanto en prevención primaria (estudios MIRACL, WOSCOPS, CARE) como secundaria (4S; Cannon CP, 2004), a pesar de que los cambios en la placa aterosclerótica requieren de uno a dos años de tratamiento.

Las estatinas incrementan la biodisponibilidad del NO (Dupuis J, 1999) mediante el aumento de la eNOS, disminución del estrés oxidativo, aumento del PAI e inhibiendo la endotelina-1, potente vasoconstrictor. También mejoran la función endotelial mediante su efecto antioxidante. Las estatinas han demostrado atenuar la proliferación vascular inhibiendo las proteínas de unión GTP, Ras y Rho (Crespo J, 2005) y reduciendo la proliferación inducida por PDGF de las CML vasculares (McFarlane SI, 2002; Takemoto M, 2001). Las estatinas se han visto implicadas en la reducción de la inflamación asociada a la aterosclerosis mediante inhibición de moléculas de adhesión (Sparrow CP, 2001) y reducción de la acumulación lipídica en las CML (Llorente-Cortes V, 1998). Estudios con animales hiperlipémicos han demostrado que las estatinas modulan la respuesta plaquetaria, el desarrollo aterosclerótico (Alfon J, 1999a y 1999b; Martínez-González J, 2001) y reducen el potencial trombótico de la pared vascular (Camera M, 2002) resultando en la reducción de la formación del trombo (Dangas G, 1999).

Desde el descubrimiento de los primeros inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas), la investigación farmacéutica ha evolucionado produciendo diferentes compuestos: mevastatina, lovastatina (producto natural), simvastatina (derivado semisintético de la lovastatina), pravastatina (bioderivado de la mevastatina), fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina y rosuvastatina (todas de origen sintético). Todas estas estatinas producen un efecto cualitativamente similar en el perfil lipídico, entre un 35 y 55% de reducción del cLDL a las dosis máximas recomendadas.

Probablemente los efectos pleiotrópicos tienen lugar gracias al efecto de las estatinas sobre otros órganos diferentes al hígado, y se encuentren relacionados con la biodisponibilidad del fármaco, la permeabilidad de la membrana y la potencia de los metabolitos activos (Lennernans H, 1997).

Entre las estatinas, la pravastatina ha demostrado repetidamente producir beneficios clínicos y mejorar la supervivencia en prevención primaria (WOSCOPS) y secundaria (CARE). Y aunque su efecto hipolipemiante es menor que el de la atorvastatina, su seguridad es similar a la del placebo y su amplia utilización en pacientes requiere una investigación de sus posibles efectos pleiotrópicos. Lacoste *et al.* (Lacoste L, 1995) demostró que reduciendo la hiperlipidemia con pravastatina en pacientes hipercolesterolemicos con enfermedad coronaria estable el riesgo trombótico también disminuía. Pero en los estudios clínicos existe la dificultad de separar los efectos relacionados con la disminución de lípidos con las respuestas no relacionadas (Palinski W, 2001). Se deben evaluar los efectos de la pravastatina en la prevención del riesgo trombótico independientemente de sus resultados hipolipemiantes y confirmar así su uso beneficioso en la prevención de las ECV. Es por ello que se necesita un modelo que permita no disminuir el aporte externo de colesterol, al contrario de lo que sucede en pacientes que modifican su dieta a la par que reciben tratamiento.

El estudio de la pravastatina en el modelo porcino de hiperlipemia inducida por la dieta nos permitirá conocer si los efectos antitrombóticos se deben a una reducción de los lípidos plasmáticos o se trata de uno de los llamados efectos pleiotrópicos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipercolesterolemia es cada vez más prevalente en nuestra sociedad y constituye un factor de riesgo importante en la aparición de la enfermedad isquémica y la mortalidad coronaria. No sólo aumenta la generación de LDLox, facilitando su captación por los macrófagos, sino que aumenta la reactividad de las plaquetas circulantes incrementando el riesgo protrombótico. La hipercolesterolemia activa las plaquetas y aumenta la síntesis de TXB₂ in vitro. Y es sabido que las plaquetas tienen un papel fundamental en los procesos trombóticos, sus manifestaciones clínicas y en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica.

La reducción del colesterol plasmático disminuye el riesgo de eventos agudos coronarios ya sea estabilizando la placa aterosclerótica (reduce el contenido lipídico y por tanto la vulnerabilidad), mejorando la función endotelial o reduciendo la trombosis plaquetaria. Las primeras estrategias empleadas en la reducción del cLDL son la modificación de la dieta y el tratamiento con fármacos hipolipemiantes.

La eficacia de las estatinas en la reducción de los eventos cardiovasculares se produce de forma rápida, en algunos ensayos clínicos detectándose a los 30 días después de iniciado el tratamiento. Dicha mejora clínica no se explica mediante cambios en la placa aterosclerótica. Es nuestra hipótesis que las estatinas ejercen sus efectos beneficiosos por mecanismos adicionales a la reducción de los niveles circulantes de colesterol, uno de los cuales es la inhibición de la respuesta plaquetaria a sustratos trombogénicos.

A pesar de los grandes avances en el tratamiento de la enfermedad coronaria que permiten una mayor supervivencia de los afectados, en los próximos años continuará siendo la primera causa de mortalidad en los países industrializados. Es necesario realizar un esfuerzo en la prevención de la aparición de la enfermedad y continuar investigando en qué estrategias preventivas son eficaces y por qué. Es nuestra hipótesis que el estudio mecanístico de los efectos de una ingesta moderada de vino tinto aportará mayor conocimiento para una futura prevención.

Los objetivos de esta tesis se han dirigido a determinar la eficacia de las dos estrategias principales de prevención de la hipercolesterolemia (dieta y fármacos) en la regulación del riesgo trombótico en un estado de hipercolesterolemia inducida.

En concreto, son hipótesis de esta tesis que:

1- El consumo moderado y diario de vino tinto reduciendo el riesgo trombótico contribuye a la reducción de eventos cardiovasculares que existen en condiciones de hipercolesterolemia como las inducidas por una dieta con elevado porcentaje de grasas saturadas.

2- La pravastatina contribuye a la reducción de eventos cardiovasculares mediante la reducción de la trombogenicidad por mecanismos independientes a la disminución del colesterol plasmático.

OBJETIVOS

1- Estudiar las propiedades antitrombóticas del consumo de vino tinto y de la administración de pravastatina, en el modelo porcino, utilizando el sistema de perfusión con cámaras ex vivo, que permite obtener distintos niveles de riesgo trombótico, modelando diferentes patrones de riesgo en la cardiopatía isquémica (distintas velocidades de flujo).

2- Evaluar los posibles mecanismos moleculares de acción de ambas estrategias sobre las plaquetas.

3- Evaluar el efecto de ambas estrategias en la pared vascular y caracterizar el trombo formado sobre el sustrato vascular perfundido.

MÉTODOS

MÉTODOS

INDUCCIÓN DE HIPERCOLESTEROLEMIA

Los estudios presentados en esta tesis se han realizado utilizando el modelo porcino de hipercolesterolemia inducida por la dieta. El cerdo es un buen modelo de estudio ya que desarrolla lesiones ateroscleróticas de manera espontánea. Tiene muchas similitudes con la especie humana, incluyendo el tamaño y la distribución de las arterias, localización del engrosamiento de la íntima en estado normal, distribución de las lipoproteínas plasmáticas y respuesta a las dietas hiperlipémicas (Kim DN, 1984).

La dieta ofrecida a los animales durante noventa días para inducir y mantener la hipercolesterolemia es una dieta rica en colesterol según el perfil de la ingerida en los países industrializados. El pienso se formula conteniendo 20% de grasas saturadas añadidas (sebo de ternera), 2% de colesterol y 1% de ácido cólico que facilite la absorción de los lípidos y los nutrientes necesarios para el crecimiento del animal.

COMPOSICIÓN	NORMOCOLESTEROLÉMICA	HIPERCOLESTEROLÉMICA
Materia Seca	89.90± 0.59	86.15 ± 1.52
Proteína	22.04 ± 1.7	20.06± 0.11
Carbohidratos	50.24 ± 2.5	29.84 ±1.47
Grasa	3.83 ± 0.54	24.55 ± 0.21
Fibra	5.66 ± 0.35	5.20 ± .012
Minerales	8.13 ± 0.44	5.81 ± 0.18

Tabla 4. Composición, en porcentaje, de las dietas ofrecidas a los animales.

EVALUACIÓN DEL RIESGO TROMBÓTICO

Estudios de formación de trombo mural en condiciones controladas de flujo.

Para evaluar el efecto antitrombótico del vino tinto y de la pravastatina se ha estudiado la deposición plaquetar, desencadenada tras perfundir sustratos vasculares homólogos en una cámara de perfusión cilíndrica o reactor de flujo (Badimon L, 1987). El flujo de esta cámara de perfusión es paralelo y parabólico en todo el recorrido. La velocidad de cizalladura (γ) con la que la sangre circulante roza la pared arterial (montada en la cámara) en el interior de la cámara depende directamente de la velocidad de la sangre (V) e inversamente del diámetro de la cámara (d) según la siguiente fórmula:

$$\gamma = 8 \times V/d$$

Con el fin de cuantificar el número de plaquetas que se depositan, se aísla previamente una muestra de plaquetas de la sangre del animal, se marcan con un isótopo radiactivo ($^{111}\text{Indio-oxina}$) y se reinyectan al animal. Entre 18 y 24 horas tras el marcaje radiactivo se considera que las plaquetas marcadas y reinyectadas se han distribuido uniformemente por el cuerpo del animal.

Sustratos vasculares

La pared vascular de la aorta torácica porcina es la que se utiliza como desencadenante de la deposición plaquetar (trombo). Se han utilizado dos modelos de lesión arterial: lesión ligera que tiene una reducida trombogenicidad e induce poca deposición plaquetaria y lesión severa, mucho más trombogénica que la anterior e induce una gran deposición de plaquetas en su superficie.

Las aortas de cerdo se han obtenido de mataderos locales recogidas en tampón PBS en el momento del sacrificio de los animales. Tras limpiarlas y eliminarles parte de la adventicia se congelan a 20°C. El día del estudio de perfusión se descongelan a temperatura ambiente en tampón PBS y se cortan en segmentos de aproximadamente 3 cm de largo, se abren longitudinalmente y se cortan en segmentos de 1 cm de ancho. De esta manera una vez colocados los sustratos dentro de la cámara la sangre circulará sobre ellos en la misma dirección

y en el mismo sentido en el que circulaba la sangre a través de la aorta en el animal vivo.

El modelo de lesión ligera se obtiene tras congelar y descongelar la arteria con lo que el endotelio se destruyen y queda expuesto el subendotelio. El sustrato con lesión severa se obtiene separando mecánicamente el subendotelio y exponiendo la túnica media del vaso.

Marcaje de plaquetas

El Indio (In^{111}) se emplea de forma habitual para el marcaje radiactivo de plaquetas (Hawker RJ, 1978) y otras células sanguíneas, como leucocitos (Doherty PW, 1978) y granulocitos (Weiblen BJ, 1979). En este trabajo se ha utilizado la oxina como quelante transportador del ^{111}In . El marcaje de células aisladas con ^{111}In se consigue incubando una solución de ^{111}In -oxina con las células; este complejo, que es lipófilo, atraviesa la membrana celular. Posteriormente, se produce una reacción en la oxina, de modo que ésta se libera y el ^{111}In queda firmemente enlazado a proteínas intracelulares (Thakur ML, 1977). El marcaje de plaquetas autólogas se realiza entre 18 y 24 horas antes del experimento de trombosis, para permitir una completa biodistribución de las plaquetas marcadas. Las plaquetas marcadas se re-inyectan al animal en las 2 horas posteriores a su extracción. El procedimiento del marcaje queda explicado en la metodología de los artículos.

Determinación de la deposición plaquetaria

En los trabajos presentados se han empleado dos tipos de cámaras de perfusión para obtener las velocidades de flujo deseadas, 212 s^{-1} (velocidad baja, típica de arterias coronarias ligeramente estenosadas) y 1690 s^{-1} (velocidad alta, modelo de arterias coronarias estenosadas) En el estudio con pravastatina se ha empleado un reactor de flujo (cámara) de segunda generación; cámara que permite una velocidad de cizalladura (γ) de 212s^{-1} con estenosis del 70% en la zona central (Badimon L, 1991).

Diámetro del canal (cm)	Área del canal (cm ²)	Velocidad del flujo (mL/min)	Velocidad de la sangre (cm/s)	Velocidad de cizalladura (1/s)
0,2	50	10	5,3	212
0,1	25	10	21,2	1690

Tabla 5. Dimensiones y propiedades reológicas de las cámara de perfusión empleadas.

El sustrato vascular (10 x 30 mm) se coloca en el interior de la cámara y ésta se coloca en un baño a 37°C. Posteriormente, la cámara se conecta mediante tubos de silicona y polietileno a la arteria carótida y a una bomba peristáltica. La sangre sale impulsada por la bomba a velocidad constante y pasa primero por la cámara; a continuación se recircula al animal por la vena yugular. Antes y después de perfundir la sangre, se perfunde el sustrato con PBS (60 y 30 segundos) con el fin de limpiar y eliminar aquellas células que no estén firmemente adheridas a la superficie vascular (Figura 9).

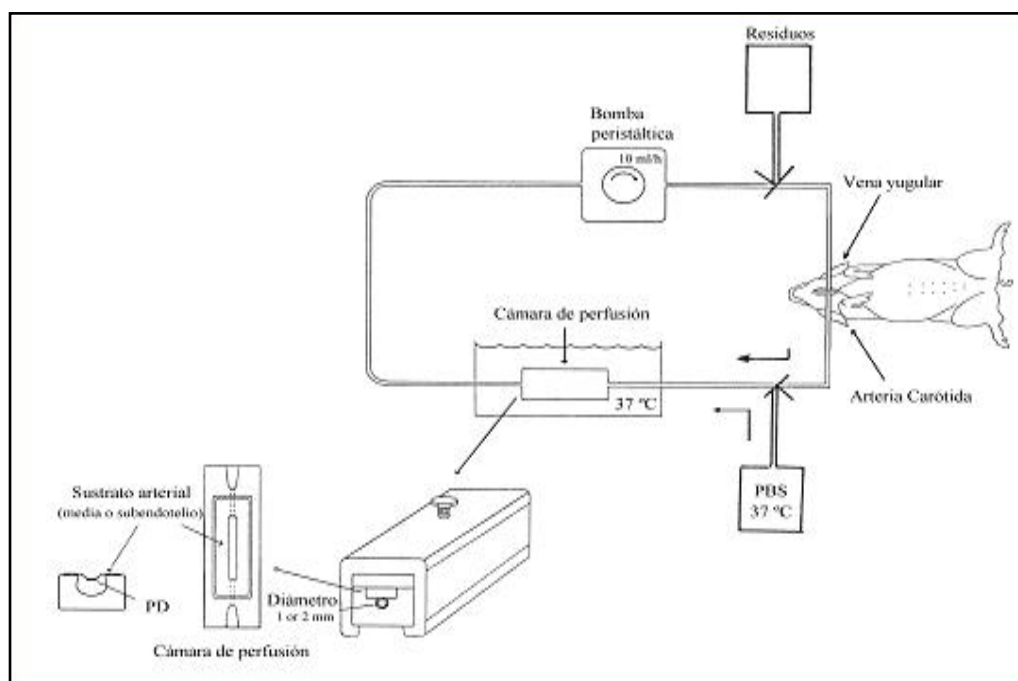


Figura 9. Representación esquemática de la cámara de perfusión y del circuito extracorpóreo utilizado en el modelo porcino.

Una vez finalizada la perfusión, se fijan los sustratos en paraformaldehído 4% y se determina la radiactividad presente en el sustrato mediante un contador de radiactividad gamma. Periódicamente, se toman muestras de sangre en las que se determina el número de plaquetas (plaquetas/mL), la radioactividad específica

(cpm/mL) y el porcentaje de lisis de las plaquetas. La lisis de plaquetas permite determinar cambios en los niveles de radiactividad unida a plaqueta. Para ello, se centrifuga un pequeño volumen de sangre (500 μ L) durante 15 minutos a 6000 rpm y se separa el sobrenadante del precipitado. Posteriormente se calcula la proporción de plaquetas no lisadas como:

$$\text{Lisis (\%)} = (\text{cpm pellet} / (\text{cpm pellet} + \text{cpm del sobrenadante})) \times 100$$

El recuento radioactivo de los sustratos se normaliza teniendo en cuenta la radiactividad en sangre y el número de plaquetas; si conocemos el número de plaquetas (plaquetas/mL) y la actividad en sangre (cpm/mL) podemos normalizar la radioactividad por plaqueta (plaquetas/cpm).

ARTÍCULO I: "MODERATE DAILY INTAKE OF RED WINE INHIBITS MURAL THROMBOSIS AND MONOCYTE TISSUE FACTOR EXPRESSION IN AN EXPERIMENTAL PORCINE MODEL". *Circulation*. **2004** **FI=11.165**

Moderate Daily Intake of Red Wine Inhibits Mural Thrombosis and Monocyte Tissue Factor Expression in an Experimental Porcine Model

L. Casani, MS; E. Segales, MS; G. Vilahur, MS;
A. Bayes de Luna, MD, PhD, FESC; L. Badimon, PhD, FESC

Background—Moderate consumption of red wine has been epidemiologically associated with a reduction in cardiovascular disease, but its mechanism of action is not fully understood. The objective was to study whether the protective effects of a daily intake of red wine (Tempranillo, 12.8% alcohol vol/vol) could be related to inhibition of thrombosis in an experimental model of diet-induced hyperlipemia.

Methods and Results—For 100 days, animals were fed a western-type proatherogenic diet containing 2% cholesterol and 20% saturated fat. Three doses of red wine were studied (20, 30, and 40 g wine-ethanol/d) and compared with placebo-control animals not taking any wine. Thrombosis under flow conditions was evaluated by radioisotopic quantification of deposited platelets on damaged arteries. Changes in RhoA translocation in platelets and monocyte tissue factor expression were also analyzed. Mural platelet deposition was significantly reduced in animals ingesting red wine with their food. Expression of RhoA in the platelet cytoplasm (inactive form) was increased in wine-fed animals. Tissue factor mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes was reduced in wine-fed animals. Total cholesterol levels were not significantly different among groups.

Conclusions—Moderate red wine intake significantly reduces platelet deposition triggered by damaged vessel wall, partially explained by inhibition of RhoA translocation to the platelet membrane. Hence, a daily moderate intake of wine seems to inhibit different pathways that converge in a reduced thrombotic risk on vessel wall injury. (*Circulation*. 2004; 110:460-465.)

Key Words: wine ■ thrombosis ■ cardiovascular disease ■ tissue factor

Coronary heart disease (CHD) is the leading cause of death in the adult population in developed countries. The cardiovascular benefits of red wine consumption have been reported by different epidemiological studies.¹ Moderate alcohol drinkers have lower CHD mortality than nondrinkers or binge drinkers. It has also been described that the French population has lower cardiovascular mortality than expected despite its high ingestion of saturated fats, which has been called the French paradox.² The mechanisms to produce these beneficial effects are not clearly understood. A decrease in LDL-particle oxidation,³ an increase of HDL cholesterol, a favorable change in plasma lipid profile,⁴ a reduction of in vitro platelet aggregation,⁵ or an anti-inflammatory action⁶ have been proposed as candidate mechanisms.

Thrombosis on atherosclerotic lesions is the major cause of clinical presentation of acute coronary syndromes, and although *ex vivo* platelet aggregation has been used as a surrogate marker and indicates platelet activation, it does not properly indicate thrombosis because it uses Ca²⁺-depleted

blood. The effects of wine on mural thrombosis triggered by a thrombogenic vessel under characterized flow conditions have not yet been analyzed. Therefore, the objective of our study was to investigate whether red wine intake with a controlled hyperlipemic western-type diet could reduce thrombotic risk in a standardized flow model, using the Badimon perfusion chamber and mimicking the thrombotic risk elicited by acute plaque rupture and exposure of pro-thrombotic surfaces to platelets. We have hypothesized that red wine may exert a cardioprotective effect by inhibiting thrombosis and platelet activity and found that moderate intake of red wine induces significant inhibitory effects on mural thrombosis triggered by damaged vessel wall.

Methods

Animal Model and Experimental Design

A total of 22 male, white commercial fixed-breed pigs (final weight, 97.83±0.88 kg) were used in this study. Animals were fed a western-type atherosclerotic diet, rich in saturated fatty acids (20%

Received January 9, 2004; revision received March 10, 2004; accepted March 22, 2004.

From the Cardiovascular Research Center, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Institut Català de Ciències Cardiovasculars, Hospital Santa Creu i Sant Pau, UAB, Barcelona, Spain.

Correspondence to Prof L. Badimon, Cardiovascular Research Center, Avda. Sant Antoni Maria Claret No. 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail lbmucv@cid.csic.es

© 2004 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/01.CIR.0000136027.98303.4D

TABLE 1. Analysis of Red Wine Composition According to Manufacturers

Parameter	Value
Alcohol degree	12°87
Density	994
Tannins (including catechines), g/L	3.36
Anthocyanins, ppm	448
Resveratrol, ppm	1.75

beef tallow) and cholesterol (2% cholesterol), for 100 days. Animals were housed individually, and water was provided ad libitum.

In a preliminary study, a group of animals (group A) received a daily moderate dose of wine (30 g wine-ethanol/d) and were compared with a control group (group B). After completion of this first study, results led to a second experimental design assaying 2 different doses of wine. Animals were divided into 3 groups: group HD, receiving a moderate dose of wine equivalent to 40 g wine-ethanol/d; group LD, a low dose, 20 g wine-ethanol/d; and group HL, the hyperlipemic placebo control.

Red Tempranillo wine was provided by the Foundation for Wine Research (Table 1). Red wine was administered once a day with the daily chow (2.5% body weight). Animals were weighed individually weekly, and daily chow and wine-ethanol dose were calculated. The last wine dose was administered 24 hours before the thrombosis assay.

A third and final study was performed to analyze the thrombotic response of acute ingestion of red wine in normolipemic animals. Two pigs (60 kg body weight) were fed 1 single dose of red wine (40 g wine-ethanol) with chow intake just before the perfusion experiment, and another 2 pigs were fed only commercial chow.

All procedures followed in the study were in accordance with the American Heart Association guidelines for experimental research and were approved by the Ethical Committee of the local government.

Perfusion Chamber

At the end of the experimental period, thrombotic risk was assessed by exposure of blood from studied animals to a thrombus-triggering damaged artery in the previously validated and standardized Badimon perfusion chamber.⁷ After an overnight fasting, animals were tranquilized (8 mg/kg Stressnil, Esteve) and anesthetized (5 mg/kg pentobarbital, Braun Medical), and a carotid artery–jugular vein shunt was established to place the Badimon perfusion chamber.⁸ Blood was perfused through the chamber for 3 and 5 minutes and at 2 different shear rates of 212 s⁻¹ and 1690 s⁻¹ typical of patent or mildly stenotic coronary arteries. Homologous porcine vessel wall with 2 types of damage, severe (ruptured vessel wall) and mild (eroded vessel wall), was used as substrate. Perfusions were performed both with native blood and after heparinization (50 IU/kg).

Ex Vivo Platelet Aggregation

Platelet aggregation was performed as previously reported,⁹ using ADP and collagen as agonists. Blood was obtained in sodium citrate (0.16 mol/L), and extent of aggregation was determined in platelet-rich plasma with an optical aggregometer (Aggregometer-II) and in whole blood with an impedance aggregometer (Chrono-Log).

Rho-A Expression

Platelets were obtained from blood gently dropped into plastic tubes containing acid citrate dextrose. Platelet number was adjusted to 4 × 10⁶ platelets and mixed with 100 μL of lysis buffer (10 mmol/L Tris/HCl, pH 7.5, 0.15 mol/L KCl, 2.9 mmol/L PMSF, 0.1 mmol/L DTT, 10 μmol/L leupeptin, 1350UI aprotinin, 1% Triton), then sonicated for 10 seconds and centrifuged at 900g at 4°C for 15 minutes. Platelet subfractionation was performed as described.¹⁰ Equal amounts of platelet cytoplasm and membrane protein were subjected to SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose mem-

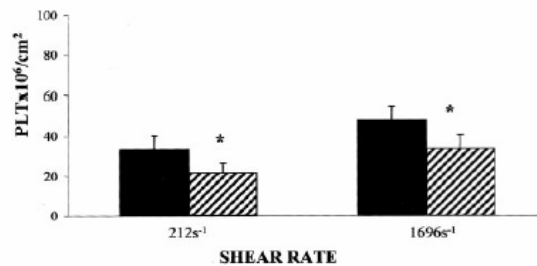


Figure 1. Total platelet deposition (PLT × 10⁶/cm²) of nonheparinized blood over severely damaged vessel wall at 2 different shear rates, 212 s⁻¹ (n=9, group A; n=9, group B) and 1696 s⁻¹ (n=9 per group). Black bars, hyperlipemic control animals; hatched bars, wine-treated animals. *Significantly different (P<0.05).

branes (Bio-Rad). The membranes were incubated with anti-RhoA monoclonal antibody (1:200) (Santa Cruz Biotechnology), then incubated with anti-mouse immunoglobulins (1:10 000). Antibody visualization was performed by a chemiluminescent method (Super-Signal, Pierce).

Blood and Plasma Determinations

Blood was withdrawn by venipuncture from the ear marginal vein in fasting animals at baseline and at days 15, 30, 50, 75, and 100 of the study.

Blood cell counting (System-9000, Sero-Baker Diagnostics) and coagulation parameters (ST4 coagulometer, Diagnostica-Stago) were followed up. Blood alcohol concentration was determined by use of an alcohol dehydrogenase assay kit (332-UV) according to the manufacturer's instructions (Sigma Chemical). Liver enzymes, total cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides were determined enzymatically (Kodak Ektachem DT, Eastman Kodak Co).

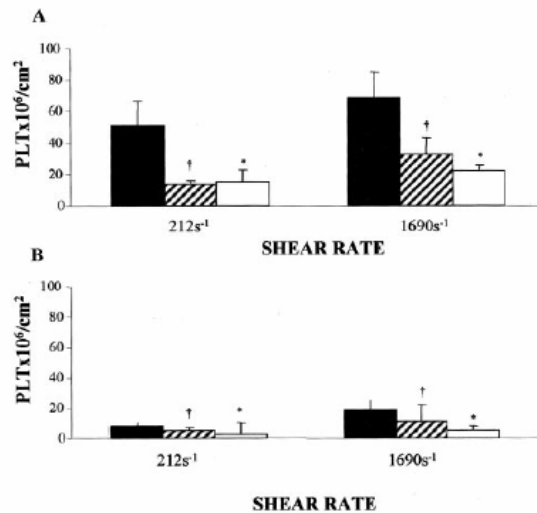


Figure 2. Perfusions with nonheparinized blood. Perfusions were run for 3 minutes over mildly and severely damaged vessel wall, at 212 s⁻¹ (n=16 per group) and 1696 s⁻¹ (n=16 per group). Black bars, hyperlipemic control animals; hatched bars, hyperlipemic with 40 g wine-ethanol/d animals; open bars, hyperlipemic with 20 g wine-ethanol/d animals. *Significantly different (P<0.05), HD group vs HL group, and †significantly different (P<0.05), LD group vs HL group.

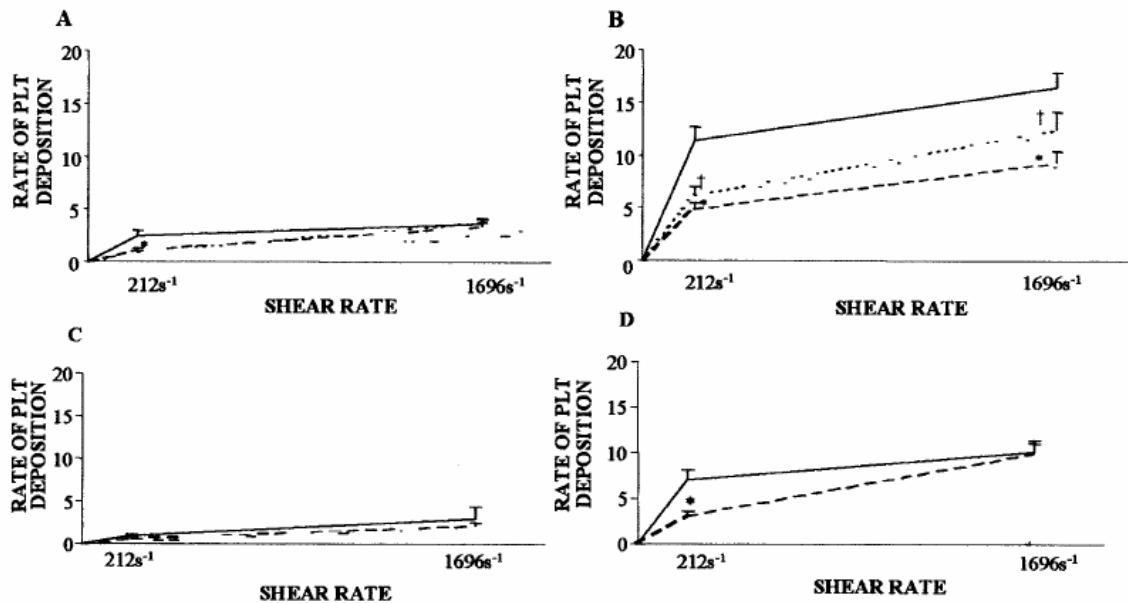


Figure 3. Rate of platelet deposition (platelet deposition [PLT $\times 10^6$ /cm²]/minute of perfusion). A, Perfusions on mildly damaged vessel wall at low (n=44 per group) and high (n=44 per group) shear rate; B, perfusions on severely damaged vessel wall at low (n=44 per group) and high (n=44 per group) shear rate. Continuous lines, hyperlipemic control animals; interrupted lines, hyperlipemic with 40 g wine-ethanol/d animals; lines and points, hyperlipemic with 20 g wine-ethanol/d animals. *Significantly different ($P<0.05$), HD group vs HL group, and †significantly different ($P<0.05$), LD group vs HL group. C, Perfusions on mildly damaged vessel wall at low (n=20 per group) and high (n=20 per group) shear rate; D, perfusions on severely damaged vessel wall at low (n=20 per group) and high (n=20 per group) shear rate. Continuous lines, normolipemic animals; interrupted lines, normolipemic animals fed 1 dose of red wine (40 g wine-ethanol). *Significantly different ($P<0.05$), wine-fed animals vs normolipemic animals.

LDL Oxidation

Lipoprotein oxidation capacity was analyzed in EDTA-collected blood. Samples were obtained at the end of the perfusion experiment and in the control study at baseline and 30, 50, and 120 minutes after red wine administration. LDLs were isolated by sequential ultracentrifugation,¹¹ and oxidation was induced by copper as described.¹² Lipoprotein oxidation was also analyzed by thiobarbituric acid-reactive substances.

Tissue Factor Expression in Induced Monocytes

Blood collected in sodium citrate from normolipemic animals fed with and without 40 g wine-ethanol was used to obtain monocytes by an elutriation centrifuge. Elutriated monocytes were harvested on RPMI 1640 medium with Glutamax-1 (Gibco) overnight and then adhered on 100-mm plastic dishes (Falcon) and induced with lipopolysaccharide (LPS) (10 μ g/10⁶ cells). Four hours later, supernatants were aspirated and centrifuged; dishes were scraped with Tripure (Boehringer Mannheim Corp) and processed to obtain RNA by conventional techniques. The centrifuged supernatants (700g, 5 minutes) containing nonadherent cells were also dissolved with Tripure.

Tissue factor (TF) mRNA and a control GAPDH mRNA were amplified in semiquantitative reverse transcription-PCR analysis. RNA (0.5 μ g) was reverse-transcribed in a final 15- μ L reaction mixture, performed at 42°C for 1 hour. cDNA (1 μ L) was amplified in a total 25- μ L reaction. The specific oligonucleotides selected for TF amplification were as follows: sense, 5'-AGAGTTCACACCTTACCTGGA-3' and antisense, 5'-AGTTTTCTCCTTTATCCACAT-3'; for GAPDH, sense, 5'-GTCACCAGG-GCTGCTTTAA 3' and antisense, 5'ACGGAAGGCCATGC-CAGTGA 3'. Amplification of TF was performed by 35 cycles of 95°C for 2 minutes, 55°C for 40 seconds, and 72°C for 1 minute, followed by a final extension of 72°C for 10 minutes. A ratio of

TF/GAPDH was used to normalize TF values. PCR products were resolved by electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Data Analysis

Multiple group means were compared by single-factor or multiple-factor ANOVA, followed by Fisher's protected least significant difference and Scheffé's F test. Results are expressed as mean \pm SEM, and a value of $P<0.05$ was considered significant.

Results

Thrombotic Response and Ex Vivo Platelet Aggregation

The thrombotic response to severely damaged vessel wall was significantly decreased in the group ingesting 30 g wine-ethanol/d of red wine at both high and low shear rates (Figure 1).

Platelet deposition also showed a statistically significant reduction with 20 and 40 g wine-ethanol/d in native blood perfusions over mildly and severely damaged vessel wall and at both shear rate conditions (Figure 2)

When heparinized blood was used, the inhibitory effects of red wine on platelet deposition were clearly significant in severely damaged substrates ($P<0.05$) at high and low shear rates in perfusions of 3 and 5 minutes (Figure 3B). In eroded vessel wall, because of the low levels of platelet deposition (platelet adhesion), the reduction was significant ($P<0.05$) only at a low shear rate (Figure 3A), whereas results did not reach significance at high shear rate.

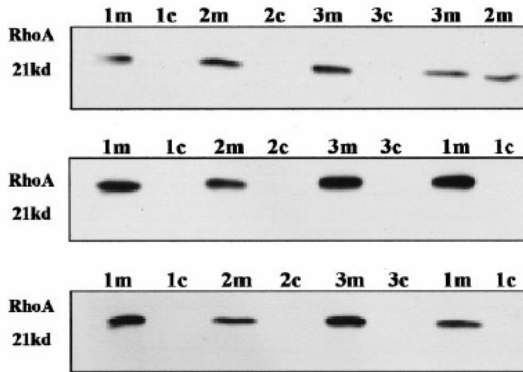


Figure 4. Western blotting of RhoA protein. Platelets obtained at end of perfusion experiment were subfractionated in cytoplasm (c) and membrane (m). Blotting membranes were exposed for 1 minute to evidence RhoA protein expression in platelet membrane. After overexposure of these blotting membranes, only platelet cytoplasm of high-dose animals was expressed (picture not shown). 1, Hyperlipemic control animals; 2, hyperlipemic with 40 g wine-ethanol/d animals; 3, hyperlipemic with 20 g wine-ethanol/d animals.

Normolipemic animals fed a unique dose of red wine showed only a significant decrease ($P < 0.05$) of platelet deposition in perfusions over severely damaged vessel wall at low shear rate (Figure 3D) compared with normolipemic animals not taking any wine.

Ingestion of these light to moderate doses of red wine did not cause any significant reduction in either whole blood or platelet-rich plasma aggregation *ex vivo* induced by collagen or ADP (data not shown).

Rho-A Protein Translocation

The expression of RhoA protein in the platelet membrane (active form) showed a reduction in groups ingesting wine (Figure 4). RhoA protein in platelet cytoplasm (inactive form) was increased in groups ingesting the high dose of red wine (40 g wine-ethanol/d) compared with the hyperlipemic placebo group (data not shown).

Blood and Plasma Determinations

Red wine intake did not produce any significant difference in biochemical parameters, blood cell counts, or platelet counts.

TABLE 2. Plasma Lipid Composition

	Total Cholesterol, mg/dL	HDL Cholesterol, mg/dL	Non-HDL Cholesterol, mg/dL
Group A (n=3)	515.07±52.27	69.79±5.63	439.64±51.7
Group B (n=3)	407.43±36.56	59.57±4.99	323.03±45.50
Group HD (n=4)	333.5±45.11	55±8.51	273.1±44.23
Group LD (n=4)	538±47.14*	86.5±6.55*	434.7±40.11
Group HL (n=4)	415±47.22	55.5±4.13	355.2±51.90
Normolipemic (n=4)	64.5±5.78	60.75±1.31	29.42±5.46

Values were obtained at the end of the experimental period. Group A, 30 g wine-ethanol/d; group B, control group; group HD, 40 g wine-ethanol/d; group LD, 20 g wine-ethanol/d; group HL, hyperlipemic placebo group.
*Significantly different, $P < 0.05$ group LD vs group HD and group HL.

TABLE 3. Oxidation of LDL Particles

	Group HD	Group LD	Group HL
Max DC, nmol/mg protein	258.9±11.3	167.46±18.6*†	285.23±39.1
Lag time, min	35.62±2.6	58.25±12.01*	48.58±8.14
V ^{max} CD, nmol·min ⁻¹ ·mg protein ^{-1p}	8.13±0.68	3.85±0.51*†	8.21±1.2
TBARS, nmol MDA/mL	10.39±0.37	4.99±10*	5.02±1.11‡

Max DC indicates maximal diene concentration; V^{max} CD, maximal velocity of formation of conjugated dienes; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances. Group HD, 40 g wine-ethanol/d; group LD, 20 g wine-ethanol/d; group HL, hyperlipemic placebo group.

*Significantly different, $P < 0.005$ group LD vs group HD.
†Significantly different, $P < 0.005$ group LD vs group HL.
‡Significantly different, $P < 0.005$ group HL vs group HD.

Liver enzymes were increased by the hypercholesterolemic diet (baseline AST, 32±2 U/L, and ALT, 41±3 U/L; hyperlipemic AST, 64±9 U/L, and ALT, 68±9 U/L, $P < 0.05$). Interestingly, wine-fed hyperlipemic animals did not show any impairment in liver enzymes (AST, 51±2 U/L [HD], and 58±9 U/L [LD]; ALT, 34.25±6 U/L [HD], and 65±13 U/L [LD]). No detectable levels of ethanol were found in blood as expected, because the last red wine ingestion was the day before the experimental procedure.

Plasma levels of total cholesterol and HDL cholesterol were significantly increased in the LD group (Table 2).

LDL Oxidation

The LDL oxidation, measured as maximal conjugated dienes, was significantly lower ($P < 0.0015$) in the LD group than in the HL group (Table 3). Lag time was not significantly increased by red wine ingestion. The maximal velocity of conjugated diene formation was significantly reduced for the LD group but was not affected in the HD group with respect to the control group. The thiobarbituric acid-reactive substances test confirmed the lower oxidative capability of LDL from the group LD respect to the HD group ($P < 0.001$). No differences in these parameters were found for normolipemic animals fed or not fed red wine.

Tissue Factor Expression in Induced Monocytes

Quantification of DNA resulting from the reverse transcription-PCR for TF showed that isolated peripheral blood monocytes, differentiated by adhesion, from wine-fed animals have both a lower TF mRNA content and a lower capacity to induce TF mRNA expression in the presence of LPS (Figure 5).

Discussion

Our results demonstrate that chronic intake of red wine with meals induces a significant inhibitory effect of platelet deposition on damaged vessel wall and that this inhibitory effect is more evident with the high dose of wine than with the lower doses. One single dose of red wine in association with the meal in normolipemic animals showed a reduction in platelet deposition, although it did not reach significance in

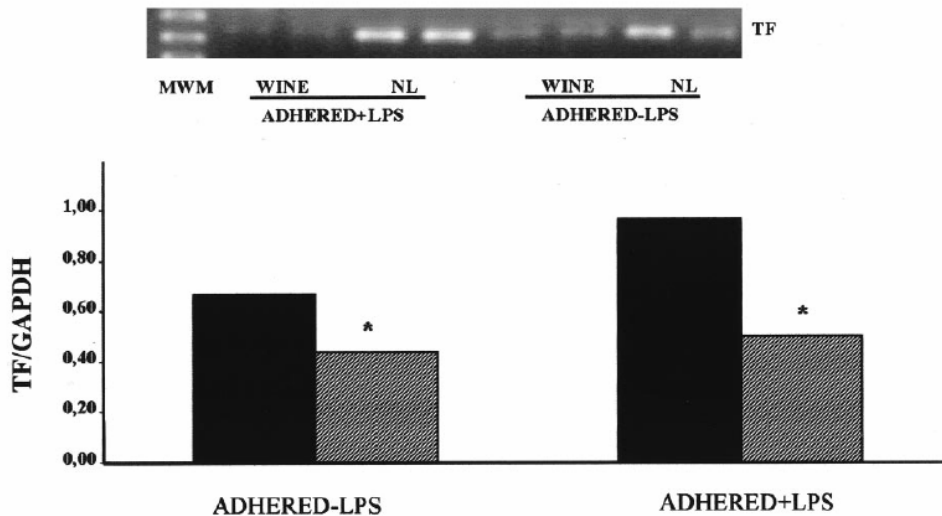


Figure 5. Effect of red wine consumption in induction of TF mRNA in LPS-induced monocytes. Monocytes were obtained by elutriation of citrated blood of animals studied. Elutriated monocytes were harvested overnight and induced for 4 hours with LPS extract ($10 \mu\text{g}/10^6$ cells), then processed to obtain RNA. Black bars, normolipemic animals fed commercial chow; hatched bars, normolipemic animals fed 1 dose of red wine (40 g wine-ethanol). *Significantly different ($P < 0.05$), wine-fed animals vs normolipemic animals.

all conditions tested. These results indicate that moderate intake of red wine could exert a beneficial antithrombotic effect.

Thrombotic risk in the control hyperlipemic animals increased with perfused lesion severity, perfusion time, and shear rate conditions, as described previously.¹³ Groups ingesting red wine showed the same platelet deposition pattern but with lower growth, suggesting that the reduction in platelet deposition will probably be the result of a passivation effect of red wine in platelets. There is evidence that flavonoids present in red wine inhibit cAMP and cGMP phosphodiesterases,¹⁴ increasing platelet levels of cAMP and cGMP. As a result, platelet cytosolic calcium ($[\text{Ca}]_i^{2+}$) levels would decrease, reducing the level of in vivo platelet activity. Activation of platelets implies different responses, including shape change, adhesion, aggregation, and secretion. Shape change of platelets could be regulated by both calcium-dependent and -independent pathways.^{15,16} We have found that red wine ingestion reduced the translocation of RhoA into membranes (active site), accompanied by an increase in the levels of cytoplasmic RhoA (inactive), corresponding to a reduction in platelet deposition.

Alcohol and polyphenols have been shown to inhibit in vitro platelet aggregation when added to platelets obtained from healthy volunteers and challenged with thrombin and ADP. However, the high concentrations required ($>130 \mu\text{mol/L}$) are not reached by feasible moderate intake of wine.¹⁷ Alcohol intake has also been shown to affect platelet activity indirectly, through an HDL-mediated stimulation of the production of prostacyclin, and inhibit the production of thromboxane A_2 , perhaps by inhibiting platelet cyclooxygenase activity,^{18,19} or may be promoting an increase in platelet membrane fluidity. Nevertheless, a diet rich in saturated fat,

like that ingested by our animals, reduces platelet surface area and membrane fluidity compared with platelets from normolipemic animals.²⁰ This could be the reason why the ingestion of red wine cannot significantly reduce platelet aggregation in our study, results that are in concordance with those found by Rand et al²¹ using thrombin as aggregating agent.

This study also shows for the first time that ingestion of red wine reduces TF expression in LPS-stimulated monocytes from normolipemic animals. Resveratrol, a wine phenolic component, showed inhibitory effects on TF expression in human endothelial cells and monocytes in in vitro studies using high doses of the isolated compound.²²

In the pathogenesis of atherosclerosis, modified LDL particles may become oxidized, then promoting foam-cell formation and enhancing the atherosclerotic lesion.²³ Antioxidant therapies had been proposed to stop or delay this process. Phenolic compounds of the red wine had been shown to exert these activities in vitro²⁴ and in vivo,^{25,26} but in vivo studies are performed with healthy volunteers ingesting about 400 mL of red wine for only 2 or 4 weeks.²⁴ In our hyperlipemic experimental model, the group ingesting a low dose of wine (LD group) showed better changes in oxidative parameters than the groups ingesting the higher amount of wine. In vivo, the antioxidant protective effect of red wine can be overshadowed by the pro-oxidant effect of the ethanol present in wine, and in groups ingesting 30 and 40 g of alcohol, the antioxidant protective effect of polyphenols may be overshadowed by the pro-oxidant effect of ethanol. The balance between alcohol and polyphenols of a wine may be critical for its in vivo effect on LDL. The wine used in the study contains high amounts of resveratrol ($76 \mu\text{mol/L}$) and catechins (3.36 g/L), phenolic compounds with demonstrated cardioprotective effects.^{27,28} A moderate and regular con-

sumption of red wine could lead to a modification of cell function that is evidenced in the beneficial effect of red wine on the thrombotic response.

Considering that thrombosis is an integral part of atherosclerosis and coronary artery disease, it is possible that the decreased risk of CHD associated with moderate intake of red wine could be caused by a combination of vascular and antithrombotic effects. The ability of red wine to reduce thrombotic risk, the reduction in monocyte TF expression, the reduction in membrane Rho-A protein translocation, and the global antioxidant effect are major steps to confirm that a moderate intake of red wine can be included as a real cardioprotective factor. Results obtained in oxidative modification of LDL indicated that a low ingestion of red wine, preferably a wine rich in polyphenols, is better than a higher amount of wine, whereby the pro-oxidant effects of ethanol are overshadowing the beneficial effects. Interestingly, the platelet aggregation response to wine-ethanol has been shown to differ according to the type of diet.^{29,30} We have demonstrated that a moderate dose of red wine taken with a diet rich in saturated fats is able to produce beneficial antiatherothrombotic effects. Therefore, patients at risk, especially those with an exclusive western diet, will receive the most benefit from the moderate red wine intake.

Limitations of the Study

With the experimental design used in this study, we can only draw conclusions about the antithrombotic effects of the chronic intake of a moderate amount of red wine. We cannot identify whether alcohol or nonalcoholic components of red wine are the protective components or whether ingestion of white wine or hard alcoholic beverages (spirits) will produce effects similar to those of red wine.

Acknowledgments

This study was supported by funds provided by PN Agriculture 2000/024, PN Health SAF 2000-0174, Uriach Award, Frivn and Cardiovascular Research Foundation (FIC) Catalana-Occidente. We would like to thank Olga Bell for technical assistance. L. Casani and E. Segales are recipients of an FIC fellowship. G. Vilahur is a recipient of a BEFI fellowship.

References

- Rimm EB, Williams P, Fosher K, et al. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ*. 1999;319:1523-1528.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339:1523-1526.
- Kondo K, Matsumoto A, Kurata H, et al. Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein with red wine. *Lancet*. 1994;344:1152. Letter.
- Lavy A, Fuhrman B, Markel A, et al. Effect of dietary supplementation of red wine or white wine on human blood chemistry, haematology and coagulation: favourable effect of red wine on plasma high-density lipoprotein. *Ann Nutr Metab*. 1994;38:287-294.
- Freedman JE, Parker C, Li L, et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*. 2001;103:2792-2798.
- Imhof A, Froehlich M, Brenner H, et al. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet*. 2001;357:763-767.
- Badimon L, Turitto V, Rosemark JA, et al. Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: deposition of indium 111-labelled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med*. 1987;110:706-718.
- Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*. 1999;99:1780-1787.
- Galvez A, Badimon L, Badimon JJ, et al. Electrical blood from human, pig and rabbit. *Thromb Haemost*. 1986;56:128-132.
- Xiong Y, Westhead EW, Slakey LL. Role of phosphodiesterase isoenzymes in regulating cyclic AMP in adenosine-stimulated smooth muscle cells. *Biochem J*. 1995;305:627-633.
- Havel R, Eder H, Bragdon J. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955;34:1345-1354.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, et al. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*. 1983;6:67-75.
- Badimon L, Badimon JJ. Mechanisms of arterial thrombosis in non parallel streamlines: platelet thrombi grow on the apex of stenotic severely injured vessel wall. *J Clin Invest*. 1989;84:1134-1144.
- Ferrell JE, Peter DG, Sing C, et al. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of cAMP phosphodiesterase and relationship to quantum chemical indices. *Mol Pharmacol*. 1979;16:556-568.
- Leng L, Kashiwagi H, Ren XD, et al. RhoA and the function of platelet integrin $\alpha_{IIb\beta_3}$. *Blood*. 1998;91:4206-4215.
- Bodie SL, Ford I, Greaves M, et al. Thrombin-induced activation of RhoA in platelet shape change. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287:71-76.
- Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, et al. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in human subjects. *Clin Chim Acta*. 1996;246:163-182.
- Mower R, Landolfi R, Steiner M. Inhibition in vitro of platelet aggregation and arachidonic acid metabolism by flavones. *Biochem Pharmacol*. 1984;33:357-363.
- Guivernau M, Baraona E, Soong J, et al. Enhanced stimulatory effect of high density lipoproteins (HDL) and other agonists on vascular prostacyclin production in rats fed alcohol-containing diets. *Biochem Pharmacol*. 1989;38:503-508.
- Rand ML, Gross PL, Barrow DV, et al. Acute in vitro effects of ethanol on responses of platelets from cholesterol-fed and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:437-445.
- Rand ML, Gross PL, Jakovec DM, et al. In vitro effects of ethanol on rabbit platelet aggregation, secretion of granule contents, and cyclic AMP levels in the presence of prostacyclin. *Thromb Haemost*. 1989;61:254.
- Pendurthi UR, Williams JT, Vijaya Mohan Rao L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:419-426.
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991;88:1785-1792.
- Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol*. 1997;8:1627-1631.
- Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in hamster model. *Atherosclerosis*. 2001;156:67-72.
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:329-334.
- Leikert JF, R  thel TR, Wohlfart P, et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*. 2002;106:1614-1617.
- Wallenrath T, Deckert G, Temes T, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106:1652-1658.
- de Lorgeril, Salen P. Wine ethanol, platelets, and Mediterranean diet. *Lancet*. 1999;353:1067.
- Renaud SC, Beswick AD, Fehily AM, et al. Alcohol and platelet aggregation: the Caerphilly Prospective Heart Disease Study. *Am J Clin Nutr*. 1992;55:1012-1017.

ANEXO I.

En este apartado se muestran resultados que no se incluyeron en el primer artículo presentado y cuya información pone de manifiesto beneficios colaterales asociados al consumo moderado de vino tinto en condiciones de hipercolesterolemia.

OBJETIVOS

Estudio inmunohistoquímico de la composición del trombo desarrollado sobre el sustrato vascular perfundido con sangre de los animales en el estudio.

Estudio histológico de las lesiones ateroscleróticas en la pared arterial (arterias coronarias y arteria aorta abdominal) de los animales del estudio.

MÉTODOS

ESTUDIO DE LA DEPOSICIÓN AXIAL

Después de contabilizar la radioactividad total de los sustratos perfundidos cada sustrato se orienta con respecto al flujo sanguíneo que ha circulado por él y se divide en cinco secciones. Las secciones de entrada y salida (2 mm) se descartan. Las secciones restantes (de 7 mm cada una) corresponden a diferentes perfiles del flujo local: *a* (proximal), *b* (medial) y *c* (distal) se vuelven a contar por separado y se calcula su contribución al contaje total.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL TROMBO

Tras el recuento radioactivo final la sección central o fragmento *b* se procesa para realizar estudios de inmunohistoquímica del trombo formado. El segmento se fija en paraformaldehído al 4%, se crioprotege con sacarosa (2.3 mols/L) y se congela sobre hielo seco en OCT (Tissue-Tek, Miles Inc. U.S.A). Con la ayuda de un criostato el segmento *b* se corta longitudinalmente en secciones de 5 mm y se monta sobre portaobjetos previamente gelatinizados para ser utilizado en estudios

de inmunohistoquímica. Como anticuerpos primarios se utilizaron anticuerpos policlonales antifibrinogeno (DAKO, A080, Dinamarca) y antiplaquetas (pabBP19, desarrollado en nuestro laboratorio). Los anticuerpos secundarios fueron: inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con FITC (F0479, Dako, Denmark) e inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo conjugadas con TRITC (R156, Dako, Denmark).

ESTUDIO EN LA PARED VASCULAR

Tras el sacrificio de los animales se extrajeron las arterias coronarias y la aorta abdominal (de la cual se separó el tronco ilíaco y la porción de aorta interrenal) y se fijaron en paraformaldehído al 4%.

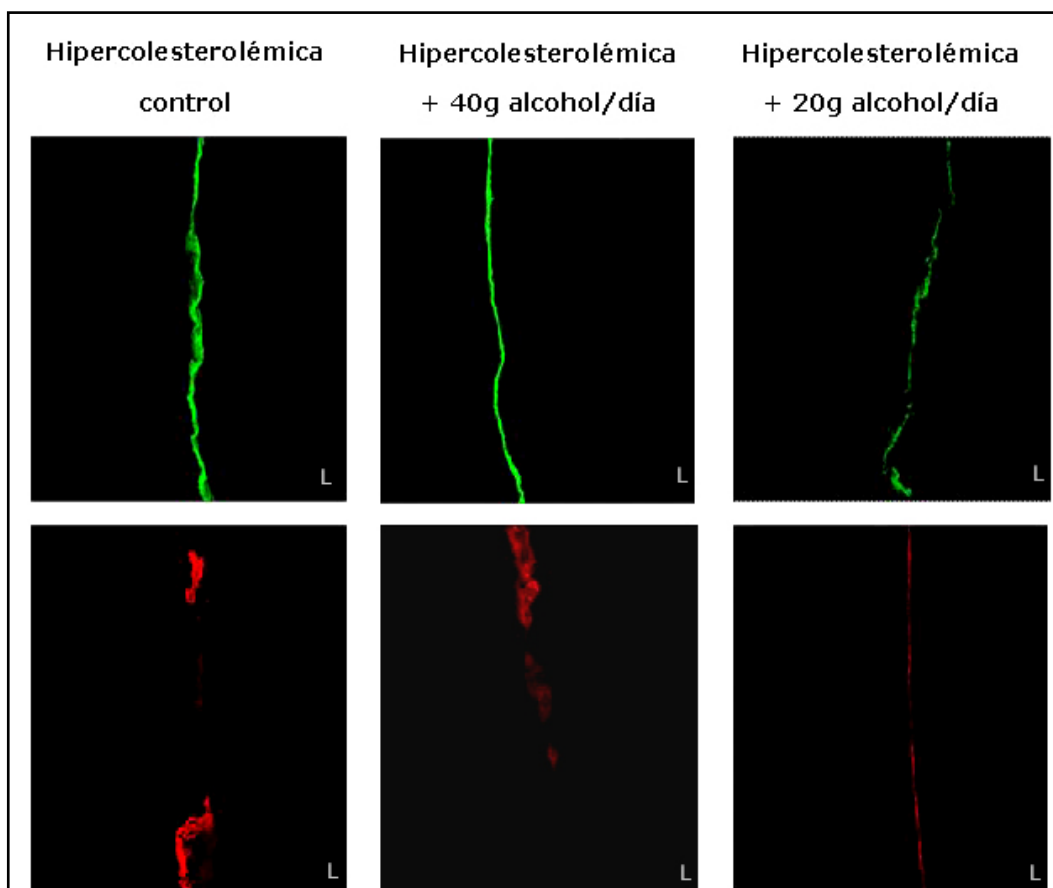
Extensión de la lesión en la aorta abdominal. Los segmentos interrenales (4 cm) se tiñeron con la solución de Herxheimer y la extensión de la estría grasa presente se calculó con un analizador de imágenes (Visilog, Noesis, Francia).

Engrosamiento de la íntima en la arteria coronaria descendente izquierda y en el tronco ilíaco. Tras fijarse con paraformaldehído los tejidos se crioprotegieron con sacarosa y se incluyeron en OCT sobre hielo seco. Con el criostato se obtuvieron cortes transversales de 5 mm de grosor. Los tejidos se tiñeron con tinción de Masson que permite la identificación y cuantificación de las estructuras vasculares y realizar un análisis morfométrico posterior. Con la ayuda de un analizador de imágenes (Visilog, Noesis, Francia) se obtuvieron las siguientes medidas: área del lumen (L), área rodeada por la lámina elástica interna (LEI) y área rodeada por la lámina elástica externa (LEE). Con ellos se calcularon los parámetros: (1) área de la íntima, $I = LEI - L$; (2) área de la media, $M = EEL - LEI$; (3) ratio íntima-media, I/M ; (4) % de estenosis, $[I/(L+I)] \times 100$.

Los cortes también se tiñeron usando la tinción de ORO (oil-red-o) que permite evaluar el contenido lipídico de las lesiones.

RESULTADOS

Los estudios inmunohistoquímicos permiten observar una ligera diferencia en cuanto a la cantidad de fibrina y plaquetas depositada sobre los sustratos perfundidos (Figura 1).



Anexo I-Figura 1. Microfotografías representativas del trombo formado sobre pared vascular con lesión severa al perfundir con baja velocidad de cizalladura (212/s) la sangre de los animales hiperlipémicos control e hiperlipémicos tratados con vino (40 y 20g alcohol/día). La fibrina aparece teñida en verde y las plaquetas en rojo. L, indica luz vascular.

No hubieron diferencias significativas en la evolución de las lesiones en la aorta abdominal (tronco ilíaco), debido al corto tiempo de evolución del modelo experimental (Tabla 1).

Dieta	% lesión
Hipercolesterolemica control	22.03±4.5
Hipercolesterolemica + 20g etanol/día	17.83±8.1
Hipercolesterolemica + 40g etanol/día	20.99±8.6

Anexo I-Tabla 1. Porcentaje de extensión de la estria grasa en los fragmentos de aorta analizados en los animales del estudio. El valor se obtiene con la siguiente fórmula: (área lesión/área total)*100.

El análisis morfométrico del tronco ilíaco muestra datos similares a los anteriores, no hay un cambio importante en los parámetros estudiados. El contenido en lípidos de las lesiones tampoco difiere de manera significativa entre grupos.

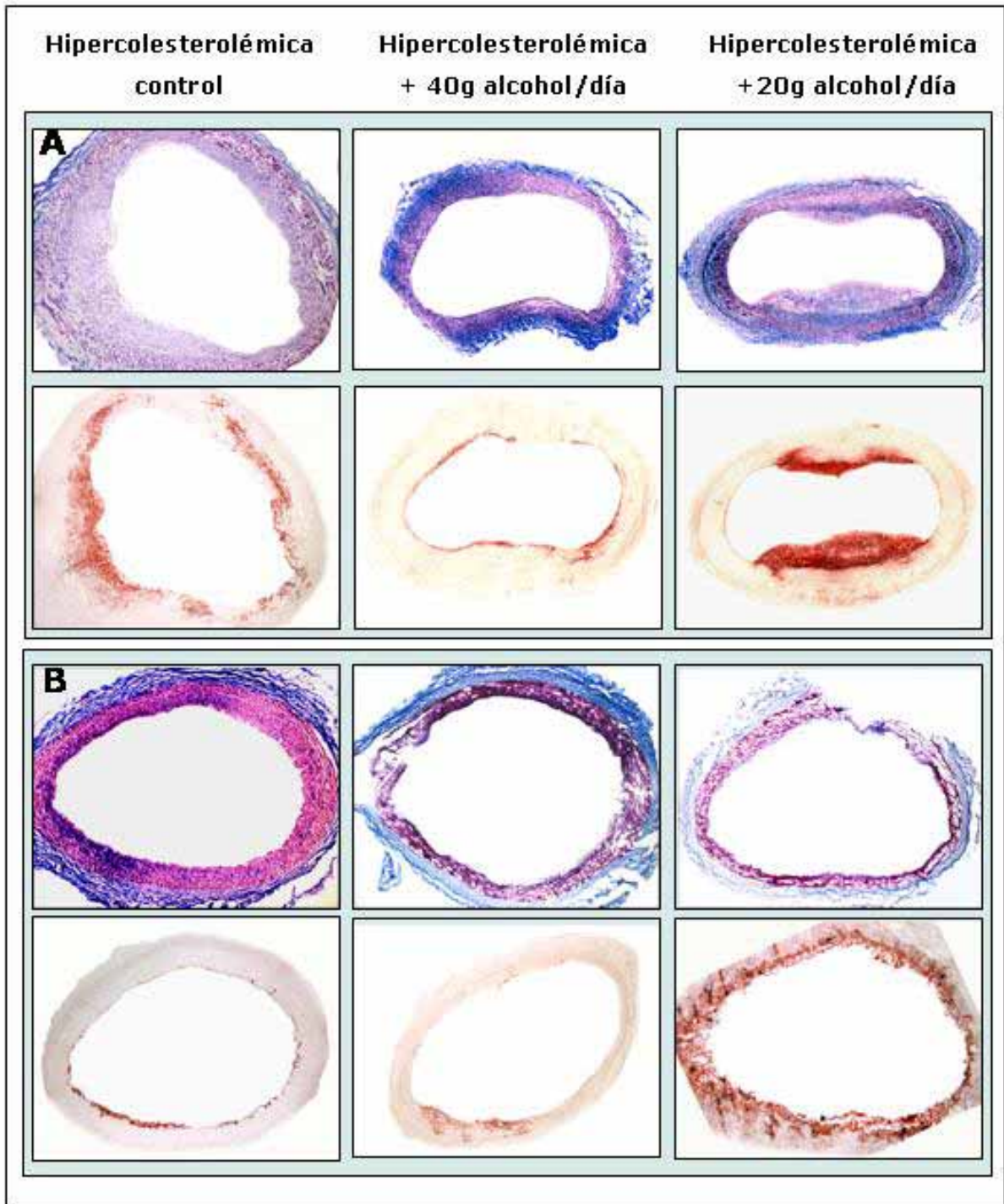
Dieta	área íntima	área media	ratio I/M	% lesión	% tinción
Hipercolesterolemica control	1.3±0.46	11.7±0.24	0.124	12.5±5.8	57.1±5.9
Hipercolesterolemica dosis baja de vino	4.3±0.73	12.2±0.11	0.359	22.6±2.8	61.4±5.58
Hipercolesterolemica dosis alta de vino	1.91±0.23	12.03±0.07	0.158	12.9±2.2	50.2±3.74

Anexo I-Tabla 2. Parámetros calculados en los cortes histológicos de troncos ilíacos a partir del análisis morfométrico practicado con la tinción tricrómica de Masson. El área que ocupan la íntima y la media se expresa en cm². El % de tinción indica la cantidad de lípido presente en el corte histológico (tinción Oil-red-o)

Los mismos resultados se obtienen en las arterias coronarias. No existen diferencias significativas entre los grupos de animales estudiados.

Dieta	área íntima	área media	ratio I/M	% lesión	% tinción
Hipercolesterolemica control	0.7±0.39	0.2±0.03	0.294	13.3±6.2	18.3±5.8
Hipercolesterolemica dosis baja de vino	1.2±0.42	0.2±0.07	0.589	20.4±6.9	31.6±6.19
Hipercolesterolemica dosis alta de vino	0.28±0.07	0.01±0.06	0.237	9.03±1.6	7.5±2.77

Anexo I-Tabla 3. Parámetros calculados en los cortes histológicos de arterias coronarias a partir del análisis morfométrico practicado con la tinción tricrómica de Masson. El área que ocupan la íntima y la media se expresa en cm². El % de tinción indica la cantidad de lípido presente en el corte histológico (tinción Oil-red-o)



Anexo I-Figura 2. Tronco ilíaco (**A**) y arteria coronaria izquierda descendente (LAD) (**B**) de los animales del estudio; hipercolesterolémicos (n=4 animales), hipercolesterolémicos con vino (40g alcohol/día) (n=4 animales), hipercolesterolémicos con vino (20g alcohol/día) (n=4 animales). Tinción tricrómica de Masson (arriba) y tinción Oil-Red-O (abajo). Cortes histológicos representativos de los animales de cada grupo, tomadas con lupa a 8X (tronco ilíaco) y con microscopio a 4X (LAD).

ARTÍCULO II: "PRAVASTATIN REDUCES THROMBOGENICITY BY MECHANISMS BEYOND PLASMA CHOLESTEROL LOWERING". *Thrombosis & Haemostasis*. 2005; FI=4.464

Platelets and Blood Cells

Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering

Laura Casani, Sonia Sanchez-Gomez, Gemma Vilahur, Lina Badimon

Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB, Barcelona, Spain

Summary

Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase are widely used in the management and prevention of cardiovascular disease. In addition to its major activity, plasma lipid lowering, statins have shown a wide spectrum of additional effects that may contribute to their benefits in the prevention of cardiovascular disease. Our objective was to study whether treatment with a statin, pravastatin, could reduce thrombosis triggered by damaged vessels without changing plasma cholesterol levels. A cholesterol-clamp animal model was developed by feeding swine for 100 days on an hypercholesterolemic (HL) diet; in the last 50 days, they were randomly assigned to receive either placebo (HLC) or pravastatin ($5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) (HLP) in addition to the hypercholesterolemic diet. A normocholesterolemic control

group (NLC) was simultaneously studied. There were no significant differences in total cholesterol, LDL and HDL plasma levels between the two groups; however, mural thrombosis triggered by both an eroded and disrupted vessel wall was significantly inhibited by pravastatin ($P < 0.05$). Axial dependence analysis of platelet deposition revealed that pravastatin treatment reduced the increase in platelet deposition associated to the shear rate increase at the stenosis. Additionally, pravastatin treatment significantly reduced platelet membrane RhoA expression ($P < 0.05$) and vascular wall tissue factor (TF) protein expression ($P < 0.05$). In addition to its lipid lowering effects, pravastatin can reduce blood thrombogenicity by mechanisms independent of plasma cholesterol lowering.

Keywords

Hypercholesterolemia, statins, thrombosis, pravastatin, platelets

Thromb Haemost 2005; 94: 1035–41

Introduction

Statins are widely and successfully used in lipid-lowering therapy (1, 2). Clinical results with statins strongly suggest that the beneficial effects obtained with these drugs might also be related to factors beyond systemic lipid lowering (3, 4). These cholesterol-independent effects of statins may contribute to their benefits and explain the early onset of clinical efficacy. Indeed, changes in plaque mass require between one and two years (5), while clinical benefit is evidenced sometimes as early as 3 months after initiation of treatment (6). Statins have shown a broad spectrum of activities, including inhibition of cell proliferation, improvement of endothelial function, inflammation, stabilization of atherosclerotic plaque, and enhancement of fibrinolysis (3, 7, 8). Although conflicting findings on the effect of different statins on the inhibition of platelets have been reported when tested *in vitro* (9, 10), a direct relation between reduction of plasma lipids and reduction of thrombotic risk has been established (11–13); however, a direct effect on thrombosis triggered by damaged arterial

wall independent from changes in plasma lipid levels has not been proven. Indeed, statins have been shown to reduce biomarkers of platelet activation (14, 15) and platelet adhesion to intestinal venules (16) independently of cholesterol lowering, but a direct functional inhibitory effect on thrombus growth on damaged arterial wall as in atherothrombosis has not been studied.

Statins have been shown to reduce TF expression in aorta (17) and in macrophage-rich atherosclerotic plaques (18, 19) in hypercholesterolemic rabbits. This glycoprotein, which was initially circumscribed to the extrinsic blood coagulation pathway, has shown extensive functions in vascular biology. TF has an important role in the atherothrombotic process since TF content of the plaque seems to predict plaque thrombogenicity (20).

Among statins, pravastatin has repeatedly been shown to produce clinical benefits and improve survival in primary (1) and secondary prevention (2, 21–24). Although it has recently been shown that pravastatin efficacy in lowering plasma lipids and CRP levels is lower than that of atorvastatin (23), its safety profile and positive results in thousands of patients (24) requires the

Correspondence to:
Prof. L. Badimon
Cardiovascular Research Center – Edificio Convent
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Avda. Sant Antoni Maria Claret 167
08025 Barcelona, Spain
Tel.: +34 935565900, Fax: +34 935565559
E-mail: lbadimon@csic-iccc.santpau.es

Received April 12, 2005
Accepted after resubmission August 1, 2005

Prepublished online October 17, 2005 DOI: 10.1160/TH05-04-0245

investigation of its mechanisms of action. Therefore, the objective of our study was to experimentally evaluate in hypercholesterolemic animals the effects of pravastatin on mural thrombosis triggered by both eroded and ruptured vascular wall at shear rate conditions of stenotic arteries (70%) in an experimental model of human resemblance using the Badimon perfusion chamber. We have found that without reducing plasma lipid levels (in a cholesterol clamp), pravastatin treatment significantly inhibited thrombus formation on both eroded and damaged vessel walls and reduced the translocation of RhoA to the platelet membrane. The expression of TF in the vascular wall was significantly reduced in the pravastatin treated animals.

Methods

Study design

Pigs (female, fixed crossbreeding, initial body weight 27.8 ± 1.1 kg) were fed a cholesterol-rich diet (2% cholesterol; 1% cholic acid; 20% beef tallow) for 100 days (hypercholesterolemic group, HL). The hypercholesterolemic diet was administered during the first 50 days to induce sustained hyperlipemia derived from cholesterol absorption and, thus, diminishing cholesterol synthesis. Then, pigs started an oral daily treatment with pravastatin (5 mg/kg) ($n=4$; HLP) or placebo ($n=6$; HLC) for the last 50 days of the hypercholesterolemic diet. A group of four animals was fed a commercial chow (normocholesterolemic group, NLC, $n=6$) for the same period of time. Pigs were bled at baseline and at days 25, 50, 75, and 100 of the study, for haematological and biochemical determinations. At the end of the experimental period thrombotic risk (TR) was assessed by exposure of blood from studied animals to a thrombus triggering damaged artery in the previously validated and standardized Badimon perfusion chamber (25). Animals were afterwards euthanized by an overdose of intravenous KCl (2 mols/L) and coronary arteries and aorta collected and preserved for further analysis.

All procedures performed in this study were in accordance with institutional guidelines and followed the American Physiological Society guidelines for animal research.

Plasma biochemistry, coagulometry, and haematology

Blood samples were collected in sodium citrate (0.16 mols/L) and used for hematological (System 9000, Serono-Baker Diagnostics, USA), coagulation (ST4, Diagnostica Stago, France) and biochemical analysis (Kodak Ektachem DT, Eastman Kodak Company, USA).

Total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL), and triglycerides (TG) were determined using a biochemical auto-analyzer (Ecktecham DT, Kodak) and LDL-cholesterol (LDL) was indirectly calculated as described (26).

Evaluation of thrombotic risk

A sample of blood was withdrawn from studied animals and their platelets were isolated, labelled with indium oxine-111 (^{111}In) (Amersham Biosciences) as previously described (27) and injected in the animal. The following day, thrombotic risk (TR) was assessed by exposure of blood from studied animals to a thrombus triggering damaged artery in the perfusion chamber. Pigs

were tranquilized (8 mg/kg, Stressnil[®], Esteve, Spain), anesthetized (5 mg/kg, Pentobarbital[®], B. Braun, Spain), mechanically ventilated, catheterized and heparinized (50 UI/kg IV bolus and continuous infusion of 50 UI \cdot kg⁻¹ \cdot h⁻¹, Liquemine[®], Roche Ltd., Switzerland) (28). A carotid artery-jugular vein shunt was established to place in the perfusion chamber. Blood was perfused through the chamber for 5 and 10 minutes. Non-parallel local flow conditions on the perfused vessel mimicking a vessel stenosis of 70% were analyzed (29).

To evaluate the effect of pravastatin on blood thrombogenicity a homologous porcine vessel wall with two types of damage were used as triggering substrates: aortic subendothelium (model of erosion) and mechanically ruptured vessel wall (tunica media, model of severe injury) (27, 30, 31). Several perfusions were performed per animal. At the end of the perfusions the vessels were fixed in 4% paraformaldehyde solution, and deposited platelets counted in a gamma-counter, and transformed into millions of deposited platelets per surface unit (total platelet deposition, TPD) as previously described (28). Additionally, in each vessel the axial dependence of platelet deposition (ADPD) was analysed. In brief, after total counting, fixed perfused specimens were oriented with respect to flow and divided into five segments. The first and the last segment (2 mm each) were discarded; the remaining three sections corresponded to a different local flow profile with the central segment (*b*) corresponding to the area of stenosis. These segments were individually counted in the gamma counter and the number of platelets deposited on every segment calculated (ADPD).

Western blot analysis of platelet activated RhoA

Before perfusions, a sample of blood was collected in ACD (acid citrate dextrose) solution from each animal to measure platelet membrane RhoA expression. Washed platelets were homogenised in a lysis buffer with protease inhibitors. Platelet subfractionation was performed as described (27). Western blot analysis was performed using twenty-five micrograms of total platelet protein and blotted onto nitrocellulose membranes (Bio Rad, USA). Blots were incubated with monoclonal antibodies anti-human RhoA (Santa Cruz Biotechnology, USA). Bound antibody was detected by using the appropriate horseradish peroxidase conjugated antibody. Signals were detected with the Super Signal chemiluminescent detection system (Pierce, USA) on a standard X-ray system.

Immunohistochemistry of thrombi

Perfused substrates were fixed in 4% paraformaldehyde solution, cryoprotected with sucrose (2.3 mols/L) and frozen over dry ice in OCT (Tissue-Tek OCT Compound 4583, Miles Inc. USA). Segment *b* was cut longitudinally with a cryostat in serial sections of 5 μ m, mounted on gelatinized slides and used for immunohistochemistry as previously described (32). A polyclonal anti-pig platelet antibody (pabBp4) developed in our laboratory (33), and a monoclonal anti-pig fibrin antibody (5F3) (fragment E of fibrin) (kindly given by Prof. P. Gaffney) were used as primary antibodies. A FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins (F479, Dako, Denmark) and TRITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins (R156, Dako, Denmark) were used as secondary antibodies.

Effects on vascular wall

In order to obtain information on the effects of treatment on the vascular wall, tissue sampling was performed following a rationale based on atherosclerosis development in the porcine model and processing requirements. Thoracic aortas develop fatty streaks while abdominal aortas and coronaries develop thickened lesions. Consequently, after euthanasia, the heart and the aorta are excised and processed. The heart and thoracic aorta were fixed and the abdominal aorta was frozen in liquid nitrogen, as described below. Two investigators worked in parallel to obtain the samples simultaneously in order to avoid tissue damage.

Extension of lesion in the thoracic aorta

Segments (4 cm in length) from the thoracic aorta were always excised from the same area (between 4th and 6th intercostal arteries) and fixed in 4% buffered-paraformaldehyde solution. Fixed aorta segments were stained using the Herxheimer's solution (34). Extension of the fatty streak lesions was measured with an image analyser (Visilog, Noesis, France).

Intimal thickening of the coronary lesions

Segments from the proximal left descendent coronary artery (LAD) (same area in all animals) were quickly dissected after euthanasia. The arteries were fixed, cryoprotected, OCT-included, and transversally cut as described above. Tissues were stained by Masson's trichrome method to identify and quantitate vascular structures by morphometric analysis. The following parameters were measured with an image analyzer (Visilog, Noesis, France): lumen area (L), area surrounded by internal elastic lamina (IEL), and area surrounded by external elastic lamina (EEL). Then, the following parameters were determined: (1) Intimal area = $I = IEL - L$; (2) Medial area = $M = EEL - IEL$; (3) Intima to media ratio = I/M ; and (4) % stenosis = $[L/(L+I)] \times 100$.

Characterization of the coronary arteries

LAD sections were stained by Oil Red-O to evaluate lipid content of lesions. Fibrinogen, smooth muscle cells (SMC) and macrophages were detected by immunohistochemistry. A polyclonal anti-human fibrin(ogen) antibody (Sigma Immunochemicals, F9902), a monoclonal anti-human SMC α -actin antibody (M851, Dako, Denmark), and a polyclonal anti-pig macrophages antibody (pabBp46) developed in our laboratory (33), were used as primary antibodies. FITC-conjugated anti-mouse and TRITC-conjugated immunoglobulins were used as secondary antibodies, to detect fibrinogen and SMC; macrophages were detected using FITC-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (T1262, Sigma Immunochemicals, USA).

Vascular wall tissue factor expression

Abdominal aortas were dissected, a segment from the celiac artery to the iliac bifurcation was excised, separated in layers (intimal and media) and frozen (-80°C). Afterwards, tissues were homogenized in lysis buffer with protease inhibitors. Western blot analysis was performed using twenty-five micrograms of protein from the intimal layer. Blots were incubated with an anti-rabbit TF polyclonal antibody (American Diagnostic, No. 4513). Bound antibody was detected by using the appropriate horseradish peroxidase conjugated antibody. Visualization was performed

by a chemiluminiscent method (SuperSignal[®], Pierce, USA) using the Chemi-Doc (Bio-Rad, USA) acquisition system. Quantification of signals was performed with Quantity 1-D (Bio-Rad, USA) analysis software.

Ex vivo and in vitro platelet aggregation

Platelet aggregation was performed at baseline (before starting treatment), 50 days after the initiation of the study, and at the end of the study in sodium citrate (0.16 mols/L) collected blood as previously described (27, 35). The extent of aggregation was determined in platelet rich plasma (PRP) with an optical aggregometer (Aggrecorder-II, Menarini, Italy) and in whole blood (WB) using an impedance aggregometer (Chrono-Log, Chrono-log, USA). Increasing doses of ADP and collagen were used as agonist agents.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by a Kruskal Wallis test followed by the Mann-Whitney-U test to assess specific group differences. Linear regression and Spearman correlation analysis for parametric and nonparametric values, respectively, were performed to study the relationship between lipids and platelet deposition, intimal thickness, and fatty streak aortic coverage. Results are expressed as mean \pm SEM and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Biochemical data and evolution of plasma lipid levels

The hypercholesterolemic diet induced an increase in plasma levels of total cholesterol, HDL, LDL and VLDL-cholesterol, but triglycerides levels remained unchanged (HLC: 25 ± 9 mg/dL; HLP: 37 ± 9 mg/dL; NLC: 47 ± 11 mg/dL). Lipid levels in hypercholesterolemic animals were not modified by pravastatin treatment. At sacrifice no differences were observed between both hypercholesterolemic groups (Fig. 1). All haematological and biochemical values (except for the lipid profile) were within the normal range throughout the study.

Evaluation of thrombotic risk

Pravastatin treatment significantly reduced ($P < 0.05$) total platelet deposition when compared to the placebo group, in perfusions triggered by both eroded and disrupted vessel wall (Fig. 2). In axial analysis, pravastatin treatment significantly reduced ($P < 0.05$) the shear-induced platelet deposition on the area of maximal stenosis (segment *b*) compared to the placebo group (Fig. 4). Mural platelet deposition triggered by blood from the control normocholesterolemic animals was significantly lower than that induced in the hypercholesterolemic placebo animals.

Levels of RhoA in the platelet membrane, determined by Western blot, were significantly reduced in the pravastatin treated group ($P < 0.05$) (Fig. 3).

Platelet aggregation

There were no effects of diet or treatment in collagen and ADP induced platelet aggregation in PRP and WB. Similar results were obtained in the three groups in all evaluated periods (data not shown).

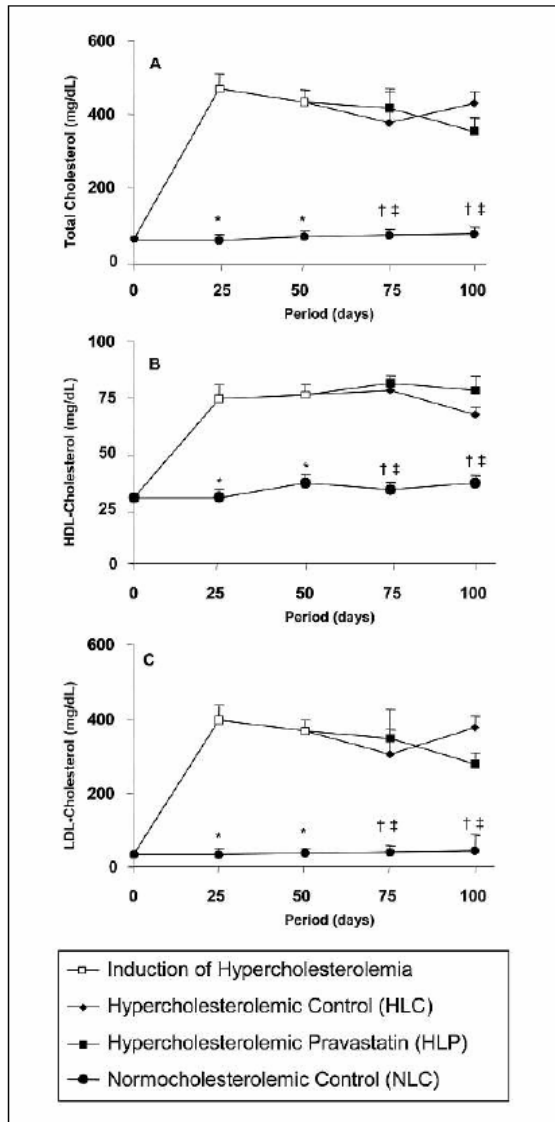


Figure 1: Effect of hypercholesterolemic diet and pravastatin treatment on lipid profile. Changes in Total cholesterol (A) HDL-cholesterol (B) and LDL-cholesterol (C) are shown. Hypercholesterolemic animals after 50 days of high-cholesterol diet feeding were randomly assigned to a group treated with placebo and a group treated with pravastatin. [**P*<0.05 vs. Hypercholesterolemic animals, † *P*<0.05 vs. HLC. ‡ *P*<0.05 vs. HLP].

Immunohistochemistry of perfused vessel wall

Fibrin(ogen) (green) and platelets (red) deposition on eroded and ruptured vascular wall are shown in Figure 5. Pravastatin treatment reduced the mass of deposited platelets, but there was no effect on fibrin(ogen) deposition.

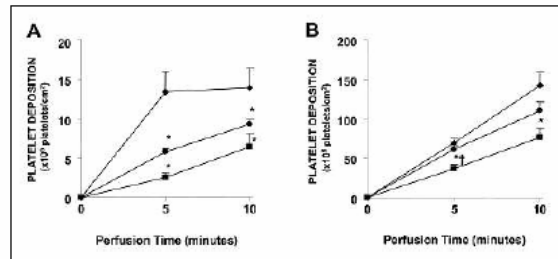


Figure 2: Effect of hypercholesterolemic diet and pravastatin treatment in platelet deposition. Eroded (A) and disrupted (B) vessel wall perfused at shear rate conditions mimicking stenotic vessels (70% stenosis) for 5 and 10 minutes. Results are shown for normocholesterolemic control animals (NLC, N=32 (●)), hypercholesterolemic animals treated with pravastatin (HLP, N=21 (■)), and hypercholesterolemic animals treated with placebo (HLC, N=34). [* *P*<0.05 vs. HLC; †*P*<0.05 vs. NLC].

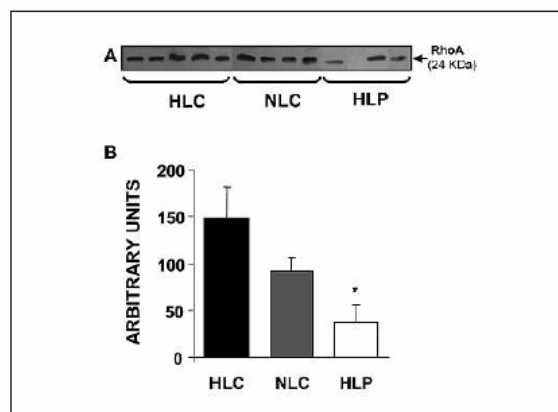


Figure 3: Analysis of RhoA protein expression A) Western blotting of RhoA protein in platelet membrane B) Quantification of RhoA protein expression in platelet membrane. Normocholesterolemic control animals (NLC, n=4), hypercholesterolemic animals treated with pravastatin (HLP, n=4), and hypercholesterolemic animals treated with placebo (HLC, n=6). [* *P*<0.05 vs. HLC].

Effects of diet and treatment on the vascular wall

While normocholesterolemic animals did not show fatty streaks in the thoracic aorta, the aortic surface of hypercholesterolemic placebo (10.8% ± 4.2) and hypercholesterolemic treated with pravastatin (5.6% ± 2.4) animals did show fatty streak lesion development. Extension of fatty streak coverage positively correlated with plasma levels of LDL cholesterol (*r*²=0.62, *P*=0.05).

Intimal thickening lesions were found in the LAD (Fig. 6 A, B, C) for both hypercholesterolemic groups. Pravastatin treatment showed a small reduction in stenosis (HLC: 19.6±5.6%; HLP: 13.6±8.7%) and reduced intima/media thickness ratio (HLC: 0.38±0.12; HLP: 0.23±0.15) but changes did not reach significance. At this early stage of plaque development lipid in-

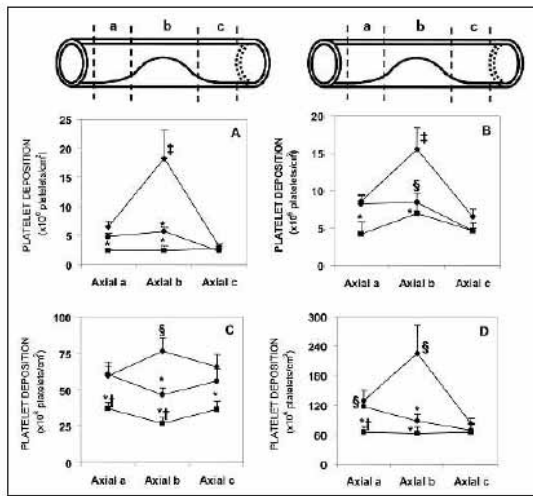


Figure 4: Effect of hypercholesterolemic diet and pravastatin treatment in axial dependence of platelet deposition (ADPD). Eroded (A, B) and disrupted (C, D) vessel wall perfused at shear rate conditions mimicking stenotic vessels (70% stenosis), for 5 (A, C) and 10 (B, D) minutes. Results are shown for normocholesterolemic control animals (NLC, N=32 (●)), hypercholesterolemic animals treated with pravastatin (HLP, N=21 (■)), and hypercholesterolemic animals treated with placebo ((◆) HLC, N=34). [[§]P<0.05 vs. HLC; † P <0.05 vs. NLC; ‡ P <0.05 vs. axial a and c; § P <0.05 vs. axial c].

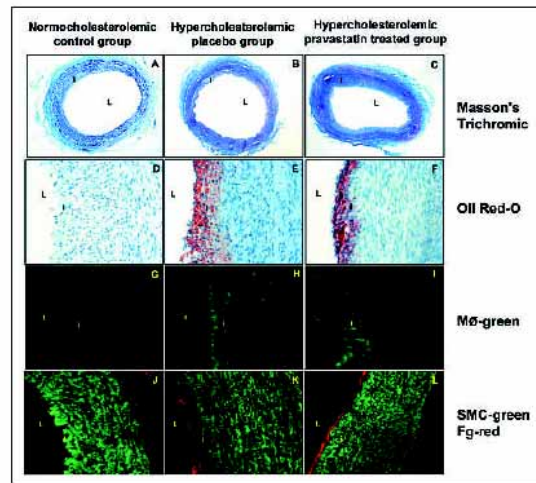


Figure 6: Immunohistochemistry of perfused vessel wall A-C) Representative histological sections (x20) of left descending coronary artery (LAD) stained using Masson's trichrome technique. D-F) Representative microphotographs of sections of LAD (x200) stained for lipids (red) using Oil Red-O technique. G-L) Representative sections of LAD (x200) stained by immunohistochemistry; Macrophages stained in green (G-H) and fibrin(ogen) stained in red (J-L). L, lumen; i, intima.

As previously reported in other animal models with other statins, TF protein expression in the intima of the abdominal aorta was significantly ($P<0.05$) lower in the pravastatin treated group (36.5 ± 19.5 AU) than in the placebo group (148 ± 33.6 AU).

Discussion

It has been previously reported using the Badimon perfusion chamber that pravastatin reduces blood thrombogenicity in hypercholesterolemic patients and that the effect was associated with lipid lowering (12, 13). Our objective in this study has been to test the hypothesis that pravastatin could also have an effect non-attributable to plasma cholesterol reduction. Thrombosis was triggered by damaged vessels at flow shear rate conditions typical of stenotic (70%) arteries. Here we show that pravastatin significantly reduces blood thrombogenicity without a concomitant reduction in plasma lipid levels. Indeed, this effect was not accompanied with a reduction of total plasma cholesterol or LDL cholesterol. These results indicate that the inhibition of platelet thrombus growth is also regulated by factors other than the reduction of plasma cholesterol. RhoA membrane translocation was reduced in the pravastatin treated group indicating a passivation effect in platelet activation, a mechanism that could contribute to the observed effects. By inhibiting mevalonate synthesis, statins affect the synthesis of other important isoprenoid intermediates that induce posttranslational modification of a variety of proteins (36), including small GTP-binding proteins Rho, Ras and Ras-like proteins (37). Each member of the Rho family serves specific functions in terms of cell shape, motility, secretion, and proliferation (38). The adhesive function of many

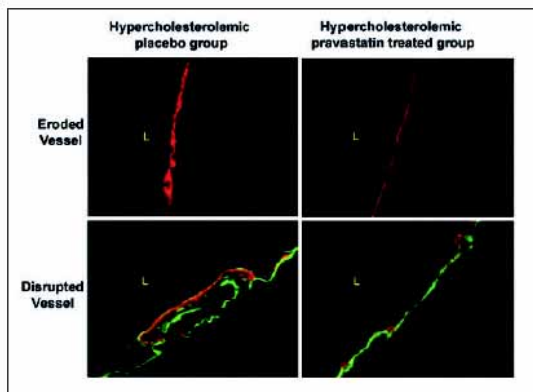


Figure 5: Representative microphotographs (x200) of thrombus formed on eroded and disrupted vessel wall perfused at shear rate conditions mimicking stenotic vessels (70% stenosis) for 5 minutes. Platelets are shown in red and fibrin in green. L: lumen.

filtration (Fig. 6 E, F), intimal SMC (Fig. 6 K, L), minor infiltrates of fibrin(ogen) (superficial) (Fig. 6 K, L), and macrophages (Fig. 6 H, I) could be found in the hypercholesterolemic animals. Normocholesterolemic control animals did not show infiltrates of cells nor proteins in the intima (Fig. 6 D, G, J).

integrins is regulated in part by RhoA activation, which leads to the assembly of actin-myosin stress fibres and focal adhesions. Effects of statins in RhoA have been described previously in vascular cells (39–41). In platelets, RhoA translocation is essential to induce platelet shape change prior to activation (42), and we have previously shown that RhoA membrane translocation is inhibited by NO donors that inhibit platelet deposition (27). Thus inhibition of the mevalonate pathway by statins can interfere with translocation of platelet RhoA from cytoplasm to membrane, passivating platelet activation and function.

In previous experimental studies, inhibition of the increase in cholesterol levels by concomitant administration of a cholesterol-rich diet and statins to normocholesterolemic animals, reduced platelet deposition in association to a reduced lipid level increase (11). In the present study animals received a cholesterol-rich diet for 50 days to render them hypercholesterolemic and then the group was randomly distributed into a group treated with pravastatin and another treated with placebo for 50 additional days. The long term feeding with a cholesterol-rich diet produced a cholesterol clamp model based on intestinal cholesterol absorption with the consequent abrogation of the cholesterol biosynthesis pathway. Hence, statins (inhibitors of synthesis) were not effective in changing plasma levels.

In this study, platelet deposition on the damaged vascular wall was inhibited by sustained pravastatin treatment for 50 days. Inhibition of platelet deposition was achieved on both types of lesions, eroded and ruptured vessels. As shown in the immunohistochemistry studies the prevalent mechanism of inhibition of mural thrombosis was through the reduction of platelet deposition without effects on fibrin monolayer deposition. The effects of inhibiting the increase in cholesterol levels, induced by a hypercholesterolemic diet, by statins was previously evaluated in porcine (11) and rabbit (43) models. The experimental designs of those studies differed from the cholesterol-clamp model used here because cholesterol levels did not increase in statin treated animals as in controls, and the length of the induced-dietary changes was much shorter. Similarly rheological conditions were different because discrete laminar shear rates (212/s and 1690/s) without stenosis were used (11, 43). At any rate, in the different conditions tested by using the perfusion chamber, it has been demonstrated that lowering cholesterol (both in humans and in experimental models) associates with passivation of platelets deposition on damaged vessels (11–13, 43).

On the other hand, *ex vivo* platelet aggregation induced by ADP or collagen was not altered by pravastatin. *In vitro* aggregation requires blood collection in citrate that depletes Ca^{++} from

the sample and analyzes the platelet response to a single agonist. In contrast, platelet deposition in the perfusion system is triggered by vascular wall, in flow conditions that mimic the circulation, and there is no Ca^{++} depletion; therefore Ca^{++} dependent enzymes are fully available. These factors relevant in *in vivo* thrombosis are not accountable for *in vitro* platelet aggregation.

In this study we have used a model of human resemblance that shows a slow development of atherosclerosis. The mild dietary intervention chosen to avoid an excessive increase in plasma lipids, as is the case in the rabbit model, induced mild atherosclerotic lesions in coronaries, as previously reported (44). The hypercholesterolemic animals showed lipid, fibrinogen, SMC, and macrophages in the coronary arteries and not the normocholesterolemic controls. Aortic tissues prone to early development of atherosclerosis, such as the abdominal aorta, were tested for TF synthesis expression by Western blots. TF was significantly reduced in the pravastatin group ($5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) with respect to the placebo. Inhibition of TF synthesis in rabbit aorta with fluvastatin by mechanisms involving impairment of NF- κ B translocation which results in an interference in the transcriptional activation of TF gene has been previously reported (17). The reduced TF expression found in the vascular tissue of the statin-treated animals indicates that statin treatment may induce a general blood (circulatory cells) and vascular anti-thrombotic protective effect.

Pravastatin has shown inhibition of platelet adhesion to mice intestinal venules when given intraperitoneally (16) in an acute pattern of treatment (one injection). Short-term treatment (3 days) with atorvastatin has been shown to reduce biomarkers of platelet activation in human blood (14) while rosuvastatin has shown a reduction in rat platelet activation markers (15). However, the effect on arterial wall triggered thrombosis of a short-term treatment with pravastatin or another statin remains to be investigated.

In conclusion, this study indicates that pravastatin, a statin that has widely demonstrated a high safety and tolerability profile, may be inducing its beneficial effects not only by its lipid lowering activity but additionally by reducing blood thrombogenicity by a mechanism that operates through pathways both dependent (11–13) and independent from its plasma cholesterol lowering effects.

Acknowledgements

This work has been possible thanks to funds provided by SAF 2003 03–187, BMS-Freedom to Discover, Red RECAVA C03–01, Lab. Esteve, S.A., and Fundacion Investigacion Cardiovascular Catalana Occidente.

References

1. 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: 1440–5.
2. Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet* 1994; 344: 1383–9.
3. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996; 348: 1079–82.
4. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; 101:207–13.
5. Corti R, Fayad ZA, Fuster V et al. Effects of lipid-lowering by simvastatin on human atherosclerotic lesions. *Circulation* 2001; 104: 249–52.
6. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG et al. 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: 1711–8.
7. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997; 95: 1126–31.
8. Kwak BR, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 332–8.
9. Aviram M, Hussein O, Rosenblat M et al. Interaction of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-

- CoA reductase inhibitor therapy. *Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 39–45.
10. Broijersens A, Ericsson M, Leijd B et al. No influence of simvastatin treatment on platelet function in vivo in patients with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 273–8.
 11. Alfón J, Royo T, Garcia-Moll X et al. Platelet deposition on eroded vessel walls at a stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1812–7.
 12. Lacoste L, Lam JY, Hung J et al. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation* 1995; 92: 3172–7.
 13. Rauch U, Osende JJ, Chesebro JH et al. Statins and cardiovascular disease: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins. *Atherosclerosis* 2000; 153: 181–9.
 14. Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L et al. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 2005; 111: 412–9.
 15. Schafer A, Fraccarollo D, Eigenthaler M et al. Rosuvastatin reduces platelet activation in heart failure: role of NO bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1071–7.
 16. Taylor A, Lefer DJ, Granger DN. HMG-CoA reductase inhibitor attenuates platelet adhesion in intestinal venules of hypercholesterolemic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1402–7.
 17. Camera M, Toschi V, Comparato C et al. Cholesterol-induced thrombogenicity of the vessel wall: inhibitory effect of fluvastatin. *Thromb Haemost* 2002; 87: 748–55.
 18. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor *in vivo* and *in vitro*. *Circulation* 2001; 103: 276–83.
 19. Baetta R, Camera M, Comparato C et al. 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: 692–8.
 20. Toschi V, Gallo R, Lettino M et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95: 594–9.
 21. Lewis SJ, Sacks FM, Mitchell JS et al. Effect of pravastatin on cardiovascular events in women after myocardial infarction: the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 140–6.
 22. 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: 1357–449.
 23. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2004; 350: 1495–504.
 24. Pfeffer MA, Keech A, Sacks FM et al. Safety and tolerability of pravastatin in long-term clinical trials: Prospective Pravastatin Pooling (PPP) Project. *Circulation* 2002; 105: 2341–6.
 25. Badimon L, Turitto VT, Rosemark JA et al. Characterization of tubular flow chamber for studying platelet interaction with biological and prosthetic materials: deposition of indium 111-labelled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 706–18.
 26. Lipid Research Clinic Program. Manual of Laboratory Operation. DHEW Publ No NIH75–628. Washington DC. May 1974, US Government Printing Office.
 27. Vilahur G, Segales E, Salas E et al. Effects of a novel platelet nitric oxide donor (LA816), aspirin, clopidogrel, and combined therapy in inhibiting flow and lesion-dependent thrombosis in the porcine *ex vivo* model. *Circulation* 2004; 110: 1686–93.
 28. Badimon L, Badimon JJ, Galvez A et al. Influence of arterial damage and wall shear rate on platelet deposition: *ex vivo* study in a swine model. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 312–20.
 29. Badimon L, Badimon JJ. Mechanisms of arterial thrombosis in nonparallel streamlines: platelet thrombi grow on the apex of stenotic severely injured vessel wall. Experimental study in the pig model. *J Clin Invest* 1989; 84: 1134–44.
 30. Mailhac A, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A et al. Effect of an eccentric severe stenosis on fibrin(ogen) deposition on severely damaged vessel wall in arterial thrombosis. Relative contribution of fibrin(ogen) and platelets. *Circulation* 1994; 90: 988–96.
 31. Casani L, Segales E, Vilahur G et al. Moderate daily intake of red wine inhibits mural thrombosis and monocyte tissue factor expression in an experimental porcine model. *Circulation* 2004; 110: 460–5.
 32. Vilahur G, Duran X, Juan-Babot O et al. Anti-thrombotic effects of saratin on human atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost* 2004; 92: 191–200.
 33. Royo T, Alfón J, Berrozpe M et al. Effect of gemfibrozil on peripheral atherosclerosis and platelet activation in a pig model of hyperlipidemia. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 843–52.
 34. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 1990; 85: 1234–41.
 35. Galvez A, Badimon L, Badimon JJ et al. Electrical aggregometry in whole blood from human, pig and rabbit. *Thromb Haemost* 1986; 56: 128–32.
 36. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425–30.
 37. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11: 2295–322.
 38. 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: 459–86.
 39. Laufs U, Endres M, Custodis F et al. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 2000; 102: 3104–10.
 40. Martinez-Gonzalez J, Raposo B, Rodriguez C et al. 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* 2001; 21: 804–9.
 41. Crespo J, Martinez-Gonzalez J, Rius J et al. Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipidemia by interfering with CREB activation. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 333–41.
 42. Schoenwaelder SM, Hughs SC, Boniface K et al. RhoA sustains integrin $\alpha_5\beta_3$ adhesion contacts under high shear. *J Biol Chem* 2002; 277: 14738–46.
 43. Alfón J, Pueyo Palazon C, Royo T et al. Effects of statins in thrombosis and aortic lesion development in a dyslipemic rabbit model. *Thromb Haemost* 1999; 81: 822–7.
 44. Martinez-Gonzalez J, Alfón J, Berrozpe M et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce vascular monocyte chemoattractant protein-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2001; 159: 27–33.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las complicaciones trombóticas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. La aterotrombosis es una enfermedad dinámica y progresiva a la que contribuyen la disfunción endotelial, la inflamación y la trombosis subsiguiente. Su evolución silente se prolonga, en la mayoría de los casos, durante años en los cuales la luz arterial va disminuyendo por acumulación de grasas en las células espumosas en la pared, migración y proliferación de CML que secretan MEC al medio y por la formación de pequeños trombos. Las manifestaciones clínicas de la aterotrombosis se presentan cuando se ven implicadas las arterias coronarias, las arterias carótidas extracraneales o la vasculatura de las extremidades inferiores.

Los valores anormalmente altos de colesterol en plasma están directamente relacionados con la enfermedad coronaria y con el inicio y desarrollo de la aterosclerosis. Es por ello que se considera un factor de riesgo principal y se insiste a la población a disminuir sus niveles, ya que por cada 1% de reducción del colesterol en sangre logrado, el riesgo de un ataque al corazón llega a disminuir en un 2 %.

Además de la influencia de la dieta sobre la enfermedad cardiovascular (principalmente dietas ricas en grasas saturadas o hidrogenadas), existen otros factores que también influyen, como la vida sedentaria, la obesidad, menopausia, el exceso de triglicéridos, la hipertensión arterial, diabetes, hipotirodismo, hábito de fumar, etc. Por esta razón las terapias indicadas a pacientes a los que se les debe reducir el colesterol incluyen cambios en el estilo de vida (mejoras en la alimentación, ejercicio físico) y la administración de fármacos hipolipemiantes.

En los últimos años, los avances en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares han permitido aumentar la supervivencia de los afectados. Pero la prevalencia de la enfermedad sigue aumentando.

La tesis doctoral que se presenta se ha centrado en el estudio de las dos primeras estrategias de prevención cardiovascular y sus efectos en la complicación trombótica. Los beneficios que pueden obtenerse con su aplicación permitirían reducir la prevalencia de eventos coronarios ya que ambas estrategias actúan a través de diferentes mecanismos que convergen en una reducción del riesgo trombótico.

La cámara de perfusión Badimon, sistema *ex vivo*, ha sido el diseño experimental utilizado en el presente trabajo para evaluar la eficacia de estas estrategias preventivas en la reducción de la deposición plaquetar (formación del trombo). Este sistema, ampliamente utilizado en el área cardiovascular (Badimon L, 1986; Fernández-Ortiz A, 1994; Badimon JJ, 1999; Lev EI, 2004; Osende JI, 2004; Schechter M, 2000), supone un paso obligado para la comprensión de los mecanismos que participan en la trombogénesis (ya que permite modular la mayoría de los parámetros, sobre todo las condiciones de flujo y el sustrato reactivo), así como para la evaluación de posibles agentes antitrombóticos (Hanson SR, 1998).

La ventaja principal del estudio de la deposición plaquetar en una cámara de perfusión (sistema *ex vivo*) sobre los sistemas de agregación *in vitro*, tales como la turbidimetría (en PRP) o impedancia (sangre total), es el permitir el modelado de las condiciones de flujo que existen *in vivo*; así, 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, los agonistas son exógenos y la sangre es recogida con anticoagulantes, lo que disminuye la presencia de calcio libre.

En relación a los sistemas *in vivo* (inducción de una lesión vascular que simule la aterosclerosis o una lesión producida tras la rotura de una placa y modelos de reducción del flujo coronario), su principal ventaja es que permiten controlar no sólo la velocidad de cizalladura (determinada por el grosor del canal), sino también el vaso que se expone. Por el contrario, estas mismas variables no

pueden ser controladas en los experimentos in vivo, ya que no pueden evaluarse los procesos de vasoconstricción y vasorelajación.

En cuanto a posibles inconvenientes de este modelo ex vivo, uno de los principales sería el hecho de que, en los sistemas de perfusión extracorpóreos, 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 el fibrinógeno respecto a los valores basales (Badimon L, 1986).

La utilización del modelo porcino con hipercolesterolemia inducida por la dieta permite el control de muchos parámetros que en los estudios de intervención con voluntarios o en los estudios retrospectivos pueden desviar los resultados, así como la inducción de un medio más trombogénico y similar al de los pacientes con riesgos.

ARTÍCULO I: "Moderate daily intake of red wine inhibits mural thrombosis and monocyte tissue factor expression in an experimental porcine model".

Los resultados presentados en el artículo demuestran que el consumo moderado de vino tinto junto a las comidas inhibe de una manera significativa la deposición plaquetaria sobre pared vascular dañada. El efecto inhibitor se muestra de manera más efectiva administrando una dosis de 40g alcohol/día que con una dosis más baja (20g/día) aunque no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambas dosis estudiadas.

La deposición plaquetar aumenta dependiendo de la severidad de la lesión y del tiempo de perfusión y siempre hay una deposición de plaquetas mayor en las perfusiones a alta velocidad de cizalladura que en las de baja velocidad, tal y como se ha descrito anteriormente (Badimon L, 1986). La misma distribución dependiente del tiempo se ha observado en los grupos que ingieren vino, pero en una cantidad menor, lo que sugiere que la reducción en la deposición plaquetaria es, probablemente, debida a un efecto de *pasivación* de la actividad de las plaquetas más que a otros factores relacionados directamente con la cascada de coagulación.

Es probable que los polifenoles presentes en el vino sean los responsables de este efecto inhibitor. Se ha descrito que diferentes flavonoides modifican el metabolismo del cAMP mediante la inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa (Landolfi R, 1984). También se ha demostrado que el resveratrol y diversos flavonoides, son capaces de inhibir el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular libre ($[Ca]_i^{2+}$), tras la activación de la plaqueta por diferentes agonistas. El aumento del $[Ca]_i^{2+}$ es esencial en el proceso de agregación plaquetar. Los polifenoles pueden actuar inhibiendo la movilización interna de Ca^{2+} , desde el retículo endoplasmático, o inhibiendo el influjo del Ca^{2+} extracelular al interior de la plaqueta (Dobrydneva Y, 1999) una vez está activada por agonistas. Esta disminución en la disponibilidad total de $[Ca]_i^{2+}$ limita, entre otros, la activación de RhoA (y también Rab4) impidiendo así los cambios citoesqueléticos y la secreción de los gránulos densos (Rab4) (Heger CD, 2004); procesos que se traducen en una disminución de la deposición plaquetar. En nuestro estudio hemos encontrado que el consumo de vino tinto reduce la expresión de RhoA en la

membrana plaquetar (forma activa) y la incrementa en el citoplasma (forma inactiva), lo que apoyaría esta teoría de la "pasivación" de las plaquetas. RhoA es esencial en el cambio conformacional de la plaqueta tras su activación, así que la reducción de la expresión de RhoA en su forma activa en la membrana de la plaqueta en los animales que ingieren vino nos induce a pensar en un efecto reductor de la actividad de la plaqueta inducido por el vino.

El alcohol y los polifenoles han demostrado inhibir la agregación plaquetar. En nuestro estudio la agregación plaquetaria no muestra diferencias entre los grupos, aunque hay cierta tendencia en los animales que ingieren vino a presentar una menor reactividad de las plaquetas. La ingesta de alcohol también afecta la actividad plaquetaria indirectamente a través de una estimulación de la prostaciclina, un potente vasodilatador y antiagregante, mediada por HDL. Los flavonoides inhiben la producción de Tromboxano A₂ tal vez inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa (Mower R, 1984) o tal vez promoviendo un aumento de la fluidez de la membrana de la plaqueta. De todas maneras una dieta rica en ácidos grasos saturados, como la ingerida por los animales del estudio, disminuye la fluidez de la membrana plaquetar; ésta puede ser la razón por la cual el vino no disminuye la agregación plaquetaria en nuestro estudio. El estudio *Lyon Heart* (de Lorgeril, 1999; 1999b) controla pacientes que han sufrido un infarto miocárdico y los divide según la dieta que ingieren, mediterránea o industrializada con vino. No han encontrado diferencias en la agregación plaquetaria entre ambos grupos, pero hipotetizan que en la dieta típica de países desarrollados (*Western Type*), rica en grasas saturadas, el vino "normaliza" el efecto negativo de las grasas. Nuestros resultados apoyan y extienden dichos resultados clínicos. La utilización del sistema de la cámara de perfusión permite que el sistema de coagulación pueda activarse con lo que es posible observar todos los aspectos de la trombosis y su contribución a la deposición plaquetar. Analizando la agregación plaquetar, solamente se utiliza un agonista de un determinado receptor o un inductor de una determinada vía de activación, sólo podremos observar los efectos del vino sobre un único agente y no podremos comprobar las interacciones ni la totalidad del efecto.

Nuestro estudio demuestra por primera vez que el consumo de vino reduce la expresión de FT en monócitos activados por LPS. En estudios anteriores se había demostrado el efecto del resveratrol en la expresión de FT en células endoteliales

humanas o en estudios *in vitro* utilizando elevadas dosis del compuesto (Di Santo A, 2003). Estos resultados son importantes ya que muestran una disminución del estado protrombótico general gracias a la ingesta de vino. El FT circulante se sitúa en la zona de desarrollo del trombo donde contribuye sustancialmente en la activación plaquetar mediante la generación de trombina. El tipo y tamaño de la lesión vascular puede influenciar la deposición y activación del FT circulante y en consecuencia en el crecimiento del trombo.

La reducción de los niveles plasmáticos de colesterol ha sido la piedra angular en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Estudios epidemiológicos han relacionado el consumo moderado de vino tinto con un efecto antioxidante del suero y de las LDL, aumentando además la concentración plasmática de HDL en los bebedores moderados (Lavy A, 1994). Los estudios de intervención realizados con individuos sanos y normolipémicos (Deschamps V, 1999) muestran unos resultados controvertidos con respecto al consumo de bebidas alcohólicas ya que no pueden controlar totalmente el grado de ingesta de alcohol, la actividad física o los hábitos particulares de los participantes. A pesar de ello, los estudios mantienen la teoría de una ingesta moderada de vino tinto, mejor que un exceso o una abstinencia, reduce el nivel de cLDL y aumenta el de cHDL (Rimm EB, 1999; Zhang QH, 2000). En nuestro estudio hemos encontrado que el consumo de vino no aumenta ni reduce de manera significativa el cHDL, ni el CT, ni el LDL. De todas maneras, si analizamos el Índice de Riesgo Aterogénico (cLDL/cHDL) los animales con ingesta diaria de vino muestran una clara reducción de este valor lo que indica que el vino puede ejercer también un efecto beneficioso en el perfil lipídico. Aunque este cambio no explicaría todos los beneficios observados por el consumo de vino tinto. Recientemente se ha demostrado que el incremento de los niveles de HDL sólo explicaría el 50% de los efectos beneficiosos del consumo de vino tinto, el otro 50% podría estar relacionado con la disminución de la oxidación de las partículas LDL, cambios en la actividad de las plaquetas, reactividad del endotelio, etc.

En la patogénesis de la aterosclerosis las partículas LDL se oxidan e inducen la formación de células espumosas que aumentan la formación de la lesión. Las terapias antioxidantes se han propuesto como tratamiento a este fenómeno y los compuestos fenólicos del vino han mostrado su capacidad antioxidante *in vitro*

(Frankel EN, 1993; Miyagi Y, 1997; Meyer AS, 1997) e *in vivo* (Whitehead T, 1995). Aunque también se han realizado estudios con individuos sanos durante un período de 2 ó 4 semanas (Fuhrman B, 1996; van Golde P, 1999) en los cuales el efecto pro-oxidante del etanol es predominante sobre el antioxidante de los fenoles. En nuestro modelo de dislipemia experimental hemos encontrado resultados cuanto menos que controvertidos. El grupo que ha ingerido la dosis baja de vino tinto presenta una reducción en la cantidad de dienos conjugados formados y una reducción en la velocidad de formación de éstos; la absorbancia máxima (utilizada para calcular Max DC) y la pendiente muestran también una reducción estadística, pero el Tiempo de Latencia, aún mostrando una clara reducción, no llega a la significancia estadística. En los grupos que ingieren más cantidad de vino, y por tanto de alcohol, los efectos antioxidantes de los polifenoles del vino pueden estar enmascarados por los pro-oxidantes del alcohol, de manera que la mejora en los parámetros oxidativos no es tan evidente. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Xia (Xia J, 1998) utilizando un modelo dislipémico en rata. En consecuencia, el balance entre el contenido alcohólico y polifenólico del vino puede ser crítico para los efectos beneficiosos *in vivo* sobre las LDL.

Tras los 100 días de dieta y consumo de vino tinto es de destacar que los parámetros hematológicos estudiados (RBC, HTO, MCV, MCH, HGB, WBC), así como los bioquímicos (AST, ALT, CREA, BUN) y de coagulación (FBG, aPTT, PT) no muestran diferencia significativa entre los grupos de estudio y se encuentran dentro de los rangos normales para su especie.

Considerando que la trombosis es una parte integral de la aterosclerosis y de la enfermedad coronaria es posible que la disminución en el riesgo de EC asociada al consumo moderado de vino tinto sea debido a una combinación entre los efectos vasculares y los anti-trombóticos. Hemos visto que el consumo de vino reduce la deposición plaquetar, la expresión de FT en monócitos, la traslocación de RhoA a membrana y el estado antioxidante general lo que confirmaría los beneficios cardiovasculares del consumo moderado de vino.

ARTÍCULO II: "Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering".

Se ha comprobado que la administración de estatinas a pacientes hiperlipémicos reduce los niveles plasmáticos de colesterol y esta disminución va asociada a una reducción de la deposición plaquetar en la cámara de perfusión Badimon (Lacoste L, 1995). En este trabajo se muestra que la pravastatina también reduce la deposición plaquetar independientemente de una disminución de los valores plasmáticos de lípidos. Para demostrar este efecto se indujo una hipercolesterolemia durante 50 días a los animales y después se les continuó alimentando por 50 días más la misma dieta hipercolesterolémica junto con una dosis de 5mg/kg de pravastatina. Al finalizar el periodo experimental se evaluó el riesgo trombótico utilizando la cámara de perfusión. Los resultados demuestran que la pravastatina reduce significativamente la deposición plaquetar en condiciones de flujo que simulan arterias coronarias severamente estenosadas. Esta reducción es significativa en todos los sustratos estudiados (lesión vascular ligera y severa) y en todos los tiempos perfundidos. El estudio de la deposición axial muestra una disminución significativa en la deposición plaquetaria del fragmento b (en este modelo de perfusión es el fragmento con más estenosis). En los animales hipercolesterolémicos tratados con pravastatina la cantidad depositada de plaquetas es similar a la depositada por los animales normocolesterolémicos. En los estudios inmunohistoquímicos se observa que el mecanismo prevalente de inhibición de la trombosis mural es mediante la reducción de la deposición plaquetar, sin observarse efectos en el tamaño de la monocapa de fibrina. Estos resultados sugieren que la pravastatina tiene un efecto "pasivante" sobre la plaqueta reduciendo la hiperreactividad provocada por la hipercolesterolemia. El estudio de la expresión de la proteína RhoA muestra una reducción en la translocación a membrana, un mecanismo que contribuiría a este efecto. Las estatinas inhiben la vía del mevalonato y con ello la síntesis endógena de colesterol y de las proteínas isopreniladas a las que pertenece RhoA. La expresión de algunas integrinas de adhesión (Schoenwaelder SM, 2002), así como los cambios conformacionales anteriores a la activación de la plaqueta, está regulada por RhoA. La inhibición de la translocación y activación de RhoA en la

membrana de la plaqueta de los animales tratados con pravastatina explicaría la reducción encontrada en la deposición plaquetaria.

La agregación plaquetaria no se ve afectada por el tratamiento con estatinas. Ya hemos explicado que la estimulación *in vitro* de las plaquetas con un único agonista no permite observar las diferentes vías de activación y agregación de las plaquetas, ni las interacciones entre la sangre (constituyentes solubles y celulares), la pared vascular (respuestas fijas y dinámicas) y el flujo sanguíneo.

Las estatinas reducen la síntesis endógena de colesterol. En este modelo de estudio la administración de dieta hipercolesterolémica durante 50 días eleva los niveles plasmáticos de colesterol. El tratamiento posterior con pravastatina durante 50 días más y sin reducir la ingesta de colesterol no es capaz de reducir de una manera significativa los niveles plasmáticos de colesterol, ya que sólo inhibe la biosíntesis endógena de colesterol, mientras que la absorción intestinal de colesterol y grasas saturadas se mantiene.

Se trata de un modelo muy similar al humano ya que el patrón dietético elegido y la duración del mismo no son demasiado intensos, pero sí lo suficientes para no provocar un aumento medido de los lípidos plasmáticos. En consecuencia, las lesiones ateroscleróticas que provoca la hipercolesterolemia en las coronarias y en la aorta abdominal también son ligeras (entre Tipo II y III), con lo cual, los cambios en los parámetros estudiados en la pared vascular son menores y no se observan diferencias significativas debidas al tratamiento con pravastatina. Pero sí se observa una reducción de la expresión del FT en la pared vascular de los animales tratados con pravastatina respecto a los placebo, lo que concuerda con los resultados de Camera (Camera M, 2002) utilizando fluvastatina en conejos hiperlipémicos. Esta reducción en la expresión de FT en la pared vascular de los animales tratados con estatinas indica que el tratamiento con estatinas ejerce un efecto anti-trombótico tanto en pared vascular como en sangre circulante.

Este estudio indica que el tratamiento con pravastatina, un fármaco de alta eficacia y tolerabilidad demostrada, ejerce sus efectos beneficiosos no sólo mediante sus cualidades hipolipemiantes, sino también reduciendo el riesgo trombótico por mecanismos dependientes e independientes de la disminución del colesterol plasmático.

DISCUSIÓN CONJUNTA.

El consumo moderado de vino y el tratamiento con pravastatina son capaces de disminuir el riesgo trombótico en condiciones de hipercolesterolemia sostenida, es decir, sin disminuir el aporte externo de colesterol y grasas saturadas. Esto significa que también actúan por mecanismos independientes a la disminución del colesterol plasmático.

La trombosis arterial es parte integral de las complicaciones agudas de la aterosclerosis y su génesis depende de factores como la naturaleza de la sangre circulante (celularidad y sustancias solubles), la superficie vascular y las condiciones hemodinámicas del flujo sanguíneo. La hipercolesterolemia aumenta la hiperactividad de las plaquetas y por ende, la trombogenicidad sanguínea. En ambos artículos los resultados del estudio de perfusión siguen el mismo patrón de deposición plaquetaria que sus respectivos controles no tratados, pero la cantidad de plaquetas depositada es menor. Esto sugiere que el principal mecanismo de actuación de ambos productos se debe a un efecto "*pasivante*" de la actividad de las plaquetas. Con la utilización de la cámara de perfusión tubular podemos controlar la lesión de la superficie vascular expuesta y las velocidades de flujo a las que se perfunde la sangre. De manera que la única variable es la sangre (componentes celulares y sustancias solubles) de los animales que se está perfundiendo y es donde radican los beneficios del vino y de la pravastatina. El estudio de la expresión de RhoA permite concluir que, aunque por diferentes mecanismos, el vino y la pravastatina están disminuyendo las posibilidades de activación de la plaqueta al interferir en los mecanismos del cambio de forma necesarios para la activación plaquetaria. Los resultados inmunohistoquímicos realizados sobre los sustratos perfundidos muestran en ambos estudios que el mecanismo prevalente de inhibición de la trombosis mural es mediante la reducción de la deposición plaquetar, sin observarse efectos en el tamaño de la monocapa de fibrina. Confirmando la disminución de la actividad de la plaqueta.

Esta "*pasivación*" o reducción de la actividad de las plaquetas se combina, en el caso del consumo de vino, con una disminución del FT asociado a los monócitos circulantes y a un aumento en la síntesis de prostaciclina (datos aún no

publicados). Factores que contribuyen a reducir la trombogenicidad sanguínea. En el estudio realizado con pravastatina no disponemos de estos resultados.

Históricamente se ha asociado el beneficio cardiovascular de las estatinas y del consumo moderado de vino a una reducción de la aterosclerosis, a través de la disminución del colesterol plasmático y la mejora en el perfil lipídico. Sin embargo con estos trabajos hemos demostrado que la disminución del riesgo trombótico mediante la disminución de la reactividad de las plaquetas sucede con mayor prontitud que la posible reducción de las lesiones y por supuesto que la estabilización de la placa (ya que requiere, según estudios angiográficos, de 1 a 2 años). Pese a que en el modelo de investigación utilizado la hipercolesterolemia sea mantenida la pravastatina y el vino tinto muestran una ligera mejoría en el perfil lipídico y una clara mejora en los parámetros oxidativos.

Respecto a los efectos en la pared vascular de los animales no podemos mostrar un claro beneficio de las estrategias estudiadas puesto que las lesiones en la pared son leves debido a la corta duración del estudio. Se trata de animales jóvenes, a los que se les induce una hipercolesterolemia moderada durante un tiempo relativamente corto. Aún así en todos los parámetros estudiados se observa un ligero beneficio (disminución de la extensión de la lesión, del área teñida, del ratio íntima-media). Ya hemos aclarado que el tratamiento con pravastatina durante 50 días (y concomitante a la ingesta de dieta hipercolesterolémica) no es capaz de contrarrestar la lesión inducida durante los 50 días iniciales de dieta hipercolesterolémica.

Resultados obtenidos últimamente en nuestro laboratorio permiten afirmar que la ingesta moderado de vino tinto (40g alcohol/día) en animales normocolesterolémicos reduce la deposición plaquetaria a los 21 días de consumo. En otro estudio agudo de trombosis (una única ingesta de vino junto con el pienso) la deposición plaquetaria no alcanzó significación estadística, pero sí se obtuvo una disminución en la expresión de FT en monócitos estimulados. Estos resultados permiten recomendar también el consumo (siempre prudente) de vino tinto en

pacientes sin factores de riesgo, puesto que una sola toma es capaz de aportar beneficios en la prevención del riesgo trombótico.

Respecto a los beneficios inmediatos del tratamiento con pravastatina sobre el riesgo trombótico está pendiente la realización de estudios en situaciones de normocolesterolemia que permitan evaluar los efectos de las estatinas en la trombosis arterial en un período de tratamiento más corto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados que se han presentado en esta tesis se puede concluir que:

1. El consumo moderado de vino tinto y el tratamiento con pravastatina, en condiciones de hipercolesterolemia inducida por la dieta, reducen la respuesta plaquetaria desencadenada por diferente lesión vascular (ligera y severamente dañada), bajo condiciones hemodinámicas típicas de arterias coronarias ligera y moderadamente estenosadas (212 s^{-1} y 1690 s^{-1}).
2. La reducción de la expresión de RhoA en la membrana plaquetaria (proteína implicada en la expresión de receptores de agregación en la superficie) y la no modificación de los parámetros del estudio de la coagulación y de la agregación plaquetaria *ex vivo*, sugieren que ambas estrategias actúan mediante un mecanismo dependiente de la interacción plaqueta-pared vascular.
3. En el modelo de hipercolesterolemia inducida por la dieta no se observa una reducción significativa de los valores séricos de colesterol total ni de cLDL, así como tampoco un aumento (en el caso del vino tinto) de cHDL, aunque el índice aterogénico muestra una beneficiosa reducción.
4. La pravastatina reduce la expresión en la pared vascular de Factor Tisular.
5. Ni el tamaño ni la composición de la lesión se ven significativamente reducidos por el consumo de vino tinto o por el tratamiento con pravastatina. Los estudios de inmunohistoquímica confirman que la disminución en la deposición plaquetaria es el mecanismo prevalente de acción de ambas estrategias estudiadas.

REFERENCIAS

a

- Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC, Voglic SJ, Rabkin E, Fukumoto Y, Schoen FJ, Witztum JL, Libby P. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation*. 2002 Sep 10;106(11):1390-6.
- Alfon J, Guasch JF, Berrozpe M, Badimon L. (a). Nitric oxide synthase II (NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening. Preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*. 1999 Aug;145(2):325-31.
- Alfon J, Pueyo Palazon C, Royo T, Badimon L. (b). Effects of statins in thrombosis and aortic lesion development in a dyslipemic rabbit model. *Thromb Haemost*. 1999 May;81(5):822-7.
- Alfon J, Royo T, Garcia-Moll X, Badimon L. Platelet deposition on eroded vessel walls at a stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Jul;19(7):1812-7.
- Anitskchow N, Chalатов S. Über experimentelle cholesterinase und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse; *Zentralbl Allg Pathol Anat* 1913; 24:1.
- ARIC: Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, Patsch W; Atherosclerosis Risk in Communities Study Group. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2001 Sep 4;104(10):1108-13.
- ARIC: Wattanakit K, Folsom AR, Chambless LE, Nieto FJ. Risk factors for cardiovascular event recurrence in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am Heart J*. 2005 Apr;149(4):606-12.

b

- Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation*. 1993 Mar;87(3 Suppl):II3-16.
- Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, Badimon L. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*. 1999 Apr 13;99(14):1780-7.
- 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, Turitto VT, Fuster V. Thrombosis: studies under flow conditions. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;516:527-40.
- 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 Dec;110(6):706-18. Erratum in: *J Lab Clin Med* 1988 Jan;111(1):5.
- Badimon L, Badimon JJ. Mechanisms of arterial thrombosis in nonparallel streamlines: platelet thrombi grow on the apex of stenotic severely injured vessel wall. Experimental study in the pig model. *J Clin Invest*. 1989 Oct;84(4):1134-44.
- Badimon L, Badimon JJ, Fuster V. Thrombogenesis and inhibition of platelet aggregation. Experimental aspects and future approaches. *Z Kardiol*. 1990;79 Suppl 3:133-45. Review
- Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation*. 1992;86:III74-85.
- Badimon L, Badimon JJ, Vilahur G, Segales E, Llorente V. Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002 Sep-Dec;32(5-6):225-31
- Ballantyne CM, Olsson AG, Cook TJ, Mercuri MF, Pedersen TR, Kjekshus J. Influence of low high-density lipoprotein cholesterol and elevated triglyceride on

- coronary heart disease events and response to simvastatin therapy in 4S. *Circulation*. 2001 Dec 18;104(25):3046-51.
- Bastida E, Escolar G, Ordinas A, Sixma JJ. Fibronectin is required for platelet adhesion and for thrombus formation on subendothelium and collagen surfaces. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1437-42.
- Berk BC, Taubman MB, Cragoe EJ Jr, Fenton JW 2nd, Griendling KK. Thrombin signal transduction mechanisms in rat vascular smooth muscle cells. Calcium and protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*. 1990 Oct 5;265(28):17334-40.
- Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch AT, Ikeda Y, Mas JL, Goto S, Liao CS, Richard AJ, Rother J, Wilson PW; REACH Registry Investigators. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA*. 2006 Jan 11;295(2):180-9.
- Bodie SL, Ford I, Greaves M, Nixon GF. Thrombin-induced activation of RhoA in platelet shape change. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Sep 14;287(1):71-6.
- Boyle JJ, Bowyer DE, Weissberg PL, Bennett MR. Human Blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Sep;21(9):1402-7.
- Buchwald H, Matts JP, Fitch LL, Campos CT, Sanmarco ME, Amplatz K, Castaneda-Zuniga WR, Hunter DW, Pearce MB, Bissett JK, et al. Changes in sequential coronary arteriograms and subsequent coronary events. Surgical Control of the Hyperlipidemias (POSCH) Group. *JAMA*. 1992 Sep 16;268(11):1429-33.
- Burleigh MC, Briggs AD, Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. *Atherosclerosis*. 1992 Sep;96(1):71-81.

C

- Calara F, Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, Kupfer J, Hedin U, Forrester J, Shah PK, Nilsson J. Autocrine induction of DNA synthesis by mechanical injury of

- cultured smooth muscle cells. Potential role of FGF and PDGF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Feb;16(2):187-93.
- Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis.* 1998 Aug;139(2):205-22.
- Camejo G. Hydrolytic enzymes released from resident macrophages and located in the intima extracellular matrix as agents that modify retained apolipoprotein B lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Aug 1;23(8):1312-3.
- Camera M, Toschi V, Comparato C, Baetta R, Rossi F, Fuortes M, Ezekowitz MD, Paoletti R, Tremoli E. Cholesterol-induced thrombogenicity of the vessel wall: inhibitory effect of fluvastatin. *Thromb Haemost.* 2002 Apr;87(4):748-55.
- Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of *Blood* coagulation. *Thromb Res.* 1996 Jan 1;81(1):1-41. Review.
- Canto JG, Shlipak MG, Rogers WJ, Malmgren JA, Frederick PD, Lambrew CT, Ornato JP, Barron HV, Kiefe CI. Prevalence, clinical characteristics, and mortality among patients with myocardial infarction presenting without chest pain. *JAMA.* 2000 Jun 28;283(24):3223-9.
- CARE: Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al, for the Cholesterol And Recurrent Events (CARE) Trial Investigators. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med.* 1996;335:1001-1009.
- Choudhury RP, Fuster V, Fayad ZA. Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Nov;3(11):913-25. Review.
- Crespo J, Martinez-Gonzalez J, Rius J, Badimon L. Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by interfering with CREB activation. *Cardiovasc Res.* 2005 Aug 1;67(2):333-41.
- Curfman GD. Is exercise beneficial--or hazardous--to your heart? *N Engl J Med.* 1993 Dec 2;329(23):1730-1.

d

- Da Luz PL, Serrano Junior CV, Chacra AP, Monteiro HP, Yoshida VM, Furtado M, Ferreira S, Gutierrez P, Pileggi F. The effect of red wine on experimental

- atherosclerosis: lipid-independent protection. *Exp Mol Pathol.* 1999 Feb;65(3):150-9.
- Dangas G, Badimon JJ, Smith DA, Unger AH, Levine D, Shao JH, Meraj P, Fier C, Fallon JT, Ambrose JA. Pravastatin therapy in hyperlipidemia: effects on thrombus formation and the systemic hemostatic profile. *J Am Coll Cardiol.* 1999 Apr;33(5):1294-304.
- Davies MJ, Bland JM, Hartfartner JRW, Angelini A, Thomas AC. Factors influencing the presence or absence of acute coronary artery thrombi in suffer ischemic death. *Eur Heart J.* 1989;10:203-208.
- Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993;69:377-381.
- Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J.* 1985;53:363-373.
- Davies MJ. Going from immutable to mutable atherosclerotic plaques. *Am J Cardiol.* 2001;88:2F-9F.
- Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation.* 1996;94:2013-2020.
- Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation.* 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III39-43. Review.
- De Caterina R. Inflammation and early events in atherogenesis. *Cardiologia.* 1999 Dec;44 Suppl 1(Pt 1):109-15. Review.
- Deschamps V, Charles MA, Borys JM, Lafay L and the Fleuerbaix- Laventie Ville Santé Study Group. Alcoholic beverage and lipid profile in 520 middle age people of northern France. *DALM* 2001
- Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation.* 1995 Feb 15;91(4):1182-8.
- Dickson BC, Gotlieb AI. Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Pathol.* 2003 Sep-Oct;12(5):237-48. Review.
- Di Santo A, Mezzetti A, Napoleone E, Di Tommaso R, Donati MB, De Gaetano G, Lorenzet R. Resveratrol and quercetin down-regulate tissue factor expression by human stimulated vascular cells. *J Thromb Haemost.* 2003 May;1(5):1089-95.

- 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 Jul;109(1):389-95.
- Drew AF, Davenport P, Apostolopoulos J, Tipping PG. Tissue factor pathway inhibitor expression in atherosclerosis. *Lab Invest.* 1997 Oct;77(4):291-8.
- Dobrydneva Y, Williams RL, Blackmore PF. *trans*-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br J Pharmacol.* 1999 Sep;128(1):149-57.
- Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation.* 1999 Jun 29;99(25):3227-33.

e

- Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost.* 1991 Jul 12;66(1):67-79. Review.
- Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol.* 1986 Apr;123(1):86-94.
- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA.* 2004 Sep 22;292(12):1440-6.

f

- Falk E, Fernandez-Ortiz A. Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol.* 1995 Feb 23;75(6):3B-11B. Review.
- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995 Aug 1;92(3):657-71.

- Falk E. Why do plaques rupture?. *Circulation*. 1992 Dec;86 (6 Suppl):III30-42. Review.
- Fernandez-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 Jun;23(7):1562-9.
- Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*. 1991 Sep 6;253(5024):1129-32.
- FRAMINGHAM STUDY. Gordon T, Kannel WB. Drinking habits and cardiovascular disease: The Framingham Study. *Am Heart J* 105: 667-673.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457 (1993)
- Frishman WH, Lazar EJ. Reduction of mortality, sudden death and non-fatal reinfarction with beta-adrenergic blockers in survivors of acute myocardial infarction: a new hypothesis regarding the cardioprotective action of beta-adrenergic blockade. *Am J Cardiol*. 1990 Nov 6;66(16):66G-70G. Review.
- Frojmovic M, Nash G, Diamond SL. Definitions in biorheology: cell aggregation and cell adhesion in flow. Recommendation of the Scientific Subcommittee on Biorheology of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 2002 Apr;87(4):771.
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*. 1995 Mar;61(3):549-54.
- Fuster V, Bowie RJW, Lewis JC, Fass DN, Owen CA Jr, Brown AL. Resistance to atherosclerosis in pigs with Von-Willebrand's disease. Spontaneous and high-cholesterol diet-induced arteriosclerosis. *J Clin Invest*. 1978;61:722-730.
- Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation*. 1990; 82: II47-59.
- Fuster V, Badimon JJ, Badimon L (a). Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression. *Circulation*. 1992;86:III1-III11.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH (b). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. Parts 1 and 2, 1992;326:242-250, 310-318.

Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 20;46(6):937-54. Review.

g

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 Nov;15(11):1995-2002.

Geyer M, Wittinghofer A. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 1997 Dec;7(6):786-92. Review.

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 U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2311-5.

Gimbrone MA Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):722-6. Review

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987 May 28;316(22):1371-5.

Goldenberg I, Jonas M, Tenenbaum A, Boyko V, Matetzky S, Shotan A, Behar S, Reicher-Reiss H; Bezafibrate Infarction Prevention Study Group. Current smoking, smoking cessation, and the risk of sudden cardiac death in patients with coronary artery disease. *Arch Intern Med*. 2003 Oct 27;163(19):2301-5.

Guía Europea de Prevención Cardiovascular en la práctica clínica. Adaptación Española del CEIPC (Comité Español Interdisciplinario de Prevención CV), 2004. *Rev Esp Salud Publica*. 2004 Jul-Aug;78(4):435-8.

h

- Hambrecht R, Niebauer J, Marburger C, Grunze M, Kalberer B, Hauer K, Schlierf G, Kubler W, Schuler G. Various intensities of leisure time physical activity in patients with coronary artery disease: effects on cardiorespiratory fitness and progression of coronary atherosclerotic lesions. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Aug;22(2):468-77.
- Hanson SR, Sakariassen KS. Blood flow and antithrombotic drug effects. *Am Heart J*. 1998 May;135(5 Pt 2 Su):S132-45. Review.
- Heger CD, Collins RN. Platelet activation and "Crossover Appeal": rab and rho families United by common links to serotonin. *Mol Interv*. 2004 Apr;4(2):79-81
- Hernandez RH, Armas-Hernandez MJ, Velasco M, Israili ZH, Armas-Padilla MC. Calcium antagonists and atherosclerosis protection in hypertension. *Am J Ther*. 2003 Nov-Dec;10(6):409-14. Review.
- Hindriks G, Ijsseldijk MJ, Sonnenberg A, Sixma JJ, de Groot PG. Platelet adhesion to laminin: role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood*. 1992 Feb 15;79(4):928-35.
- Hjalmarson A, Gilpin EA, Kjekshus J, Schieman G, Nicod P, Henning H, Ross J Jr. Influence of heart rate on mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1990 Mar 1;65(9):547-53.
- Honolulu Heart Study. Blackwelder WC, Yano K, Rhoads GG, Kagan A, Gordon T, Palesch Y. Alcohol and mortality: the Honolulu Heart Study. *Am J Med* 1980; 68:164-169.
- Horton DB, Libby P, Schonbeck U. Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Dec;947:329-36.
- Houdijk WP, Sakariassen KS, Nievelstein PF, Sixma JJ. Role of factor VIII-von Willebrand factor and fibronectin in the interaction of platelets in flowing *Blood* with monomeric and fibrillar human collagen types I and III. *J Clin Invest*. 1985 Feb;75(2):531-40.
- Hutter R, Carrick FE, Valdiviezo C, Wolinsky C, Rudge JS, Wiegand SJ, Fuster V, Badimon JJ, Sauter BV. Vascular endothelial growth factor regulates

reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury. *Circulation*. 2004 Oct 19;110(16):2430-5.

j

Johansen D, Friis K, Skovenborg E, Gronbaek M. Food buying habits of people who buy wine or beer: cross sectional study. *BMJ*. 2006 Jan 20.

k

Kaikita K, Ogawa H, Yasue H, Takeya M, Takahashi K, Saito T, Hayasaki K, Horiuchi K, Takizawa A, Kamikubo Y, Nakamura S. Tissue factor expression on macrophages in coronary plaques in patients with unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Oct;17(10):2232-7.

Kalafatis M, Takahashi Y, Girma JP, Meyer D. Localization of a collagen-interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues Gly 911 and Glu 1,365. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1577-83.

Kanthou C, Parry G, Wijelath E, Kakkar VV, Demoliou-Mason C. Thrombin-induced proliferation and expression of platelet-derived growth factor-A chain gene in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1992 Dec 14;314(2):143-8.

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 Jun 1;91(11):4216-23.

Keys A, Mickelsen O, Miller EO, Chapman CB. The relation in man between cholesterol levels in the diet and in the *Blood*. *Science*. 1950 Jul 21;112(2899):79-81.

Keys A. Human atherosclerosis and the diet. *Circulation*. 1952 Jan;5(1):115-8.

Kiechl S, Willeit J, Egger G, Oberhollenzer M, Aichner F. Alcohol consumption and carotid atherosclerosis: evidence of dose-dependent atherogenic and antiatherogenic effects. Results from the Bruneck Study. *Stroke* 1994; 1593-1598.

Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, Beltrame J, Fang JC, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*. 2001 Sep 4;104(10):1114-8.

Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, van Staveren WA. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA*. 2004 Sep 22;292(12):1433-9.

Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Gold HK, Yuan J, Narula J, Finn AV, Virmani R. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol*. 2001 Sep;16(5):285-92. Review.

Kondo K, Matsumoto A, Kurata H, Tanahashi H, Koda H, Amachi T, Itakura H. Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein with red wine. *Lancet*. 1994; 344:1152. Letter

|

Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D. hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation*. 1995 Dec 1;92(11):3172-7.

Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. 1984 May 1;33(9):1525-30.

Lavy A, Fuhrman B, Markel A, Dankner G, Ben-Amotz A, Presser D, Aviram M. Effect of dietary supplementation of red or white wine on human blood chemistry, hematology and coagulation: favorable effect of red wine on plasma high-density lipoprotein. *Ann Nutr Metab*. 1994;38(5):287-94.

Lee RT, Grodzinsky AJ, Frank EH, Kamm RD, Schoen FJ. Structure-dependent dynamic mechanical behavior of fibrous caps from human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1991 May;83(5):1764-70.

Lee WS, Jain MK, Arkonac BM, Zhang D, Shaw SY, Kashiki S, Maemura K, Lee SL, Hollenberg NK, Lee ME, Haber E. Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. *Circ Res*. 1998 May 4;82(8):845-51.

- Leng L, Kashiwagi H, Ren XD, Shattil SJ. RhoA and the function of platelet integrin alphaIIb-beta3. *Blood*. 1998 Jun 1;91(11):4206-15.
- Lennernas H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet*. 1997 May;32(5):403-25. Review.
- Lev EI, Hasdai D, Scapa E, Tobar A, Assali A, Lahav J, Battler A, Badimon JJ, Kornowski R. Administration of eptifibatid to acute coronary syndrome patients receiving enoxaparin or unfractionated heparin: effect on platelet function and thrombus formation. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:966-971.
- Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995 Jan 6;270(1):319-24.
- Libby P, Aikawa M. Vitamin C, collagen, and cracks in the plaque. *Circulation*. 2002 Mar 26;105(12):1396-8.
- Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*. 1996 Oct;7(5):330-5. Review
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. Review.
- Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995 Jun 1;91(11):2844-50. Review.
- Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Mar;4(3):193-205. Review.
- Llorente-Cortes V, Martínez-González J, Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 May;18(5):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 Mar 1;22(3):387-93.
- Llorente-Cortes V, Otero-Viñas M, Camino-Lopez S, Llampayas O, Badimon L. Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor

procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2004 Jul 27;110(4):452-9.

Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, Doris C, Yi Q, Smith S, Moore-Cox A, Bosch J, Riley W, Teo K; SECURE Investigators. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation*. 2001 Feb 20;103(7):919-25.

Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res*. 1992 Oct;71(4):850-8.

de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999 Feb 16;99(6):779-85.

de Lorgeril M, Salen P. (bis) Wine ethanol, platelets, and Mediterranean diet. *The Lancet* - Vol. 353, Issue 9158, 27 March 1999, Page 1067 (Letter).

m

MAAS Investigators. Effect of simvastatin on coronary atheroma: The Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS). *Lancet* 1994;344:633-8.

Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem*. 1998 Aug 14;273(33):20685-8.

Mailhac A, Badimon JJ, Fallon JT, Fernandez-Ortiz A, Meyer B, 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. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):988-96.

Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*. 1999 Jan 26;99(3):348-53.

Marrugat J, Covas MI, Fito M, Schroder H, Miro-Casas E, Gimeno E, Lopez-Sabater MC, de la Torre R, Farre M; SOLOS Investigators. Effects of differing phenolic

content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004 Jun;43(3):140-7.

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

Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Marti A, Martinez JA, Martin-Moreno JM. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr.* 2002 Aug;41(4):153-60.

Maseri A, L'Abbate A, Baroldi G, Chierchia S, Marzilli M, Ballestra AM, Severi S, Parodi O, Biagini A, Distante A, Pesola A. Coronary vasospasm as a possible cause of myocardial infarction. A conclusion derived from the study of "preinfarction" angina. *N Engl J Med.* 1978 Dec 7;299(23):1271-7.

Maynard JR, Dreyer BE, Stemerman MB, Pitlick FA. Tissue-factor coagulant activity of cultured human endothelial and smooth muscle cells and fibroblasts. *Blood.* 1977 Sep;50(3):387-96.

McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Apr;87(4):1451-8. Review.

Meyer AS, Yi O-A, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J Agric Food Chem* 1997;45:1638-43

Meyer BJ, Badimon JJ, Mailhac A, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Fuster V, Badimon L. Inhibition of growth of thrombus on fresh mural thrombus. Targeting optimal therapy. *Circulation.* 1994 Nov;90(5):2432-8.

MIRACLE: Ahsan CH, Shah A, Ezekowitz M. Acute statin treatment in reducing risk after acute coronary syndrome: the MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering) Trial. *Curr Opin Cardiol.* 2001;16:390-393.

Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol* 1997;8 :1627-1631

Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *Br J Haematol.* 1994 Oct;88(2):364-71.

- Moons AH, Levi M, Peters RJ. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res*. 2002 Feb 1;53(2):313-25. Review.
- Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):775-8.
- Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation*. 1996 Dec 15;94(12):3090-7
- Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Newell JB, McMellon C, Gold HK, Palacios IF, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration predicts restenosis after coronary intervention in patients with unstable angina. *Circulation*. 1996 Dec 15;94(12):3098-102.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, O'Connor WN. Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2002 May 28;105(21):2504-11.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004 Oct 5;110(14):2032-8.
- Moreno PR, Fuster V. The year in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Dec 7;44(11):2099-110. Review.
- Mower R, Landolfi R, Steiner M. Inhibition in vitro of platelet aggregation and arachidonic acid metabolism by flavone. *Biochem Pharmacol*. 1984; 33:357-363
- Mukamal KJ, Tolstrup JS, Friberg J, Jensen G, Gronbaek M. Alcohol consumption and risk of atrial fibrillation in men and women: the Copenhagen City Heart Study. *Circulation*. 2005 Sep 20;112(12):1736-42.

n

- Narkiewicz K, van de Borne PJ, Hausberg M, Cooley RL, Winniford MD, Davison DE, Somers VK. Cigarette smoking increases sympathetic outflow in humans. *Circulation*. 1998 Aug 11;98(6):528-34.
- Newby DE, McLeod AL, Uren NG, Flint L, Ludlam CA, Webb DJ, Fox KA, Boon NA. Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis. *Circulation*. 2001 Apr 17;103(15):1936-41.
- Norris JW, Zhu CZ, Bornstein NM, Chambers BR. Vascular risks of asymptomatic carotid stenosis. *Stroke*. 1991 Dec;22(12):1485-90.

O

- Osende JI, Badimon JJ, Fuster V, Herson P, Rabito P, Vidhun R, Zaman A, Rodriguez OJ, Lev EI, Rauch U, Hefit G, Fallon JT, Crandall JP. Blood thrombogenicity in type 2 diabetes mellitus patients is associated with glycemic control. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Nov 1;38(5):1307-12
- Osterud B. Factor VII and haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1990 Jun;1(2):175-81. Review.

p

- Palinski W. New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Jan;21(1):3-5. Review.
- Pareti FI, Fujimura Y, Dent JA, Holland LZ, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Isolation and characterization of a collagen binding domain in human von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1986 Nov 15;261(32):15310-5.
- Pekkanen J, Uutela A, Valkonen T, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Coronary risk factor levels: differences between educational groups in 1972-87 in eastern Finland. *J Epidemiol Community Health*. 1995 Apr;49(2):144-9.

- Pellegrini N, Pareti FI, Stabile F, Brusamolino A, Simonetti P. Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr.* 1996 Apr;50(4):209-13.
- Perutelli P, Mori PG. The human platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex: a multi functional adhesion receptor. *Haematologica.* 1992 Mar-Apr;77(2):162-8. Review.
- Pfeffer MA, Keech A, Sacks FM, Cobbe SM, Tonkin A, Byington RP, Davis BR, Friedman CP, Braunwald E. Safety and tolerability of pravastatin in long-term clinical trials: prospective Pravastatin Pooling (PPP) Project. *Circulation.* 2002 May 21;105(20):2341-6.
- Pickett WC, Jesse RL, Cohen P. Initiation of phospholipase A2 activity in human platelets by the calcium ion ionophore A23187. *Biochim Biophys Acta.* 1976 Jan 18;486(1):209-13.
- Pohl T, Seiler C, Billinger M, Herren E, Wustmann K, Mehta H, Windecker S, Eberli FR, Meier B. Frequency distribution of collateral flow and factors influencing collateral channel development. Functional collateral channel measurement in 450 patients with coronary artery disease. *Am Coll Cardiol.* 2001 Dec;38(7):1872-8.
- Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA Jr, Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature.* 1977 Oct 27;269(5631):804-6.
- Powell JS, Clozel JP, Muller RK, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science.* 1989 Jul 14;245(4914):186-8.
- Preedy VR, Atkinson LM, Richardson PJ, Peters TJ. Mechanisms of ethanol-induced cardiac damage. *Br Heart J.* 1993; 69:197-200.
- PROVE-IT TIMI 22: Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2004 Apr 8;350(15):1495-504.

r

- Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med.* 2001 Feb 6;134(3):224-38. Review.
- Reed D, Yano K. Predictors of arteriographically defined coronary stenosis in the Honolulu Heart Program. Comparisons of cohort and arteriography series analyses. *Am J Epidemiol.* 1991 Jul 15;134(2):111-22.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.
- Renaud SC, Gueguen R, Schenker J, d'Houtaud A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology.* 1998 Mar;9(2):184-8.
- Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet.* 1989 Oct 21;2(8669):941-4.
- Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, Colditz GA, Ascherio A, Rosner B, Stampfer MJ. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet.* 1991 Aug 24;338(8765):464-8.
- Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ.* 1999 Dec 11;319(7224):1523-8.
- Rokitansky KA. Manual of Pathological Anatomy, (Translated by Day GE). Ed: Sydenham Society. London 1852; (4):271-273.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26. Review.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993 Apr 29;362(6423):801-9. Review.

S

- Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen

- types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*. 1994 Mar 1;83(5):1244-50.
- Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ. Human *Blood* platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature*. 1979 Jun 14;279(5714):636-8.
- Sambola A, Fuster V, Badimon JJ. Role of coronary risk factors in *Blood* thrombogenicity and acute coronary syndromes. *Rev Esp Cardiol*. 2003 Oct;56(10):1001-9. Review.
- Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J, Badimon JJ. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and *Blood* thrombogenicity. *Circulation*. 2003 Feb 25;107(7):973-7.
- Savage B, Bottini E, Ruggeri ZM. Interaction of integrin alpha IIb beta 3 with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion. *J Biol Chem*. 1995 Dec 1;270(48):28812-7.
- Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996 Jan 26;84(2):289-97.
- 4S: 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.
- Schechter 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 Jul 21;87(2):126-32.
- Scotland RS, Vallance PJ, Ahluwalia A. Endogenous factors involved in regulation of tone of arterial vasa vasorum: implications for conduit vessel physiology. *Cardiovasc Res*. 2000 Jun;46(3):403-11. Review.
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr*. 1998 Jun;128(6):1003-7.
- Shah PK. Inflammation, neointimal hyperplasia, and restenosis: as the leukocytes roll, the arteries thicken. *Circulation*. 2003 May 6;107(17):2175-7.
- Shah PK. Inflammation, neointimal hyperplasia, and restenosis: as the leukocytes roll, the arteries thicken. *Circulation*. 2003 May 6;107(17):2175-7.

- Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, Kandabashi T, Eto Y, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. *Cardiovasc Res*. 2001 Jul;51(1):169-77.
- Sixma JJ, van Zanten GH, Saelman EU, Verkleij M, Lankhof H, Nieuwenhuis HK, de Groot PG. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemost*. 1995 Jul;74(1):454-9. Review.
- Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, Miyao Y, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I, Kumeda K. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation*. 1999 Jun 8;99(22):2908-13.
- Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka A, Wang PR, Zhang D, Peterson L, Detmers PA, Chao YS, Wright SD. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Jan;21(1):115-21.
- St.Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Ischaemic heart-disease and wine. *Lancet*. 1979 Jun 16;1(8129):1294.
- St.Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979 May 12;1(8124):1017-20.
- Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. *N Engl J Med*. 1988 Aug 4;319(5):267-73.
- Strydom HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld 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 May;89(5):2462-78.
- Strydom HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld 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. *Arterioscler Thromb*. 1994 May;14(5):840-56. Review.

Sтары HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:1297S-1333006S.

Sтары HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis*. 1989 Jan-Feb;9(1 Suppl):I19-32.

Sтары HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1177-8. Review.

Steinberg D, Gotto AM Jr. Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels: fifty years from bench to bedside. *JAMA*. 1999 Dec 1;282(21):2043-50.

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 Aug;134(2 Pt 1):253-9.

t

Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Nov;21(11):1712-9. Review.

Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndromes: unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation*. 1998 Mar 31;97(12):1195-206. Review.

The Medical Research Council's General Practice Research Framework. Thrombosis prevention trial: randomised trial of low intensity oral anticoagulation with warfarin and low dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. *Lancet* 1998; 351: 233-241.

Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):594-9.

Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P, Ambrose JA. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart*. 2003 Sep;89(9):993-7. Review

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*. 2003 Jun 26;348(26):2599-608.

Tschoepe D, Rauch U, Schwippert B. Platelet-leukocyte-cross-talk in diabetes mellitus. *Horm Metab Res*. 1997 Dec;29(12):631-5. Review.

Turitto VT, Weiss HJ, Baumgartner HR. Platelet interaction with rabbit subendothelium in von Willebrand's disease: altered thrombus formation distinct from defective platelet adhesion. *J Clin Invest*. 1984 Nov;74(5):1730-41.

U

Uemura S, Fathman CG, Rothbard JB, Cooke JP. Rapid and efficient vascular transport of arginine polymers inhibits myointimal hyperplasia. *Circulation*. 2000 Nov 21;102(21):2629-35.

V

van Golde P, Sloots LM, Vermeulen WP, Wielders J, Hart H, Bouma B, van de Wiel A. The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis* 147 (1999) 365-370

Vidal F, Toda R, Gutierrez C, Broch M, Fernandez-Muixi F, Lorenzo A, Richart C. Influence of chronic alcohol abuse and liver disease on hepatic aldehyde dehydrogenase activity. *Alcohol*. 1998 Jan;15(1):3-8.

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1262-75. Review.

W

- Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2000 Sep 5;102(10):1186-91. Review.
- Waters D, Lesperance J, Craven TE, Hudon G, Gillam LD. Advantages and limitations of serial coronary arteriography for the assessment of progression and regression of coronary atherosclerosis. Implications for clinical trials. *Circulation*. 1993 Mar;87(3 Suppl):II38-47. Review.
- Weinbrenner T, Fito M, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C, Coolen S, Albaladejo MF, Abanades S, Schroder H, Marrugat J, Covas MI. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr*. 2004 Sep;134(9):2314-21.
- Werner GS, Ferrari M, Betge S, Gastmann O, Richartz BM, Figulla HR. Collateral function in chronic total coronary occlusions is related to regional myocardial function and duration of occlusion. *Circulation*. 2001 Dec 4;104(23):2784-90.
- White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Feb 1;91(3):1044-8.
- Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem*. 1995 Jan;41(1):32-5.
- Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res*. 1988 Mar;62(3):515-23.
- World Health Organization. The Atlas of Heart Disease and Stroke. Internet: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/
- WOSCOPS. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Mac Farlane PW, McKillop JH, Packard. 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.

X

Xia J, Allenbrand B, Sun GY. Dietary supplementation of grape polyphenols and chronic ethanol administration on LDL oxidation and platelet function in rats. *Life Sciences*. Vol.63, No 5, pp. 383-390, 1988

Y

Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation*. 2001 Dec 4;104(23):2855-64.

Z

Zaman AG, Helft G, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ. Histopathology and pathogenesis of plaque instability and thrombus formation. *Drugs Today (Barc)*. 1999 Aug;35(8):641-56.

Zhang QH, Das K, Siddiqui S, Myers AK. Effects of acute, moderate ethanol consumption on human platelet aggregation in platelet-rich plasma and whole blood. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000 Apr;24(4):528-34.

ANEXO II.

OTRAS PUBLICACIONES.

Low Density Lipoproteins Downregulate Lysyl Oxidase in Vascular Endothelial Cells and the Arterial Wall

Cristina Rodríguez, Berta Raposo, José Martínez-González, Laura Casaní, Lina Badimon

Objective—Hypercholesterolemia induces endothelial dysfunction, a hallmark of the atherosclerotic process, modulating the expression of key genes in vascular endothelial cells.

Methods and Results—By differential display analysis, we have studied the effect of high concentrations of native low density lipoprotein (LDL) on endothelial gene expression. mRNA levels of lysyl oxidase (LOX), an enzyme involved in collagen and elastin cross-linking, were downregulated by LDL treatment in endothelial cells in a dose- and time-dependent manner (80% of inhibition by 180 mg/dL LDL for 24 hours). This reduction of LOX expression was associated with a decrease in LOX activity (40% and 54% of inhibition after 24 and 48 hours of LDL treatment, respectively). LOX mRNA half-life was not modified by LDL, but transcriptional inhibition blocked the effect of LDL. Inhibition of LOX activity by either LDL or β -aminopropionitrile, an inhibitor of LOX, increased endothelial permeability (192 ± 0.19 - and 3.37 ± 0.74 -fold, respectively). Interestingly, a reduction in LOX expression (3.5-fold) was observed in vivo in the vascular wall of hypercholesterolemic pigs.

Conclusions—These findings suggest that LDL downregulation of LOX could contribute to the endothelial dysfunction caused by hypercholesterolemia, thus contributing to atherosclerotic plaque formation. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1409-1414.)

Key Words: endothelial cells ■ low density lipoproteins ■ lysyl oxidase ■ vascular permeability ■ hypercholesterolemia

Vascular endothelium acts as a selective barrier, controlling the exchange of macromolecules between blood and the underlying tissues and regulating vascular tone and the thrombogenic/fibrinolytic balance. Endothelial dysfunction associated with hypercholesterolemia is one of the earlier events in the atherosclerotic process. The alteration of endothelial gene expression by high concentrations of LDL leads to a decrease in NO bioavailability¹⁻³ and to an increase in leukocyte recruitment by an induction of adhesion molecule expression.⁴

See page 1365

It has been reported that atherogenic concentrations of LDL alter the composition and permeability of the endothelial barrier by inducing changes in the basement membrane.⁵ Thus, the alteration in endothelial extracellular matrix (ECM) could play a key role in the endothelial dysfunction associated with hypercholesterolemia. One of the key enzymes involved in ECM maturation is lysyl oxidase (LOX). This enzyme, a copper-containing semicarbazide-sensitive amine oxidase,⁶ initiates the covalent cross-linking of collagen and elastin that is essential in maintaining ECM structure. LOX oxidatively deaminates peptidyl lysine residues of collagen and elastin, leading to the synthesis of peptidyl aldehydes,

which condense spontaneously to form the mature and insoluble ECM.⁷ LOX has also been associated with tumor suppression^{8,9} and chemotaxis,¹⁰ and in the last few years, different LOX isoforms, probably with different substrate specificity and function, have been identified.¹¹⁻¹⁵ Alterations in normal LOX expression have been linked to human diseases. Reduced LOX expression has been described in type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes' disease,¹⁶ whereas fibrotic diseases, such as hepatic, lung, or kidney fibrosis, have been associated with increases in LOX.¹⁷ The role of this enzyme in atherosclerosis remains to be elucidated because it has been suggested that increases¹⁸ and decreases¹⁹⁻²¹ in LOX activity could be associated with this pathology.

The aim of the present study was to analyze the mechanisms involved in the initiation of atherosclerosis, targeting the endothelial functions regulated by LDL. We have identified LOX as a gene differentially regulated by LDL in endothelial cells. LOX expression and activity are downregulated by LDL in a time- and concentration-dependent manner. Moreover, LOX inhibition was associated with an increase in endothelial permeability in vitro. Finally, in pigs fed an atherogenic diet, a significant downregulation of vascular LOX expression was observed. Considering the multiple cell functions in which LOX could be involved and its potential

Received May 30, 2002; revision accepted July 16, 2002.

From the Instituto de Investigación Cardiovascular de Barcelona, CSIC-ICCC-Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain.

Correspondence to Prof Lina Badimon, Laboratori d'Investigació Cardiovascular, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Avda. Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail lbadimon@cid.csic.es

© 2002 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000033818.21748.99

role in the atherogenic process, the effect of downregulation exerted by LDL could be crucial in endothelial dysfunction.

Methods

Cell Culture

Porcine aortic endothelial cells (PAECs) were obtained from adult normolipemic animals as described.²² Cells (10^5 cells per well in a 6-well plate) were grown in medium 199 (GIBCO), supplemented with 10% FCS (Biological Industries), antibiotics (0.1 mg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin G), and 2 mmol/L L-glutamine. Forty-eight hours after the seeding, the cells were placed in serum-deprived (2% FCS) medium for 24 hours. Then, LDLs (180 mg cholesterol/dL) were added for an additional 24 hours of incubation. Human umbilical vein endothelial cells were obtained by collagenase digestion and cultured as described.^{2,3} No cytotoxicity, analyzed by the trypan blue exclusion test and the XTT-based assay for cell viability (Roche), was observed after LDL (180 mg/dL for 48 hours) and β -aminopropionitrile (BAPN, 100 μ mol/L for 16 hours) incubation.

In Vivo Animal Model

Female pigs (Landrace/Largewhite [Piensos Victoria SA, Barcelona, Spain], mean body weight at initiation 32 ± 4 kg) were randomized into 2 groups: normolipemic animals ($n=6$) that were fed a normal chow and hyperlipemic animals ($n=10$) that were fed a cholesterol-rich diet (2% cholesterol, 1% cholic acid, and 20% beef tallow) for 100 days.^{23,24} At the end of the dietary period, the animals were euthanized with a thiopental overdose. Plasma cholesterol levels and hematologic parameters were measured at baseline and at euthanasia. Because in the porcine model the first atherosclerotic lesions develop in the abdominal aorta, rings of abdominal aorta were collected and frozen in liquid N₂ to analyze gene expression. All procedures were in accordance with institutional guidelines and followed the American Physiological Society guidelines for animal research.

Plasma Biochemistry

Plasma total cholesterol was determined with an automatic analyzer (Kodak Ektachem DT System). Plasma lipoproteins (HDL cholesterol, LDL cholesterol, and VLDL cholesterol) were fractionated by using the validated methods of the Lipid Research Clinic Program²⁵ and quantified spectrophotometrically (Kontron Instruments).

LDL Isolation

Porcine or human LDLs were obtained from fresh nonfrozen plasma by sequential ultracentrifugation (density 1.019 to 1.063 g/mL). LDLs used in the experiments were <72 hours old. The purity of the LDLs was assessed by agarose gel electrophoresis (Paragon System, Beckman). LDL samples had no detectable levels of endotoxin (Limulus Amebocyte Lysate test, BioWhittaker), and thiobarbituric acid-reactive substance values were <1.5 nmol malonaldehyde/mg protein.

mRNA-DD Analysis

Cells grown in a 6-well plate, as indicated above, were incubated with LDL (180 mg/dL for 24 hours). Total RNA was isolated by using a QuickPrep total RNA kit (Pharmacia) or Ultraspec (Biotech) according to the manufacturer's instructions. mRNA-differential display (DD) analysis was performed with a Delta RNA Fingerprinting kit (Clontech) by using 1 μ g of total RNA as described previously.²² Reproducible DNAs from 3 independent experiments upregulated or downregulated by LDL were cloned and sequenced. Comparison of DNA homology with databases (GenBank) was performed by the use of BLAST, a National Center for Biotechnology Information server program.

Northern Blot Analysis

Total RNA was obtained as described above. RNA samples were fractionated in 1.2% agarose-2% formaldehyde gels. RNA was

transferred by capillarity to Nytran Supercharge (Schleicher & Schuell) membranes and UV-cross-linked. Filters were hybridized by using the reamplified product from the DD-polymerase chain reaction (PCR) assay labeled with [α -³²P]dATP as the LOX probe. A 28S ribosomal cDNA was used to normalize the results, as described previously.³ Filters were exposed to Agfa Curix RP2 x-ray films and quantified by densitometric analysis (Molecular Dynamics).

RT-PCR

Reverse transcription (RT)-PCR analysis was performed as described previously.²² The specific oligonucleotides selected were as follows: porcine LOX upper primer, 5'-tga aat agc tgc ttt ggt-3'; human LOX upper primer, 5'-caa gta aga ttt tcc agt gc; and porcine and human LOX lower primer, 5'-tct gta gat gcc agt ctg-3'. Amplification was carried out by 20 cycles of 94°C for 1 minute, 57°C for 1 minute, and 72°C for 30 seconds, followed by a final extension of 72°C for 7 minutes. Levels of GAPDH were used to normalize the results.^{3,22}

LOX Activity

LOX activity was measured by a high-sensitivity fluorescence assay as previously described.²⁶ Briefly, PAECs were plated (500 000 cells per dish) on 100-mm-diameter tissue culture dishes. Thirty-six hours after plating, cells were serum-depleted and fed with phenol red-free medium 199 for 18 hours. Cells were then reincubated with fresh medium containing 180 mg/dL LDL every 24 hours. LOX activity was measured in cell culture medium. The medium (200 μ L) was incubated in the presence and absence of 500 μ mol/L BAPN at 37°C for 30 minutes with 1 U/mL horseradish peroxidase, 10 μ mol/L Amplex red (Molecular Probes), and 10 mmol/L 1,5-diaminopentane in 1.2 mol/L urea and 0.05 mol/L sodium borate (pH 8.2). The reaction was stopped on ice, and differences in fluorescence intensity (563-nm excitation wavelength and 587-nm emission wavelength) between samples with and without BAPN were determined. Results were normalized by cell protein content.

Transendothelial Exchange

Endothelial permeability was determined by the exchange of FITC-dextran (M_r 40 000, Sigma Chemical Co) through the endothelial monolayer as described previously.²⁷ In brief, PAECs (10^6) were seeded on Transwell-collagen porous membranes (3- μ m pore size and 0.33-cm² area, Costar) and cultured for 2 weeks to obtain a highly confluent culture. After 36 hours of incubation with LDL (140 mg/dL) or 16 hours with BAPN (100 μ mol/L), FITC-dextran (10 μ mol/L) was added to the upper compartment. After 6 hours, samples (50 μ L) from the lower compartment were taken, and dextran transfer was determined in a fluorimeter (495-nm excitation wavelength and 530-nm emission wavelength).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Means were compared by ANOVA. For the in vivo study, statistical differences between groups were analyzed by the Mann-Whitney *U* test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

DD Analysis

The effect of atherogenic concentrations of LDL (180 mg/dL for 24 hours) on PAEC expression patterns was assessed by DD-PCR analysis using cDNAs from independent experiments performed with PAECs and LDLs from 3 different animals. A DD-PCR assay performed with primers T8 and P8 showed a downregulated band in a reproducible manner (Figure 1A). This cDNA was cloned, sequenced, and compared with the GenBank database by the National Center for Biotechnology Information server program BLAST. This cDNA shared high homology (90%) with the human LOX

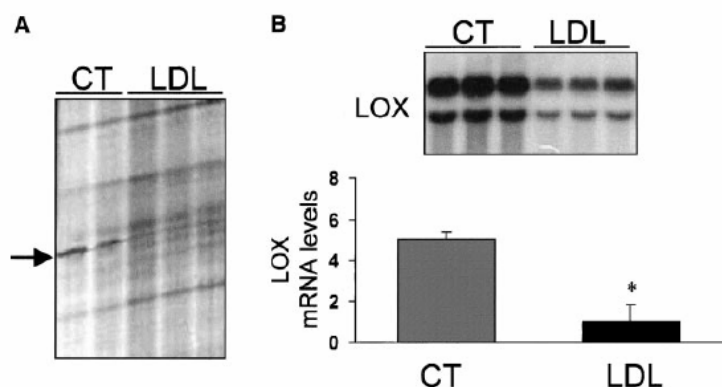


Figure 1. LOX expression is downregulated by atherogenic LDL concentrations in PAECs. A, PAECs were incubated with LDL (180 mg/dL) for 24 hours, and mRNA-DD analysis was performed as described in Methods. Only reproducible differentially displayed bands from 3 independent experiments performed with PAECs from different animals were considered for subsequent analysis. The arrow shows a band downregulated by LDL. This cDNA was cloned and sequenced, showing identity with the human LOX gene (exon 7). B, Northern blot is shown from PAECs incubated with LDL (180 mg/dL, 24 hours) with the use of LOX cDNA obtained in the mRNA-DD assay as a probe. Blots were quantified, normalized by 28S ribosomal RNA levels, and expressed as mean \pm SD (n=5). CT indicates control. * P <0.001.

gene (exon 7) between positions 1649 and 1975 (GenBank accession No. L16895). To confirm the downregulation produced by LDL treatment, new experiments were performed in which PAECs were incubated with LDL (180 mg/dL for 24 hours, n=5), and Northern blot assays were carried out with the LOX-cloned product used as a probe. As shown in Figure 1B, LDL significantly downregulated LOX mRNA levels \approx 5-fold (P <0.001). Similar results were obtained by RT-PCR assays with specific oligonucleotides (data not shown).

Time- and Dose-Dependent Effect of LDL on LOX Expression in Endothelial Cells

Although DD experiments were performed in serum-deprived cells (2% FCS), the downregulation of LOX by atherogenic levels of LDL was also observed in the presence of 10% FCS, conditions that did not affect LOX basal expression (please see online Figure I, available at <http://www.ahajournals.org>). Thus, subsequent experiments were performed in serum-deprived cells. LOX mRNA levels decreased in a dose-dependent manner. As shown in Figure 2, LOX expression was significantly reduced by low LDL concentrations (74% inhibition by 50 mg/dL). To determine the time course of LOX mRNA expression, total RNA was isolated at different times from PAECs incubated with LDL (180 mg/dL). The LOX mRNA level, analyzed by RT-PCR, decreased after 12 hours of incubation with LDL, and expression levels remained low after 24 hours. Similar LDL-mediated downregulation effects on LOX expression were observed in human umbilical vein endothelial cells (please see online Figure II, available at <http://www.ahajournals.org>).

Effect of LDL on LOX Activity

LOX activity was determined in PAECs incubated with LDL (180 mg/dL). LDL significantly decreased LOX activity in the cell culture medium (40% and 54% of inhibition after 24 and 48 hours, respectively; Figure 3A).

Effect of LDL on Endothelial Barrier Function

Modulation of transendothelial exchange by LDL and BAPN, an inhibitor of LOX activity, was analyzed. As shown in Figure 3B, LDL and BAPN caused a significant increase in FITC-dextran transfer compared with control cultures (\approx 2- and 3-fold, respectively), an effect that became apparent 6 hours after the addition of

FITC-dextran. These results suggest that LOX inhibition disturbs endothelial barrier integrity.

Effect of DRB and Cycloheximide

To characterize the mechanisms involved in the downregulation of LOX expression by LDL, we analyzed the effect of 5,6-dichlorobenzimidazole (DRB), a transcriptional inhibitor, and cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. PAECs were incubated with or without LDL for 24 hours, and then transcription was inhibited by DRB (50 μ mol/L, time 0). LOX mRNA levels were analyzed by Northern analysis at different times (0, 6, 9, 12, and 24 hours). LDL-treated cells showed a half-life (\approx 24 hours) similar to that of control cells; thus, the effect of LDL could not be attributable to a decrease in LOX mRNA stability (data not shown). DRB (Figure 4A) and cycloheximide (Figure 4B) blocked the effect of LDL on

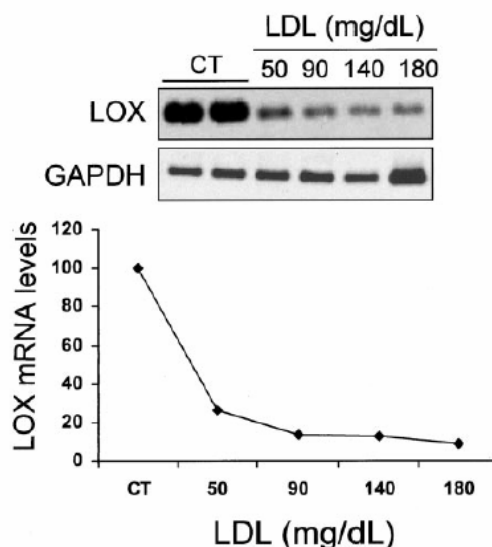


Figure 2. Dose-dependent effect of LDL on LOX mRNA levels. PAECs were treated with increasing LDL concentrations for 24 hours. Representative autoradiographs from 2 different assays performed in duplicate are shown. Blots were quantified, normalized by GAPDH mRNA levels, and expressed as percentage of control.

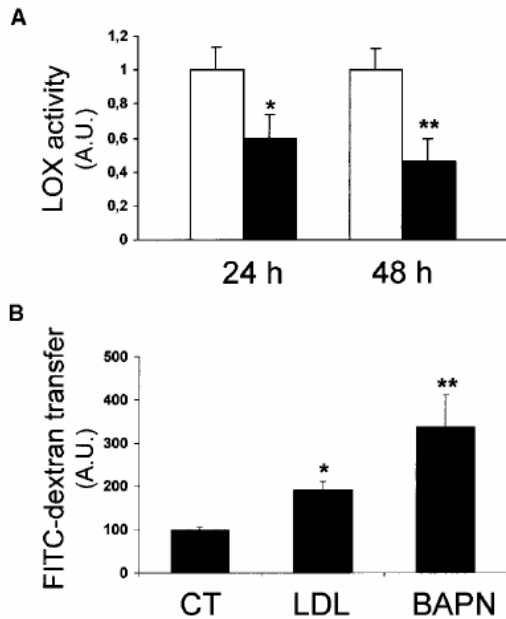


Figure 3. Effect of LDL on LOX activity and transendothelial exchange. A, LOX activity was measured in culture media from PAECs after 24 and 48 hours of incubation with LDL (180 mg/dL). Results were normalized by cell protein content and are expressed as the mean±SEM of 3 assays performed in triplicate. A.U. Indicates arbitrary units; open bars, control; and solid bars, LDL treatment. **P*<0.02 and ***P*<0.01. B, PAECs were incubated with LDL (140 mg/dL for 36 hours) or BAPN (100 μmol/L for 16 hours), and transendothelial exchange of FITC-dextran was evaluated after 6 hours. Results are mean±SEM of 3 assays performed in duplicate. **P*<0.001 and ***P*<0.03.

LOX mRNA levels, suggesting that transcriptional and post-transcriptional mechanisms are involved in the LDL-mediated effect.

In Vivo Effects of Hypercholesterolemia on LOX Expression in the Vessel Wall

LOX expression was analyzed by RT-PCR in porcine abdominal aortas from normolipemic and hypercholesterolemic pigs. Animals fed the hypercholesterolemic diet, compared with animals fed the normolipemic diet, showed higher plasma LDL cholesterol levels (333±120 versus 34±10.9 mg/dL, respectively; *P*<0.01). Vascular LOX mRNA levels were significantly reduced (~3-fold) by the hypercholesterolemic diet (*P*<0.01, Figure 5).

Discussion

We have identified LOX by DD-PCR analysis as a gene downregulated by LDL in a dose- and time-dependent manner in porcine and human endothelial cells. This enzyme catalyzes a key step in the cross-linking of collagen and elastin, leading to maturation of the ECM. Although LOX regulation has been extensively studied in fibroblast and smooth muscle cells, little is known about its role in endothelial cells.²⁸ The observed decrease in PAEC LOX expression and activity by LDL led us to hypothesize that this effect

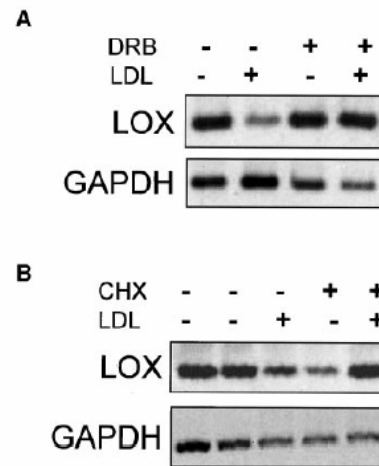


Figure 4. Mechanisms involved in downregulation of LOX expression by LDL. A, PAECs were incubated with LDL (180 mg/dL) alone or in combination with 50 μmol/L DRB for 12 hours. B, PAECs were incubated with LDL (180 mg/dL) alone or in combination with cycloheximide (CHX, 2 μg/mL) for 12 hours. LOX mRNA levels were determined by RT-PCR. Results were normalized by GAPDH mRNA levels. Representative RT-PCR assays (n=2) are shown.

could be associated with alterations in endothelial ECM processing and vascular permeability in hypercholesterolemia-mediated endothelial dysfunction.

We have analyzed the mechanisms involved in LOX regulation by LDL. Altogether, the experiments performed in the presence of cycloheximide and DRB suggest the involvement of a transcriptional mechanism, mainly because a decrease in LOX mRNA stability was not observed after LDL incubation. The long LOX mRNA half-life observed in our

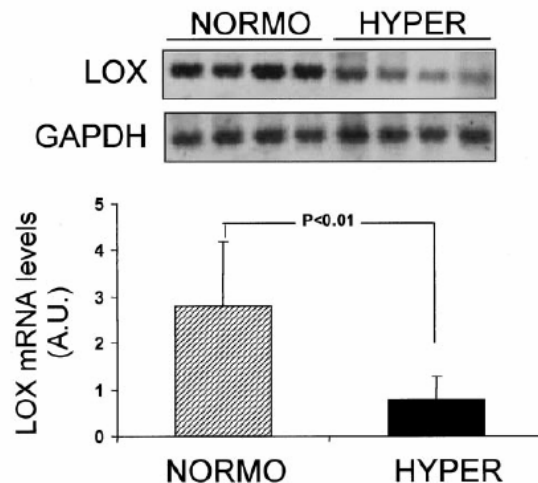


Figure 5. Effect of hypercholesterolemia on vascular LOX mRNA levels. Densitometric analyses of LOX mRNA levels in abdominal aorta samples from normolipemic pigs (NORMO) and hyperlipemic pigs (HYPER) are shown. Results were normalized by GAPDH mRNA levels. A representative RT-PCR is shown.

culture conditions (2% FCS) is in agreement with that reported in other cell types, such as smooth muscle cells maintained in low serum culture²⁹ or quiescent IMR90 fibroblasts.³⁰ However, in PAECs, serum deprivation did not alter LOX endothelial expression, and the reported superinduction of LOX mRNA by cycloheximide²⁰ was not observed. Thus, differential regulation of LOX expression could be observed depending on the cell type. In this sense, it has been speculated that cell type-specific mechanisms could be involved in LOX regulation,³¹ probably mediated by different promoter elements. Supporting the data, we observed similar LOX downregulation by LDL in vascular cells from human and porcine origin. In addition, we observed that LOX downregulation by LDL is accompanied by a reduction in LOX activity. This inhibition was produced in the absence of any effect on bone morphogenetic protein 1 gene expression (authors' unpublished data, 2002), the C-proteinase that processes pro-LOX to its active form with the highest efficiency.³² Thus, LDL specifically inhibited LOX expression/activity.

The increased endothelial permeability induced by BAPN, a specific inhibitor of LOX activity, and LDL suggests a role of LOX in the alteration of endothelial barrier function caused by LDL. Alterations in endothelial ECM composition by atherogenic concentrations of LDL have been reported^{5,33} and have been associated with an increase in endothelial permeability. However, there are some conflicting reports in the literature. Mildly oxidized LDL but not native LDL, at low concentrations and short incubation times (2 minutes), have been reported to increase endothelial permeability.³⁴ Other authors testing nonatherosclerotic LDL concentrations concluded that LDL did not alter endothelial permeability.³⁵ In the present study, we report that LOX downregulation is associated with an increased permeability. Moreover, not only does the inhibition of LOX maintain collagen in a soluble form, but this soluble form is also more susceptible to metalloproteinase degradation.³⁶ On the other hand, because LOX activates the transcription of collagen III,¹⁹ LOX downregulation by LDL could trigger an additional decrease in some ECM components. Thus, LOX by different mechanisms could modulate ECM integrity and could play a key role in the modulation of endothelial function.

Interestingly, in vivo, in a model of early atherosclerosis, vascular LOX mRNA levels were downregulated by the hypercholesterolemic diet. No changes or even increases in vascular LOX activity have previously been reported in other animal models^{37,38}; however, differences in LOX regulation between species and even differences in diet composition and types of lesions in these models could explain these discrepancies. Indeed, we have chosen the porcine animal model for the present study because it develops lesions resembling those in humans.³⁹ After 100 days on a cholesterol-rich diet, pigs develop lesions that can be classified from arterial intimal thickening to type I and II according to the American Heart Association classification.⁴⁰

Although the LDL-mediated LOX downregulation mechanism is largely unknown, preliminary data suggest that sterol regulatory element-binding proteins are not involved because no sterol regulatory element has been identified in the

LOX promoter and because ALLN, an inhibitor of sterol regulatory element-binding protein catabolism, did not alter the LDL effect. On the other hand, LOX downregulation does not seem to be mediated by NO because endothelial NO synthase inhibition by *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester did not affect LOX expression (authors' unpublished data, 2002).

In addition to hypercholesterolemia, other atherosclerotic risk factors, such as hyperhomocysteinemia, could be associated with decreases in LOX activity, inasmuch as homocysteine thiolactone and other analogues are irreversible inhibitors of LOX.²¹ Thus, LOX downregulation could be involved in the pathogenesis of atherosclerosis. In the present study, we have observed that hypercholesterolemia downregulates vascular LOX expression, an effect that could be related to an increase in endothelial permeability in the early steps of the atherosclerotic process. Further experiments focusing on the regulation of LOX activity in the course of LDL-induced vascular changes are necessary to clarify the role of LOX in this process.

Acknowledgments

This study has been possible thanks to funds provided by MSD, Spain. Additional support has been partially provided by FIS 99/0907 and Fundación de Investigación Cardiovascular/Catalana-Occidente. Authors are indebted to the technical assistance provided by Olga Bell and Pablo Catalina. B. Raposo and L. Casani are predoctoral fellows of CSIC and Fundación de Investigación Cardiovascular, respectively.

References

- Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 1993;88:2541-2547.
- Vidal F, Colomé C, Martínez-González J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem*. 1998;252:378-384.
- Martínez-González J, Raposo B, Rodríguez C, Sánchez-Gómez S, 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*. 2001;21:804-809.
- Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, Batten P, Yacoub M. Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1998;101:1064-1075.
- Guretzki HJ, Gerbitz KD, Olgemöller B, Schleicher E. Atherogenic levels of low density lipoprotein alter the permeability and composition of the endothelial barrier. *Atherosclerosis*. 1994;107:15-24.
- Jalkane S, Salmi M. Cell surface monoamine oxidases: enzymes in search of a function. *EMBO J*. 2001;20:3893-3901.
- Kagan HM, Trackman PC. Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;5:206-210.
- Contente S, Kenyon K, Rimoldi D, Friedman RM. Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science*. 1990;249:796-798.
- Kenyon K, Contente S, Trackman PC, Tang J, Kagan HM, Friedman RM. Lysyl oxidase and *rrg* messenger RNA. *Science*. 1991;253:802.
- Lazarus HM, Cruikshank WW, Narasimban N, Kagan HM, Center DM. Induction of human monocyte motility by lysyl oxidase. *Matrix Biol*. 1994;14:727-731.
- Kenyon K, Modi Ws, Contente S, Friedman RM. A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25. *J Biol Chem*. 1993;268:18435-18437.
- Kim Y, Byd CD, Csiszar K. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J Biol Chem*. 1995;270:7176-7182.

13. Jourdan-Le Saux C, Tronecker H, Bogic L, Bryant-Greenwood GD, Boyd CD, Csiszar K. The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J Biol Chem.* 1999;274:12939-12944.
14. Huang Y, Tang R, Zhao W, Zhou Z, Wang W, Ying K, Xie Y, Mao Y. Cloning and characterization of a human lysyl oxidase-like 3 gene (hLOXL3). *Matrix Biol.* 2001;20:153-157.
15. Mäki JM, Kivirikko KI. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem J.* 2001;355:381-387.
16. Kuivaniemi H, Peltonen L, Kivirikko KI. Type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes syndrome: the decrease in lysyl oxidase activity is associated with a corresponding deficiency in the enzyme protein. *Am J Hum Genet.* 1985;37:798-808.
17. Desmouliere A, Darby I, Monte Alto Costa A, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest.* 1997;76:765-778.
18. Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol.* 1998;16:387-398.
19. Giampuzzi M, Botti G, Di Luca M, Arata L, Ghiggeri G, Gusmano R, Ravazzolo R, Di Donato A. Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagen III promoter. *J Biol Chem.* 2000;275:36341-36349.
20. Song YL, Ford JW, Gordon D, Shanley CJ. Regulation of lysyl oxidase by interferon- γ in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:982-988.
21. Liu G, Nellaiappan K, Kagan HM. Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues: implications for homocystinuria. *J Biol Chem.* 1997;272:32370-32377.
22. Rodriguez C, Martinez-González J, Sánchez-Gómez S, Badimon L. LDL downregulates CYP51 in porcine vascular endothelial cells and in the arterial wall through a sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circ Res.* 2001;88:268-274.
23. Pueyo Palazón C, Alfon 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.
24. Alfon J, Royo T, Garcia-Moll X, Badimon L. Platelet deposition on eroded vessel wall at stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1812-1817.
25. Lipid Research Clinic Program. *Manual of Laboratory Operation.* Washington, DC: US Government Printing Office; 1974. Department of Health, Education, and Welfare publication No. NIH75-628.
26. Palamakumbura AH, Trackman PC. A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Anal Biochem.* 2002;300:245-251.
27. Zink S, Rösen P, Sackmann B, Lemoine H. Regulation of endothelial permeability by β -adrenoceptor agonists: contribution of β_1 - and β_2 -adrenoceptors. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1178:286-298.
28. Levene CI, Heale G, Robins SP. Collagen cross-link synthesis in cultured vascular endothelium. *Br J Exp Pathol.* 1989;70:621-626.
29. Gacheru SN, Thomas KM, Murray SA, Csiszar K, Smith-Mungo LI, Kagan HM. Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: effects of TGF- β 1 and serum deprivation. *J Cell Biochem.* 1997;65:395-407.
30. Roy R, Polgar P, Wang Y-Y, Goldstein RH, Taylor L, Kagan HM. Regulation of lysyl oxidase and cyclooxygenase expression in human lung fibroblasts: interactions among TGF- β , IL-1 β and prostaglandin E. *J Cell Biochem.* 1996;62:411-417.
31. Contente S, Kenyon K, Sriraman P, Subramanian S, Friedman RM. Epigenetic inhibition of lysyl oxidase transcription alter transformation by *ras* oncogene. *Mol Cell Biochem.* 1999;194:79-91.
32. Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong H, Greenspan DS, Trackman PC. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem.* 2001;276:22537-22543.
33. Pillarisetti S. Lipoprotein modulation of subendothelial heparan sulfate proteoglycans (perlecan) and atherogenicity. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10:60-65.
34. Essler M, Retzer M, Bauer M, Heemskerck JW, Aepfelbacher M, Siess W. Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem.* 1999;274:30361-30364.
35. Karman RJ, Garcia JG, Hart CM. Endothelial cell monolayer dysfunction caused by oxidized low density lipoprotein: attenuation by oleic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1997;56:345-353.
36. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991;5:2145-2154.
37. Chvapil M, Stith PL, Tillemma LM, Carlson EC, Campbell JB, Eskelson CD. Early changes in the arterial wall of chickens fed a cholesterol diet. *Atherosclerosis.* 1976;24:393-405.
38. Kagan HM, Raghavan J, Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis.* 1981;1:287-291.
39. Levi M, Dorffle-Melly J, Johnson GJ, Drouet L, Badimon L. Usefulness and limitations of animals models of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001;86:1331-1333.
40. Martínez-González J, Alfon J, Berrozpe M, Badimon L. HMG-CoA reductase inhibitors reduce vascular monocyte chemoattractant protein-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis.* 2001;159:27-33.

Cell Signaling and Vessel Remodeling

A novel anti-ischemic nitric oxide donor inhibits thrombosis without modifying haemodynamic parameters

Gemma Vilahur, Estefania Segalés, Laura Casaní, Lina Badimon

Cardiovascular Research Center, CSIC/ICCC, Hospital of Santa Creu i Sant Pau-UAB, Barcelona, Spain

Summary

Platelets are involved in the clinical presentations of ischemic heart disease. Our objective was to study the antithrombotic effects of a new nitric oxide donor (LA419), a neutral sugar organic nitrate with a protected thiol group in its molecular structure. Animals were randomly distributed in three groups: I) oral administration of LA419 (0.9-1.8-3.6-5 mg/kg/d, 10 days); II) oral administration of standard IS-5-MN (0.9-1.8 mg/kg/d, 10 days); III) non-treated group (control). In catheterized pigs, thrombosis was studied under controlled rheological conditions by radioisotopic evaluation of deposited platelets on damaged vessel wall, placed in an extracorporeal perfusion chamber. Changes in blood pressure, heart rate, and platelet

aggregation were evaluated. Results have shown that LA419 significantly decreased thrombus formation according to the degree of vascular damage, and shear rate conditions in a dose-dependent manner ($p < 0.005$), without significant modifications on blood pressure and/or elevation of liver enzymes. In contrast, IS-5-MN only showed a significant reduction on platelet deposition at the high dose, that was associated to hypotension and elevation of liver enzymes. Therefore, we conclude that this new anti-ischemic NO-donor (NOD) LA419 that inhibits platelet function without modifying blood pressure may be a highly efficacious strategy to passivate platelet activation induced by a damaged vessel wall.

Keywords

Platelets, thrombosis, nitric oxide, blood pressure, pigs

Thromb Haemost 2004; 91: 1035–43

Introduction

Atherosclerotic narrowing of one or more coronary artery is responsible for myocardial ischemia and angina in most patients with stable angina pectoris (SAP). The coronary arteries of patients with SAP also contain many non-obstructive plaques, which are prone to fissures or rupture resulting in presentation of acute coronary syndromes (1). At the site of endothelial injury, there is decreased production of the endogenous inhibitors of platelet aggregation and vasoconstriction, hence creating a local prothrombotic environment. Therefore, in addition to symptomatic relief the emphasis of treatment has been to reduce atherothrombosis. Combination therapy of anti-ischemic agents and aspirin, in addition to a reduction in risk factors, provides

optimal management in patients with ischemic heart disease (2).

Under physiological conditions, nitric oxide (NO) released from platelets and endothelium is involved in many vascular processes such as vascular smooth muscle cell (VSMC) relaxation and inhibition of platelet adhesion and aggregation (3). The term "nitrovasodilator" has come to be utilized to designate a chemically heterogeneous group of agents that are linked by the fact that they contain at least one biologically active NO moiety, and that their pharmacological effect include dilatation of VSMC. Nitrovasodilators such as nitroglycerin, isosorbide-5-mononitrate (IS-5-MN) and other nitrates belong to the most widely prescribed drug category in ischemic heart disease (4). The vasodilator and antiplatelet effects of nitrovasodilators are

Correspondence to:
Prof. L. Badimon
CRC, CSIC
Jordi Girona 18-26
08034, Barcelona, Spain
Tel 34 93 4 00 61 46, Fax 34 93 2 04 59 04
E-mail: lbmucv@cid.csic.es

Received December 23, 2003
Accepted after revision February 15, 2004

Financial support:
This study was supported by funds provided by Lacer S.A. and PNS SAF-2000/0174.

Prepublished online April 5, 2004 DOI: 10.1160/TH03-12-0786

mediated mainly by an increase in guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP) level through activation of guanylate cyclase (GC) (5). In patients with SAP, oxidative stress has been reported to induce clearance of platelet and endothelial NO and inactivation of soluble GC (5, 6). Therefore, in patients with SAP, exogenous donation of NO by nitrovasodilators is the strategy nowadays used to restore NO-functions.

Treatment with conventional nitrate preparations is limited by potential hemodynamic effects (hypotension) (7), poor anti-thrombotic properties (8), and drug tolerance (9). To overcome these limitations, development of novel NO donors with anti-thrombotic/anti-ischemic properties and negligible hemodynamic effects has been a challenge for the correct treatment of patients with ischemic heart disease.

In this study, we investigated whether donation of NO with a neutral sugar organic nitrate with a protected thiol group in its molecular structure (LA419) (10) inhibits thrombosis triggered by eroded and severely damaged vessel wall at shear rates typical of patent stenotic coronary arteries in the experimental porcine model. This study indicates that the new nitric oxide donor LA419 in addition to its previously described anti-ischemic properties (10), has a high efficacy in reducing the risk of thrombotic complications in damaged vessels without modifying blood pressure.

Methods

Experimental procedure and perfusion system

Studies were performed in normal pigs (Large White × Landrace; ≈ 36 kg) housed for a week before any experimental procedure. Pigs (n=31) were sedated by intramuscular injection of 8 mg/kg of Azoperona (Stressnil[®], Esteve, Barcelona, Spain), anesthetized by intravascular infusion of pentobarbital sodium solution (10 mg/kg, B.Braum, Barcelona, Spain), and then intubated and ventilated (Dog ventilator, Ugo basile, Italy). To minimize the circulating plasma levels of pentobarbital and avoid barbiturates platelet inhibitory effect, (11) we administered 10 mg/kg i.v. bolus of pentobarbital sodium (deep anesthesia) followed by a continuous infusion of 10 mg/kg/h until the experiment had been completed. This procedure also produced a consistent anesthetic state with a minimal variation in hemodynamic parameters. Through a neck incision the carotid artery (distal portion) and contralateral jugular vein were cannulated. Then, pigs were intravenously heparinized with a bolus (50 IU/kg) followed by an infusion (50 IU/kg/h) (Liquemine[®], Roche, Switzerland). All animals received this low-dose anticoagulation with heparin (aPTT ratio ≈ 1.5-2.5) to prevent occlusion in the extracorporeal system. The catheterized carotid artery was connected by polyethylene tubing to the input of the Badimon's perfusion chamber and the output of the chamber was connected to a peristaltic pump (Masterflex, Model 7518-10,

Cole Parmer Instrument Company, USA). Blood that passed through the chamber was recirculated back into the animal by the contralateral jugular vein.

Blood drawn into perfusion flow chambers perfused the porcine vessels that were deendothelialized (model of erosion or mildly damaged) or mechanically disrupted by peeling off the intimal layer with a thin portion of subjacent media (model of disruption or severely damaged) as previously described (12). We have selected a flow rate of 10 ml/min in the small (0.1 cm diameter) and large (0.2 cm diameter) chamber. This flow gives theoretically calculated average blood velocities of 21.2 cm/s and 5.3 cm/s respectively (13). These shear rates correspond to values ranging from those of large, healthy (unobstructed) arteries (212/s) to values typical of areas of the atherosclerotic vessels (1680/s) (14). At these shear rates, blood can be considered a Newtonian fluid with constant viscosity (15). Several 5-minute perfusions (≈ 30 perfusions per pig) with varying hemodynamic conditions and triggering substrate were performed in each animal (12, 13). The perfused segments were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, and labeled platelets were counted in a gamma counter (Wizard, Wallac, USA) for quantization of deposited platelets. Values were normalized by blood ¹¹¹In activity (counts), platelet counts in blood, and area exposed surface (13). All procedures in this study were performed in accordance with institutional guidelines and followed the American Physiological Society guidelines for animal research.

Radioactive labeling of platelets

After overnight fasting, 43 ml of blood was withdrawn in 7 ml of anticoagulant citrate dextrose (ACD) solution by femoral venipuncture. Platelets were isolated by differential centrifugations and labeled with ¹¹¹In-oxine (¹¹¹In) (Amersham Biosciences, London, UK), as previously described (12). An average of $8.4 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ per μL of ¹¹¹In-labeled platelets were suspended in a final volume of 4 ml of autologous plasma, and were reinjected intravenously into the pig within 2 hours of starting the labeling procedure. Efficiency of labeling was $95 \pm 2.7\%$ and the injected activity was $250 \pm 10 \mu\text{Ci}$.

Post-mortem ¹¹¹In-biodistribution indicated a correct platelet distribution with maximal accumulation in blood (blood: $62 \pm 4\%$, liver: $21 \pm 3\%$, spleen: $8.8 \pm 1.4\%$, lungs: $3.2 \pm 0.5\%$, kidneys: $0.27 \pm 0.05\%$, heart tissue: $0.08 \pm 0.01\%$).

Drug administration

Pigs were randomly distributed in three groups: one nitrate-control (standard IS-5-MN), one treated with LA419, and one control (non-treated). Pigs were given a dosage of nitrate twice daily (9 a.m.-18 p.m.) over a period of 10 days. The non-treated group was kept under the same conditions for 10 days. In order to evaluate a possible dose-dependent effect and establish relations between compounds, IS-5-MN and LA419 were given at increasing dosages until unwanted side effects appeared. As

starting dose, we selected the maximal recommended therapeutic dose of IS-5-MN for humans. Therefore, IS-5-MN was given at a therapeutic dose of 0.9 (7, 16) and at 1.8 mg/kg, whereas LA419 was given at doses of 0.9, 1.8, 3.6, and 5 mg/kg.

Platelet aggregation

Whole blood (WB)

WB impedance platelet aggregation triggered by collagen (3, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$) (Chrono-Log model 530; ChronoLog, Yzasa SL, Havertown, USA) was measured as previously reported (17). Platelet aggregation was measured the day before starting nitrate administration and on the experimental day (day 11).

Platelet-Rich Plasma (PRP)

Optical platelet aggregation was measured in PRP as previously described (17) with a platelet aggregometer (Aggregometer II, model PA3220, Menarini Diagnostic, Firenze, Italia) at the same periods as in WB. ADP (3, 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$) and collagen (3, 5, 10, 15 $\mu\text{g/ml}$) were used as agonists.

Hematological, coagulation, biochemical and physiological parameters

Blood cell counts, hematocrit, platelet number, and size distribution were performed with a System 9000 cell analyzer (Sero-Baker Diagnostic Allentown, USA). Levels of PT (prothrombin time), aPTT (activated partial thromboplastin time) and plasma fibrinogen were monitored with an ST4 automated clotter (Diagnostica Stago, Asnières, France). To assess any adverse effects of continuous oral drug administration, blood samples were taken for the measurement of blood urea nitrogen (BUN), creatinine, aspartate aminotransaminase (AST) and alanine aminotransaminase (ALT) by routine analytical chemistry assays before and after nitrate treatment (IS-5-MN and LA 419).

Systemic blood pressure and heart rate were monitored by a pressure transducer (Leticia SA, Rochester, USA), attached to

the cannulated femoral artery. Measurements were taken throughout the experiments to determine nitrate hemodynamic effects.

Determination of platelet and plasma cGMP levels

To determine cGMP platelet and plasma levels we performed a new series of experiments. Pigs ($n=4$) were given an intravenous infusion of LA419 at doses that caused thrombosis reduction (2.5 mg/kg) (data not shown). Blood was withdrawn in EDTA at different periods (pre-treatment and 30-120 min during intravenous treatment), centrifuged at 250 \times g 10 min at room temperature (RT) and IBMX (1 mmol/l) was added to PRP to avoid phosphodiesterases activity. Samples were centrifuged at 1.400 \times g 15 min RT to obtain platelet pellets which were stored deep-frozen (-80°C) until measurement. cGMP levels were evaluated by a commercially available cGMP enzyme immunoassay (EIA) kit (Amersham, Life Science, Chicago, USA) with the addition of an acetylating step to increase sensitivity.

Immunohistochemistry

Perfused pig arterial segments were fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected with 2.3 mol/l sucrose and stored in OCT (Tissue-Tek OCT Compound 4583, Germany). Serial cut sections (4-5 μm) in the blood flow direction were analyzed. A double immunohistochemical analysis was performed with an antifibrinogen rabbit-polyclonal antibody (DAKO code No.A=080, Glosstrup, Denmark) and an anti-platelet polyclonal antibody (pabBP19) produced in our laboratory and previously described (18). Secondary antibodies were FITC-conjugated F(ab')₂ fragment of anti-rabbit polyclonal (Sigma, code No.F1262, New York, USA) and TRITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins (DAKO No.R156, Glosstrup, Denmark), respectively. Results were evaluated with a fluorescence microscope (Vanox AHB3, Olympus, Melville, USA). The images were digitalized by a Sony 3CCD camera. Controls

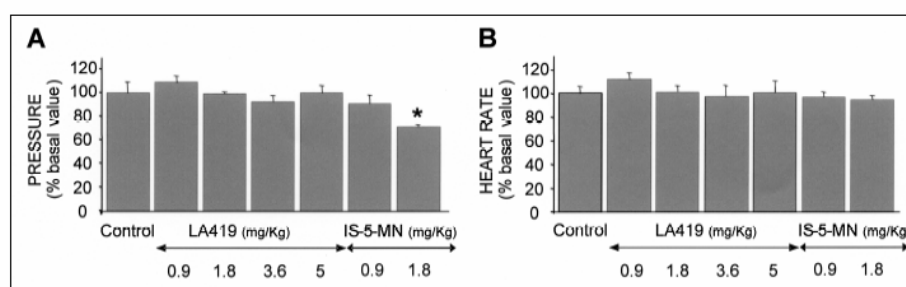


Figure 1: Follow up hemodynamical parameters. Baseline values of mean arterial pressure (A) and heart rate (B) after 10 day oral treatment with IS-5-MN or LA419 vs. control group. (MANOVA + Dunnett's test; * $p<0.05$). (blood pressure: 50.5 ± 4.8 mm Hg; heart rate: 70.0 ± 4.5).

of primary and secondary antibody staining were always performed. Control and treated vessels were analyzed from the same axial segment (centre piece) to avoid interference of location in comparative analysis (19).

Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SEM. Overall differences between groups were analyzed by Analysis of Variance measures (ANOVA). When significant, multiple comparisons were performed by Scheffé’s test. Mann-Whitney *U*-test was applied when groups had unequal variances. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

Results

Hemodynamic effects of LA419 and IS-5-MN

No significant differences vs. the non-treated group were detected in mean arterial pressure after a 10 day treatment with any of the doses tested for LA419 (Fig. 1A). On the contrary, 1.8 mg/kg of IS-5-MN (standard control) induced a significant drop in mean arterial pressure of 13 mm Hg (≈ 30% reduction vs. basal value). No significant changes in heart rate were detected with either LA419, or IS-5-MN within the dose range tested (Fig. 1B).

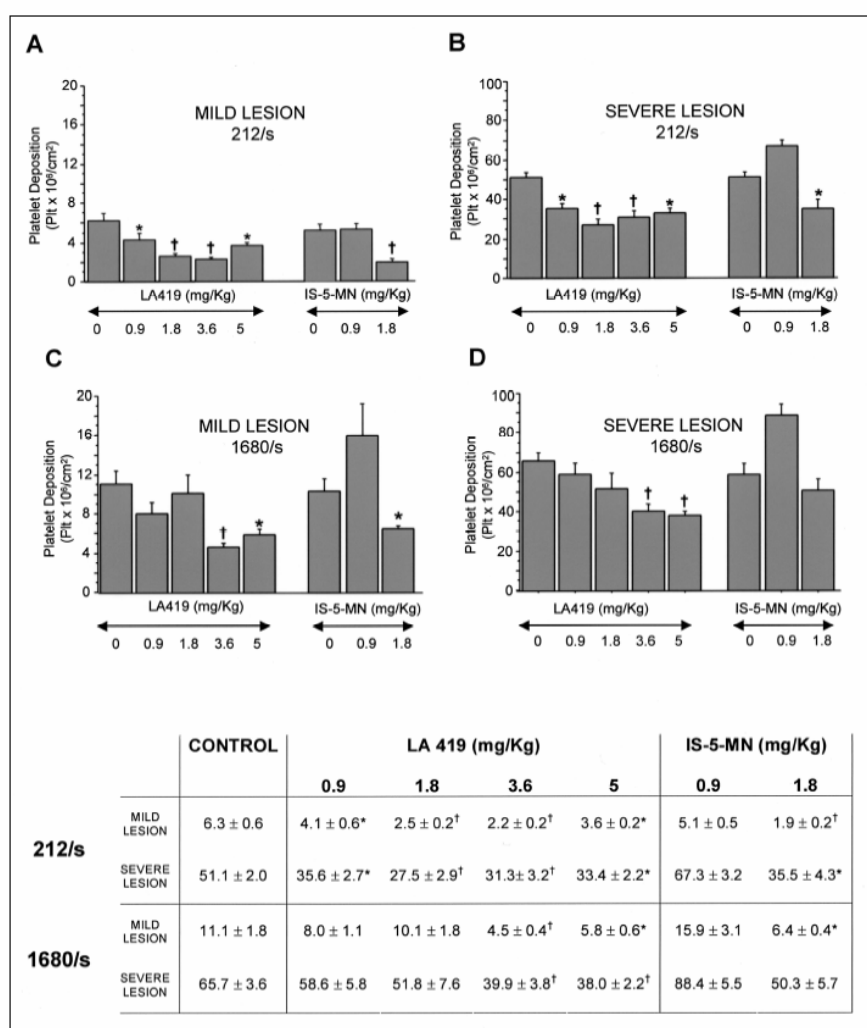


Figure 2: Bar graph and table of platelet-vessel wall interaction as determined by the radioisotopic (¹¹¹In-labeled platelets) method. Results are expressed as mean values of Platelet Deposition (× 10⁶ cm⁻²) ± SEM. Effect of oral nitrate treatment (LA419 and IS-5-MN) in platelet deposition triggered by mildly (A, C) or severely (B, D) damaged vessel wall under low (A, B) and high (C, D) shear rate conditions. Statistical analysis was performed by analysis of variance (Scheffé’s F test; **p*<0.05; †*p*<0.005).

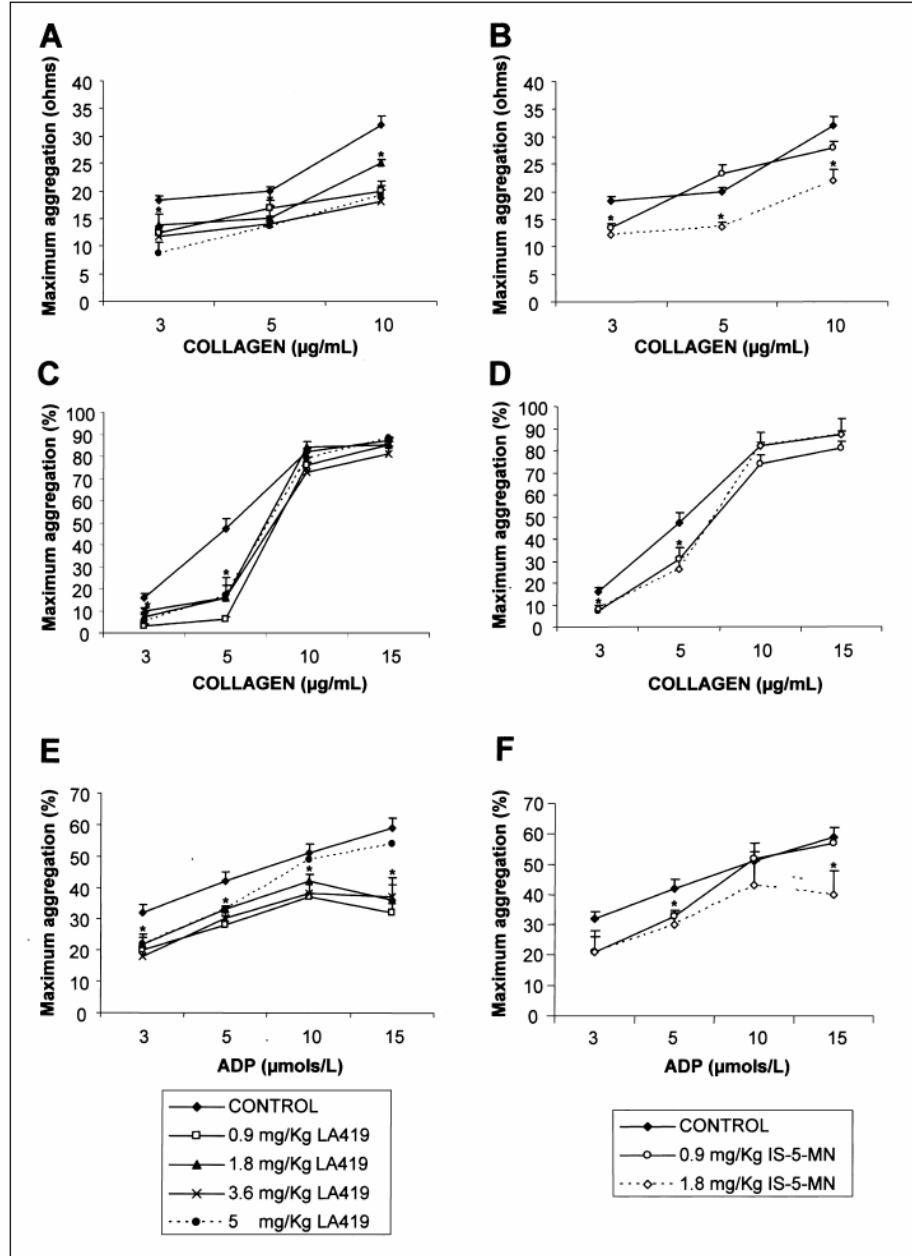


Figure 3: Effect of the different treatments on *in vitro* platelet aggregation. Whole blood (A, B) and PRP (C-F) platelet aggregation induced by collagen (A-D) or ADP (E, F). (Differences were analyzed by Mann-Whitney U-test; *p<0.05).

Antiplatelet effects of LA419 and IS-5-MN

Low local shear rate conditions (212/s)

Pigs, orally treated with 0.9 mg/kg IS-5-MN, did not inhibit platelet deposition triggered by mildly (deendothelialized) (Fig. 2A) or severely (mechanically disrupted) (Fig. 2B) damaged vessel wall. Pigs treated with an oral dose of 1.8 mg/kg IS-5-MN

showed inhibition on mural thrombosis both in mildly (Fig. 2A) (p<0.005) and severely (Fig. 2B) (p<0.05) injured vessel wall. In contrast, pigs treated with oral doses of 0.9 mg/kg LA419 showed a significant reduction on platelet deposition on both, mildly and severely (Fig. 2A-B) (p<0.05) damaged vessel wall. An oral dose of LA419 of 1.8 mg/kg showed a maximal and sig-

nificant reduction of about 50% ($p < 0.005$) in platelet deposition on mildly (Fig. 2A) and severely (Fig. 2B) damaged vessel wall (higher oral doses of LA419 showed the same inhibitory effect).

High local shear rate conditions (1680/s)

When inhibitory effects of IS-5-MN were tested at the more thrombogenic condition of high shear rate (1680/s), platelet deposition was not reduced after 10-day oral treatment with 0.9 mg/kg IS-5-MN at any degree of vascular damage (Fig. 2C-D). Although 1.8 mg/kg IS-5-MN showed a significant reduction in mildly damaged wall (Fig. 2C) it did not reach significance in severely damaged vessels (Fig. 2D). On the contrary, LA419 inhibited platelet deposition starting at 3.6 mg/kg LA419 in both mildly and severely damaged vessel wall (Fig. 2C-D) ($p < 0.005$).

Because all animals treated with 1.8 mg/kg IS-5-MN showed liver enzyme toxicity, antiplatelet effects at higher doses of IS-5-MN were not tested.

Platelet aggregation studies

Collagen-induced platelet aggregation in WB was significantly inhibited by both LA419 (Fig. 3A) and IS-5-MN (Fig. 3B) at any dose of agonist (3, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0.05$) in comparison to the control group (non-treated pigs). PRP aggregation challenged by collagen (3, 5 $\mu\text{g/mL}$) was also significantly inhibited by both nitrates, LA419 (Fig. 3C; $p < 0.01$) and IS-5-MN (Fig. 3D; $p < 0.05$). Besides, LA419 and IS-5-MN also reduced ADP (3, 5 $\mu\text{mol/L}$)-induced PRP aggregation (Fig. 3E; Fig. 3F respectively; $p < 0.01$).

cGMP levels in platelets and plasma

An increase in intraplatelet cGMP was observed just after initiation of LA419 infusion and remained over baseline levels dur-

ing the whole infusion period (Fig. 4A). No variation was detected in cGMP plasma levels compared to baseline levels (Fig. 4B).

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical staining (fibrin: Fig. 5A-D; platelets: Fig. 5E-H) of selected perfused substrates (disrupted vessels perfused at 1680/s) showed no differences on fibrin deposition after oral treatment with LA 419 (C: 1.8 mg/kg; D: 5 mg/kg) or treated with IS-5-MN (B: 0.9 mg/kg) vs. the non-treated group (A). Platelet deposition after oral treatment with IS-5-MN was not inhibited while LA419 significantly reduced platelet mural thrombus following the pattern of inhibition already seen in the radioisotopic quantitative analysis (E: control; F: 0.9 mg/kg IS-5-MN; G: LA419 1.8 mg/kg; H: LA419 5 mg/kg).

Evolution of hematological, coagulation and biochemical levels

Hematological parameters (Table 1A) were similar among the different groups, and they were within normal intervals for 1.5 month old pigs. In all animal groups, aPTT mean ratio was within the normal range for low level of anticoagulation (mean aPTT ratio: 1.5-2.5 with 50 IU/kg heparin). Fibrinogen levels remained within normal range, but showed a decrease with increasing dose of both nitrates.

Hepatic and renal enzymes were measured before and at the day 10 of oral nitrate treatment. As shown in Table 1B, plasma AST and ALT were significantly increased (exceeding physiological values) in animals treated with 1.8 mg/kg IS-5-MN and 5 mg/kg LA419 indicating hepatic toxicity.

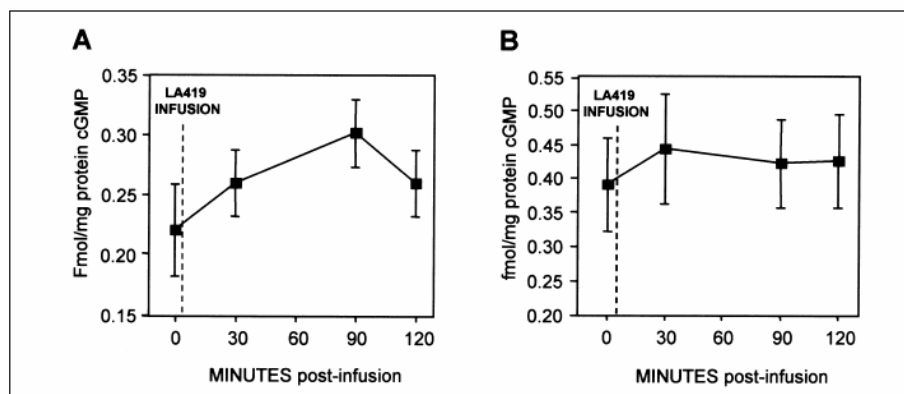


Figure 4: cGMP levels. cGMP concentrations (fmol/mg protein cGMP) were determined ($n=4$) in (A) platelets and (B) plasma before ($t=0$) and after ($t=30, 90$, and 120 min) LA419 infusion. Note the trend to higher values of intraplatelet cGMP after 30 minutes starting LA419 infusion (2.5 mg/kg) which remained over baseline levels during the whole infusion period.

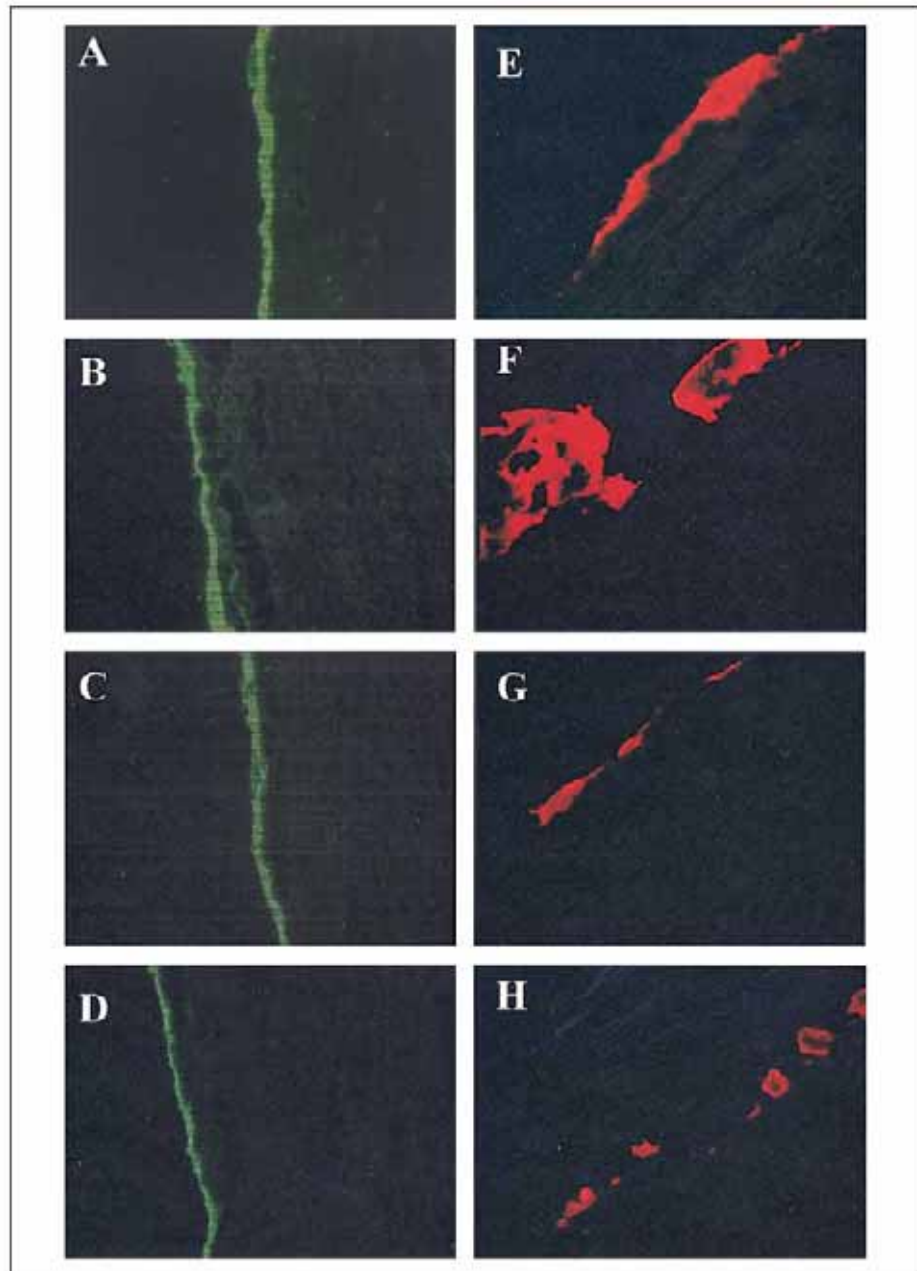


Figure 5: Representative immunophotomicrographs. Fibrin (green) (A-D) and platelet (red) (E-H) deposition on disrupted vessels at shear conditions of 1680/s in: control substrates (A, E), orally treated with IS-5-MN 0.9 mg/kg (B, F), LA419 at 1.8 mg/kg (C, G) and 5 mg/kg (D, H). No significant differences were observed on fibrin deposition while platelet deposition followed the pattern already seen in the radioisotopic quantitative analysis.

Discussion

In this study, we report that oral treatment with a new NO-donor (LA419, a neutral sugar organic nitrate with a protected thiol group in its molecular structure) (10) with tested anti-ischemic properties, decreases platelet aggregation and platelet deposi-

tion on exposed damaged vessel wall at flow conditions typical of mildly stenotic coronary arteries without modifying blood pressure. These antiplatelet effects were not observed after treatment with IS-5-MN.

The recognised role of platelets in the thrombotic processes associated to the coronary syndromes indicates that the inhibi-

A	NORMAL AVERAGE	IS-5-MN (mg/kg)		LA 419 (mg/kg)			
		0.9	1.8	0.9	1.8	3.6	5
		RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$) (5-7)	4.9 \pm 0.03	5.1 \pm 0.05	4.5 \pm 0.05	5.2 \pm 0.04	5.2 \pm 0.03
HCT (%) (26-35)	27.0 \pm 0.1	29.0 \pm 0.2	27.0 \pm 0.2	29.4 \pm 0.2	30.2 \pm 0.2	31.4 \pm 0.2	31.2 \pm 0.1
PLT ($\times 10^5/\mu\text{L}$) (250-450)	3.5 \pm 6.0	4.0 \pm 4.0	4.3 \pm 13.0	3.9 \pm 4.0	3.5 \pm 7.0	3.5 \pm 7.0	4.0 \pm 14.0
PT (s)	12.8 \pm 0.1	12.0 \pm 0.1	12 \pm 0.05	12.7 \pm 0.1	12.8 \pm 0.1	12.7 \pm 0.1	13.7 \pm 0.2
aPTT (ratio) (1.5-2.5)	2.5 \pm 0.04	2.0 \pm 0.05	1.5 \pm 0.07	2.5 \pm 0.05	1.7 \pm 0.03	1.7 \pm 0.04	1.6 \pm 0.05
Fibrinog. (mg/dL) (170-210)	198 \pm 2	187 \pm 3	180 \pm 2	195 \pm 4	189 \pm 3	186 \pm 3	170 \pm 6

B	IS-5-MN (mg/kg)			LA419 (mg/kg)				
	Before treatment	After 10 days treatment		Before Treatment	After 10 days treatment			
		0.9	1.8		0.9	1.8	3.6	5
AST (IU/L) (15.3-55.3)	21 \pm 7	16 \pm 1	81 \pm 22*	31 \pm 6	24 \pm 8	32 \pm 11	31 \pm 6	64 \pm 20*
ALT (IU/L) (9-43)	29 \pm 2	30 \pm 3	44 \pm 1*	34 \pm 3	31 \pm 0	39 \pm 2	42 \pm 1	46 \pm 6*
BUN (mg/dL) (6-30)	8 \pm 0.3	7 \pm 0.8	11 \pm 0.3	10 \pm 0.3	8 \pm 0.4	7 \pm 0.5	9 \pm 0.5	8 \pm 1
Crea. (mg/dL) (0.5-2.1)	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.07	1.1 \pm 0.02	1.2 \pm 0.06	1.3 \pm 0.05	1.1 \pm 0.05	1 \pm 0.05	1.1 \pm 0.2

Table 1: Hematological, coagulation (A) and biochemical (B) parameters in non-treated and nitrate treated groups. Red blood cells (RBC); hematocrit (HCT); platelets (PLT); prothrombin time (PT); activated partial thromboplastin time (aPTT); fibrinogen (Fibrinog.). Values are expressed as mean \pm standard error. *p<0.05.

tion of platelets by nitrates may offer an additional mechanism by which these compounds could improve perfusion to ischemic myocardium. Conflicting results have been found with i.v. and oral use of nitrates *in vitro* and *in vivo*, some reports showing inhibition (20-22) and others reporting no effect (23-25) on platelet aggregation and thrombosis. We have used a conventional and recognised oral nitrate, IS-5-MN, as positive control for the potential antiplatelet effect of LA419. A dose of 0.9 mg/kg of IS-5-MN, as described in the literature (26), showed inhibition of *in vitro* platelet aggregation but had no effect in *in vivo* platelet mural thrombosis. These differences seem to be due to the methodology used in platelet aggregation. Indeed, *in vitro* aggregation requires blood collection in citrate that depletes Ca^{++} from the sample and analyzes platelet response to a single agonist. In contrast, platelet deposition in the perfusion system is triggered by vascular wall, in flow conditions that mimic the circulation, and there is no Ca^{++} depletion, therefore Ca-dependent enzymes are fully available. These factors relevant in *in vivo* thrombosis are not accountable for in *in vitro* platelet aggregation.

A higher dose of IS-5-MN inhibited platelet deposition *in vivo*; however, the concomitant hepatic injury and drop in blood pressure abolishes its therapeutic use. Indeed, the therapeutic window for IS-5-MN seems not to include a platelet inhibitory effect of relevance in vascular lesion-triggered thrombosis. Interestingly Wallen et al. in a study in healthy subjects showed that isosorbide dinitrate only had platelet effects in individuals showing significant hemodynamic responses to the drug (22). In

contrast, 0.9 mg/kg LA419 showed a persistent decrease in platelet-thrombus formation at low shear rate conditions, without hemodynamic effects. Thrombus inhibition at higher shear rates (a higher thrombogenic stimulus) required higher doses of LA419, but doses that did not produce a blood pressure drop.

An important limitation in nitrate therapy resides in their hemodynamic side effects (7). It should be noted that the anti-thrombotic effect of IS-5-MN was observed at doses that significantly decreased blood pressure. However, antithrombotic properties of LA419 were observed at doses without hypotensive episodes. Therefore, LA419 seems to have antiplatelet therapeutic efficacy at doses without hemodynamic side effects. These results suggest that LA419 has higher platelet specificity, probably due to the presence of a thiol group in LA419 structure, which facilitates nitrate conversion to NO. Thus, the hypotensive effects induced by LA419 would probably be observed, but at doses much higher than those required to achieve an anti-thrombotic effect. A potential deleterious effect of nitric oxide on hepatic function (27) was evidenced by higher ALT, AST serum levels after treatment with 1.8 mg/kg IS-5-MN and the higher dose of LA419 (5 mg/kg). Taken together, our findings indicate that LA419 could be a potentially useful and safe agent in the treatment of ischemic heart disease.

The proposal that Nitroglycerin may exert its activity independently of its NO-releasing properties has been done by Kleschyov et al. (28). However, this study was done *in vitro* and a proper *in vivo* study must be done before this theory can be

approved. Moreover, since the pharmacodynamic and pharmacokinetic-metabolism properties of the different NO-donors differ so much, then what could be proven for Nitroglycerin should be also proven for other NO-donors. To this regard, since we have demonstrated the maintained increase in cGMP levels after LA419 administration, and that its anti-platelet activity is avoided by a NO-scavenger (carboxy-PTIO) (data not shown), we should conclude that the anti-thrombotic activity of LA 419 should be mediated by the release of NO from that molecule.

A significant reduction on fibrinogen levels by NO has been previously reported (29) and it may be considered that if the reduction does not reach the level of hypofibrinogenemia, it would diminish risk of ischemic heart disease associated to high plasma fibrinogen levels (30).

In conclusion, this study provides evidence of the *in vivo* effects of the novel compound LA419 in comparison with IS-5-MN. Oral administration of this novel NO-donor inhibits platelet mural thrombosis without modifying blood pressure. The antiplatelet effects of LA419 increase the potential benefit of this anti-ischemic molecule in patients with ischemic heart disease.

Acknowledgements

This study was supported by funds provided by Lacer S.A. and PNS SAF-2000/0174. G. Vilahir is a fellow from BEFI. E. Segalés and L. Casani are fellows from Fundación Investigación Cardiovascular. The authors thank P. Catalina and O. Bell for their technical support. The authors also thank E. Salas and J. Pedreño from Lacer S.A. for their scientific and technical help.

References

- Thadani U. Treatment of stable angina. *Curr Opin Cardiol* 1999; 14: 349-58.
- Fihn SD, Williams SV, Daley J, et al. American College of Cardiology; American Heart Association; American College of Physicians-American Society of Internal Medicine. Guidelines for the management of patients with chronic stable angina: treatment. *Ann Intern Med* 2001; 135: 616-32.
- Luscher TF, Noll G The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118: S81-90.
- Skvaril J. Nitrates in cardiology practice. *Cas Lek Cesk* 2000; 139: 343-9.
- Chirkov YY, Holmes AS, Chirkova LP, et al. Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. *Circulation* 1999; 100: 129-34.
- Wykretowicz A, Dziarnaga M, Szczepanik A, et al. Prospective evaluation of hydroperoxide plasma levels and stable nitric oxide end products in patients subjected to angioplasty for coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2003; 89: 173-8.
- Garcia Moll M. Principles and rules of the use of nitrates. *Ann Cardiol Angeiol* 1997; 46: 399-405.
- Chirkov YY, Naujalis JI, Sage RE, et al. Antiplatelet effects of nitroglycerin in healthy subjects and in patients with stable angina pectoris. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 384-9.
- Leopold JA, Loscalzo J. New developments in nitrovasodilator therapy. *Vasc Med* 1997; 2: 190-202.
- International patent number WO 00/20420. Intellectual property world organization. Derivatives of isosorbide mononitrate as vasodilator agents with reduced tolerance.
- O'Rourke ST, Folts JD, Albrecht RM. Studies on the inhibition of canine platelet aggregation by barbiturates. *J Lab Clin Med* 1986; 108: 206-12.
- Meyer B, Badimon JJ, Chesebro JH, et al. Dissolution of mural thrombus by specific thrombin inhibition with r-Hirudin. Comparison with heparin and aspirin. *Circulation* 1998; 97: 681-85.
- Badimon L, Turitto V, Rosemark JA, et al. Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: deposition of Indium 111-labeled platelets on collagen, subendothelium and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 706-18.
- Goldsmith HK, Turitto VT. Rheological aspects of thrombosis and hemostasis. *Thromb Haemost* 1986; 55: 415-35.
- Merrill EW: Rheology of blood. *Physiol Rev* 1969; 49: 863-88.
- Jones AL, Bangash IH, Walker J, et al. Portal and systemic haemodynamic response to acute and chronic administration of low and high dose isosorbide-5-mononitrate in patients with cirrhosis. *Gut* 1995; 36: 104-9.
- Galvez A, Badimon L, Badimon JJ, et al. Electrical aggregometry in whole blood from humans, pigs and rabbit. *Thromb Haemost* 1986; 56: 128-36.
- Royo T, Vidal M, Badimon L. Porcine platelet von Willebrand antigen II (vWAgII): inhibitory effect on collagen-induced aggregation and comparative distribution with human platelets. *Thromb Haemost* 1998; 80: 677-85.
- Badimon L, Badimon JJ, Galvez A, et al. Influence of arterial damage and wall shear rate on platelet deposition. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 312-20.
- Sinzinger H, Virgolini I, O'Grady J, et al. Modification of platelet function by isosorbide dinitrate in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 1992; 65: 323-35.
- Lam JY, Chesebro JH, Fuster V. Platelets, vasoconstriction, and nitroglycerin during arterial wall injury: a new antithrombotic role for an old drug. *Circulation* 1988; 78: 712-16.
- Wallen NH, Larsson PT, Broijersén A, et al. Effects of an oral dose of isosorbide dinitrate on platelet function and fibrinolysis in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1993; 35: 143-51.
- Drummer C, Valta-Seufzer U, Karrenbrock B, et al. Comparison of anti-platelet properties of molsidomine, isosorbide-5-mononitrate and placebo in healthy volunteers. *Eur Heart J* 1991; 12: 541-49.
- Fitzgerald DJ, Roy L, Robertson RM, et al. The effects of organic nitrates on prostacyclin biosynthesis and platelet function in humans. *Circulation* 1984; 70: 297-302.
- Wallen NH, Andersson A, Hjemdahl P. Effects of treatment with oral isosorbide dinitrate on platelet function *in vivo*; a double-blind placebo-controlled study in patients with stable angina pectoris. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38: 63-70.
- De Caterina R, Lombardi M, Bernini W, et al. Inhibition of platelet function during *in vivo* infusion of isosorbide mononitrates: relationship between plasma drug concentration and hemodynamic effects. *Am Heart J* 1990; 119: 855-62.
- Wang JH, Redmond HP, Wu QD, et al. Nitric oxide mediates hepatocyte injury. *Am J Physiol* 1998; 275: G1117-26.
- Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, et al. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res* 2003 ;93: e104-12.
- Kawabata A. Evidence that endogenous nitric oxide modulates plasma fibrinogen levels in the rat. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 236-7.
- Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993; 118: 956-63.

New Technologies and Diagnostic Tools

Antithrombotic effects of saratin on human atherosclerotic plaques

Gemma Vilahur, Xavier Duran, Oriol Juan-Babot, Laura Casaní, Lina Badimon

Cardiovascular Research Center, ICC-CSC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (U.A.B), Barcelona, Spain

Summary

Platelets play a primary role in thrombus formation after plaque rupture. Platelets recognize the exposed collagen via Von Willebrand factor (VWF) and become activated. Saratin, an inhibitor of the VWF-dependent binding of platelets to collagen, may reduce the thrombotic risk associated to atherosclerosis. Our objective was to evaluate the antithrombotic effects of local treatment with saratin on human atherosclerotic lesions. Thrombus formation was assessed by the deposition of ¹¹¹In-platelets on different human atherosclerotic lesions under three local shear conditions (800, 1700 and 3400/s) with blood derived from catheterized pigs. Human atherosclerotic lesions

were locally treated with saratin (30 µg/ml) at 37°C for 5 min and placed in the chamber. Under stenotic shear conditions of 800/s, saratin significantly ($p < 0.05$) reduced platelet deposition triggered by human denuded vessel wall (44%), fatty streaks (47%), severely damaged vessel (50%) and atherosclerotic plaque (57%). Thrombus characterization by immunohistochemistry showed also a reduction in fibrin deposition in treated vessels. These results suggest that the local site-specific treatment with saratin inhibits atherosclerotic plaque thrombogenicity at haemodynamic conditions typical of moderately stenotic coronary arteries.

Keywords

Von Willebrand Factor, collagen, saratin, platelets, thrombosis

Thromb Haemost 2004; 92: 191–200

Introduction

Platelets play a primary role on thrombus formation after plaque rupture and in the onset of the acute coronary syndromes (1-3). Although the characterization of the initial triggers of thrombosis would significantly improve the efficacy of platelet-inhibitory drugs, the contribution of the different plaque components to thrombosis is not completely understood. Aspirin is the gold standard in clinical antithrombotic therapy but recently new specific antiplatelet agents, such as GPIIb/IIIa antagonists, ADP receptor blockers and specific thrombin inhibitors have been introduced (4, 5). On the other hand, inhibitors of platelet adhesion are not yet in clinical trials, although some have been characterized and tested in purified systems. Platelet adhesion is mediated by Von Willebrand factor (VWF) which acts as a bridge between platelet receptors and collagen (6, 7). Under

high shear rate conditions VWF (domain A3) (8) binds to collagen type I and/or III undergoing a conformational change which will allow its binding to the platelet receptor GPIb/IX/V (domain A1) (9). After the initial tethering, platelets will become irreversibly adhered through the collagen receptors (GPIa/IIa, GPVI, GPIV, p65, TIIICBP) (10) resulting in platelet activation, degranulation and aggregation (11). Activated platelets will release tromboxane A₂, cytokines, mitogenic mediators and vasoconstrictor substances (3) that will lead to a reduction of vascular lumen, thrombus formation and contribute to restenotic complications (12). Therefore, prevention of the initial platelet adhesion step might contribute to a more efficient inhibition of the platelet response to injury in the vessel wall. However, there is not much information on the contribution of the VWF-collagen pathway to thrombosis on human atherosclerotic lesions.

Correspondence to:
Prof. L. Badimon
Cardiovascular Research Center
C/ Jordi Girona 18-26
08034, Barcelona, Spain
Tel.: 34 93 4 00 61 46, Fax: 34 93 2 04 59 04
E-mail: lbmucv@cid.csc.es

Received November 12, 2003
Accepted after resubmission May 4, 2004

Financial support:
This work has been possible thanks to the funds provided by Merck, KGaA,
FIS-C0301 and PN-SAF 2000/0174.

Prepublished online June 4, 2004 DOI: 10.1160/TH03-11-0687

Saratin (Merck, KGaA) is a 12000 Da recombinant protein (103 aminoacids with three disulfide bridges) isolated from the saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*, that site-specifically inhibits collagen (type I and III) interaction with VWF-A3 domain (13). Sequential assignment and secondary structure of saratin have been described (14). Saratin has shown to reduce platelet adhesion, hyperplasia (15), and lumen stenosis in carotid endarterectomized rats (16). Up to now saratin has shown platelet inhibitory effects on thrombosis triggered by purified proteins and damaged healthy vessel wall. Therefore, we hypothesized that saratin could also reduce platelet deposition triggered by a highly thrombogenic surface as it is the atherosclerotic plaque. Our results indicate that the local treatment with saratin (i.e. in drug-eluting stents) may reduce thrombosis associated to exposure of different human atherosclerotic lesion components, at shear rates compatible with dilated/stented stenosis in coronary arteries.

Materials and methods

Experimental model

Normal pigs (Large White x Landrace) obtained from a local single farm (n=20; body weight \approx 38 kg) were individually caged in a light, temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), and humidity controlled environment with free feeding (normal pig chow) and access to water. Animals were housed for one week before any experimental procedure, to eliminate the stress effects of transportation. All procedures in this study were performed in accordance with institutional guidelines and adhered to the American Physiological Society guidelines for animal research.

Experimental procedure

The pigs were sedated with an intramuscular injection of 8 mg/kg of Azoperona (Stressnil[®], Esteve, Spain), deeply anesthetized by intravascular infusion of pentobarbital sodium solution (10 mg/kg, B. Braum, Germany), and then intubated and ventilated (Dog ventilator, Ugo basile, Italy). Through a neck incision, the carotid artery and contralateral jugular vein were cannulated. Blood samples were collected for baseline determination of hematocrit ($30.7 \pm 0.62\%$), platelet number ($459 \pm 13 \times 10^6$ plt/ml), mean platelet volume ($56 \pm 0.4 \mu\text{m}^3$), prothombin time (PT; 12.4 ± 0.1 s), activated partial thromboplastin time (aPTT; 61 ± 8.1 s), and fibrinogen (198 ± 3 mg/dl). Pigs were intravenously heparinized with a bolus (50 U/kg) followed by an infusion (50 U/kg/h) (Liquemine[®], Roche, Switzerland). The catheterized carotid artery was connected by polyethylene tubing to the input of the Badimon perfusion chamber (17) and the output of the chamber was connected to a peristaltic pump (Masterflex, Model 7518-10, USA). Blood that passed through the chamber was recirculated back into the animal by the contralateral jugular vein. Each pig was used for about 10 perfusions. The aorta specimens (30 mm in length and 10 mm in

width) were placed in the perfusion chamber in a lateral position, forming part of the blood channel by which the test surface was directly exposed to the blood. The substrates were perfused with PBS solution at 37°C for 60 s. After the preperfusion period blood entered the chamber (internal diameter 1.0 mm) at a preselected flow rate of 5, 10 or 20 ml/min for 5 min to obtain a broad range of wall shear rates to encompass conditions in mild stenotic coronary vessels (800/s) and at higher shear rates (1700 and 3400/s) as those described for VWF-dependent-thrombosis in purified substrates or in the microcirculation. These latest high shear rates are not common in the coronaries because of the compensatory distal vasodilation when vessel diameter becomes reduced by high grade stenosis (18). At the end of blood flow, buffer was again passed for 30 s through the chamber under identical flow conditions. The number of deposited platelets on each specimen was normalized from the platelet count, the ^{111}In -activity on the perfused area and in blood, and the area of exposed surface (17).

Preparation of vessel segments and local drug treatment

Pig aorta substrates

A series of experiments were designed to gain information about the dose of saratin required to locally inhibit mural platelet deposition triggered by porcine damaged vessel wall. Pig aortas were obtained fresh, immediately cleaned from adventitia, cut in long pieces, and frozen at -80°C until needed. Before starting the experiments, the aortas were thawed in PBS at 4°C , opened longitudinally, and cut into 30×10 mm segments. Segments of pig aorta were denuded (model of erosion) or severely damaged (model of disruption) by peeling off the intimal layer with a thin portion of subjacent media (19, 20).

Substrates (N ≥ 10 for each condition) were incubated at 37°C with saratin at different concentrations (0, 3, 30 and 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ saratin) for 5 min. The solvent for saratin was PBS which was also used to incubate control tissues. Blood was perfused through the chamber at high shear rate conditions (800 and 1700/s).

Human atherosclerotic substrates

Human aorta specimens were obtained from autopsy cases within 13 to 15 h of death (unused tissues from an on-going study on sudden death), transported in PBS and immediately cleaned from adventitia, cut in long pieces and frozen at -80°C until needed. Before the experiments, the aortas were thawed in PBS at 4°C , opened longitudinally, and cut into 30×10 mm segments. The specimens were composed of denuded vessels (eroded, N=46), fatty streaks (N=60), severely damaged substrates (disrupted vessel; N=93), and atherosclerotic plaques (N=28). Human specimens devoid of endothelium were classified as denuded/eroded vessels and severely damaged lesions

were obtained by stripping of the intima (model of disruption) as described for the porcine aorta (18, 19). Special care was taken to avoid gross irregularities on the surface. Lesions macroscopically characterized by raised yellow streaks were classified as fatty streaks, while lesions macroscopically characterized by raised white or yellow-white plaques were classified as atherosclerotic plaques. Substrates for each experiment were used in a randomized fashion. Human specimens were incubated in PBS solution with or without saratin (30 µg/ml) at 37°C for 5 min. Blood was perfused at different shear rate conditions (800, 1700 and 3400/s).

Platelet interaction with collagen under elevated shear

We performed additional flow chamber perfusion studies using collagen-coated plastic slides, following previously published methods (21), to assess the inhibitory effect of saratin on platelet-collagen interaction under high shear rate conditions. For this purpose, Permanox® plastic slides (30×10 mm) were coated with fibrillar collagen from bovine Achilles tendon (at a concentration of 16 µg/ml). The plastic slides were kept in a humid atmosphere overnight, then washed, and blocked with 3% BSA for 2 h. PBS solution (with or without saratin 30 µg/ml) was added for 5 min at 37°C. Collagen-coated surfaces were placed in the perfusion chamber and perfused as described above at shear rates of 800 and 3400/s. Commassie blue stain (protein) showed a uniform coverage of collagen in the plastic slides. Furthermore, staining of the collagen-coated slides after blood perfusion showed that the collagen matrix had not been dislodged or peeled off by the flow.

Radioactive labeling of platelets

Approximately 24 hours before the perfusion experiment, autologous platelets were labelled with ¹¹¹In-oxine (¹¹¹In) (Amersham, Germany) as previously described (20). In brief, 43 ml of blood were withdrawn in 7 ml ACD solution (0.8% citric acid, 2.2% trisodium citrate, 2.45% dextrose, pH 5). Platelets were isolated by low speed centrifugation (400g, 10 min), resuspended in ACD-saline (14.4% ACD solution in saline, pH 6.50) and labeled with ¹¹¹In. An average of $7.3 \times 10^6 \pm 0.12 \times 10^6$ per µl of ¹¹¹In-labeled platelets was reinjected in a final volume of 4 ml of autologous plasma. Efficiency was $96 \pm 1.2\%$ and the injected activity was 249 ± 9 µCi. The labeling procedure was performed approximately within 2 hours.

Biodistribution of indium-¹¹¹-labeled platelets and biochemical analysis

At the end of the perfusion experiment post-mortem ¹¹¹In-biodistribution indicated a correct platelet distribution with maximal accumulation in blood ($47 \pm 4\%$ in blood, $28 \pm 3\%$ in liver, $14 \pm 2\%$ in spleen, $4.0 \pm 0.5\%$ in lungs, $0.20 \pm 0.03\%$ in kidneys, and $0.11 \pm 0.02\%$ in heart tissue). Serum levels of creati-

nine (1.00 ± 0.04 mg/dl), cholesterol (73.0 ± 4.0 mg/dl), protein (4.91 ± 0.05 g/dl), glucose (101.0 ± 7.5 mg/dl), AST (22.0 ± 7.0 U/l) and ALT (33.0 ± 2.4 U/l) were measured by routine analytical chemistry assays and all values were within normal range for pig blood. Indium release from platelets was analyzed throughout the experimental perfusion period and it was always <4%.

Conventional histology and immunohistochemistry in human atherosclerotic substrates

Perfused substrates were fixed in 4% paraformaldehyde, cryo-protected with 2.3 M sucrose and frozen over dry ice in OCT (Tissue-Tek OCT Compound 4583, Leica, Germany). Serially cut 4- to 5 µm sections were obtained from the centerline of the vessel, longitudinal to the blood flow direction (Lung CM 300 Cryostat, Leica, Germany). Sections were mounted on gelatinized slides for immunohistochemistry or conventional staining and stored at -20°C until tested. Masson's Trichromic staining allowed visualization of the different atherosclerotic lesions. For immunohistochemical analysis, antifibrinogen polyclonal antibody (DAKO code No.A=080, Denmark) and an anti-platelet polyclonal antibody (pabBP19) produced in our laboratory (20) were used as primary antibodies. Secondary antibodies were FITC-conjugated F(ab')₂ fragment of anti-rabbit polyclonal (Sigma, code No.F1262, USA) and TRITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins (DAKO No.R156, Denmark). Images were captured with an Olympus Vanox AHB3 microscope and digitalized by a Sony 3CCD camera. Controls of primary and secondary antibody staining were always performed. Control and treated vessels were analyzed from the same axial segment to avoid interference of location in comparative analysis.

Hematological measurements

After each sequence of perfusions, blood samples were collected from each animal and evaluated for platelet count, hematocrit, red blood cells count, fibrinogen levels, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and indium-release from platelets.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM unless otherwise stated. Statistical significance of overall differences between groups was analyzed by analysis of variance (ANOVA) and by Mann-Whitney U test. A Power Macintosh computer equipped with Statview™ software (Abacus, Inc) was used for all analysis. Values of $p < 0.05$ were regarded as statistically significant.

Effects of saratin on human atherosclerotic plaque

Human atherosclerotic tissues were locally treated with saratin (30 µg/ml) for 5 min at 37° C, and the vessels were mounted in the chamber. Under stenotic shear conditions of 800/s, saratin significantly reduced platelet deposition in all conditions. Reductions with respect to control vessels were 44% on denuded vessel wall, 47% on fatty streaks, 51% on severely damaged vessels, and 57% on atherosclerotic plaque (Table 2) (p<0.05). At shear rate conditions of 1700/s saratin treated human substrates only showed a significant platelet reduction in fatty streaks (p<0.05). No change in platelet deposition was observed at the higher shear rate (3400/s) at any degree of vascular damage.

Immunohistochemical staining (fibrin: Fig. 4; platelets: Fig. 5) was performed on denuded vessel (thrombotic response similar to that on fatty streaks) and severely damaged vessel wall (thrombotic response similar to that on atherosclerotic plaques). The selected human perfused substrates (A, B: denuded vessel; C, D: severely damaged vessel) showed a mild reduction of fibrin deposition after local treatment with saratin (30 µg/ml) for 5 min in both denuded (Fig. 4B) and severely damaged vessels (Fig. 4D) with respect to control substrates (Fig. 4A and 4C). Denuded human vessels demonstrated minimal platelet deposition (Fig. 5A) while severely damaged vessels induced thrombus formation (Fig. 5C). Platelet deposition after saratin treatment followed the pattern of inhibition already seen in the radioisotopic quantitative analysis (denuded vessel Fig. 5B; severely damaged vessel Fig. 5D).

Effects of saratin on collagen-induced thrombus formation under high shear

Saratin significantly reduced platelet adhesion to collagen-coated slides at high shear rates (800/s, p=0.048; 3400/s, p=0.02) (Fig. 6). Interestingly, saratin induced a 4-fold reduction on thrombus formation at shear rate of 800/s (16.3 ± 9 vs. 4 ± 2 ×10⁶ platelets/cm²; Fig. 6A) while a 16-fold reduction was achieved at a higher shear rate (3400/s: 83 ± 30 vs. 5 ± 1.5 ×10⁶

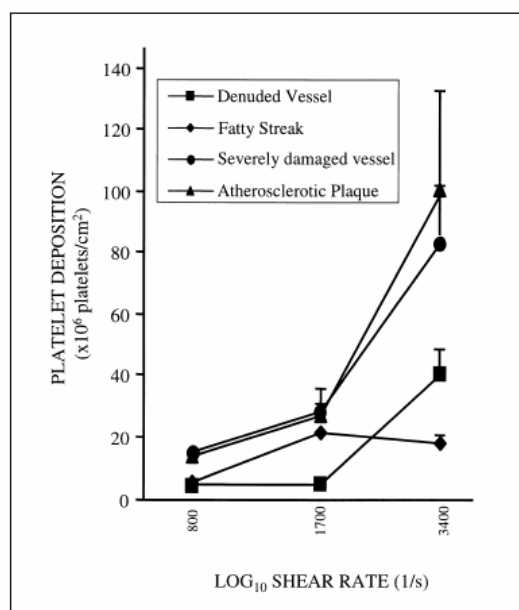


Figure 2: Shear and lesion dependence of platelet deposition on human atherosclerotic lesions. Human denuded/eroded vessel (N= 23) or fatty streaks (N=31) showed less platelet deposition than severely damaged disrupted arteries (N=46) or atherosclerotic plaque (N=14) substrates, and in general platelet deposition increased with increasing shear rates.

platelets/cm²; Fig. 6B). According to these results, saratin-induced inhibition of platelet deposition (% inhibition vs. non-treated) was in agreement with a VWF-dependent effect, increasing with increasing shear rate. It was approximately 75% at 800/s and 94% at 3400/s (Fig. 6C).

Laboratory data

No significant differences were found in hematological parameters before and after starting perfusions of saratin-treated ves-

Table 1: Two factor ANOVA (shear rate and substrate) analysis. Values of p ≥ 0.05 were regarded as non-significant (N.S.).

COMPARISONS	SHEAR RATE	SUBSTRATE
Denuded vessel vs fatty streak	0.03	N.S
Denuded vessel vs severely damaged vessel	0.005	0.02
Denuded vessel vs atherosclerotic plaque	0.0002	0.004
Fatty streak vs severely damaged vessel	0.01	0.01
Fatty streak vs atherosclerotic plaque	0.0002	0.0006
Severely damaged vessel vs atherosclerotic plaque	0.001	N.S

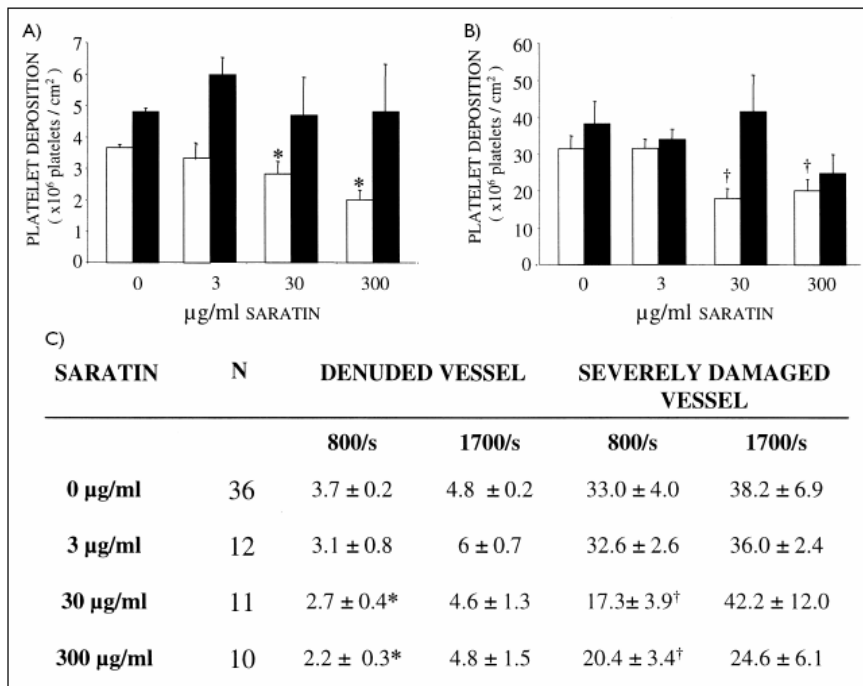


Figure 1: Platelet interaction with damaged pig vessel wall. A) Platelet deposition triggered by denuded pig vessel wall (* p<0.05 vs. untreated). B) Platelet deposition triggered by severely damaged pig vessel wall († p<0.01 vs. untreated). C) Table of results. Results are expressed as mean values of platelet deposition (x10⁶ platelets / cm²) ± SEM. (Open bars, 800/s; hatched bars, 1700/s).

Results

Efficacy of saratin on thrombus formation: dose-finding studies

The antithrombotic effects of saratin were tested under well defined shear conditions and surface thrombogenicity.

Denuded pig vessel wall (model of erosion)

Platelet deposition triggered by denuded vessel wall was significantly inhibited at 800/s with local saratin treatment (30 µg/ml and 300 µg/ml) after 5 min incubation at 37°C (p<0.05) (Fig. 1A). Platelet deposition was reduced from 3.7 ± 0.2 × 10⁶ platelets/cm² (non-treated) to 2.7 ± 0.4 × 10⁶ platelets/cm² (30 µg/ml saratin; ≈27% reduction vs. non-treated) or to 2.2 ± 0.3 × 10⁶ platelets/cm² (300 µg/ml saratin; ≈40% reduction vs. non-treated). No significant differences were observed at higher shear rate.

Severely damaged pig vessel wall (model of disruption)

Platelet deposition triggered by severely damaged vessel wall was significantly reduced at shear rate of 800/s with saratin at concentrations of 30 and 300 µg/ml (p<0.01) (Fig. 1B). At a local saratin treatment of 30 µg/ml the maximal inhibitory effect

was reached, with a reduction of ≈52% (33.0 ± 4.0 vs. 17.3 ± 3.9 × 10⁶ platelets/cm²). There were no significant effects at 1700/s.

Thrombus formation on human atherosclerotic substrates

The pattern of thrombus formation on human atherosclerotic lesions was directly regulated by local rheological conditions and tissue characteristics (Fig. 2). Human denuded vessel or fatty streaks showed less platelet deposition than severely damaged or atherosclerotic plaque substrates. Platelet deposition on human denuded vessel, fatty streaks, severely damaged or atherosclerotic plaque increased with increasing shear rates. Two factor ANOVA (A, shear rate; B, substrate) (Table 1) showed significant effects of substrate on platelet deposition, except for similar platelet deposition in denuded vessel and fatty streak and in severely damaged vessel and atherosclerotic plaque. Effects of shear rate range (800 to 3400/s) were significant in each case. Figure 3 shows the Masson's Trichrome stain of human denuded/eroded vessel (Fig. 3A), fatty streak (Fig 3B and 3E), severely damaged disrupted vessel (Fig. 3C), and atherosclerotic plaque (Fig. 3D).

sels (platelet count: 420.0 ± 10.5 vs. $437.0 \pm 12.9 \times 10^6/\text{mm}^3$; red blood cells: 5.40 ± 0.08 vs. $5.60 \pm 0.11 \times 10^6/\text{mm}^3$; hematocrit: 30.70 ± 0.30 vs. $30.80 \pm 1.00\%$). Basal coagulation parameters were neither changed after saratin (fibrinogen levels:

201.0 ± 4.1 vs. 205.0 ± 3.4 mg/dl; prothrombin time: 12.7 ± 0.2 vs. 12.5 ± 0.2 s; activated partial thromboplastin time: 227 ± 35 vs. 232.0 ± 21 s).

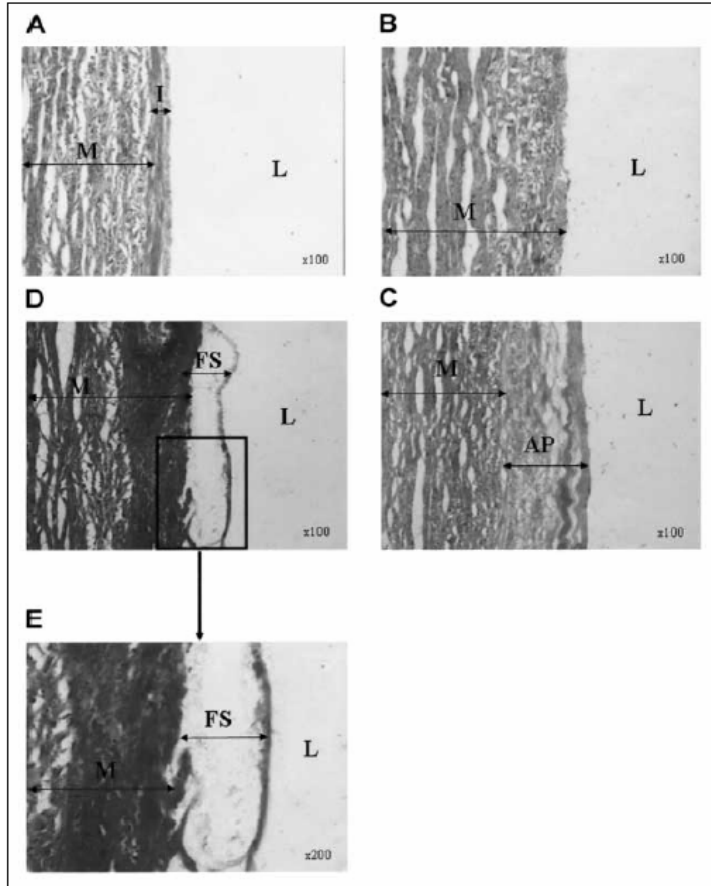


Figure 3: Masson's Trichrome stain of human denuded vessel (without endothelium) (A), fatty streak (B), severely damaged (disrupted exposure of the medial-layer) vessel (C), and atherosclerotic plaque (D). E, Fatty streak histological photomicrograph at higher resolution. Lipid content (B, D, E) has been lost due to the staining procedures. (L, lumen; I, intima; M, media; FS, fatty streak; AP, atherosclerotic plaque).

Table 2: Platelet interaction with human atherosclerotic components as determined by the radioisotopic (^{111}In -labeled platelets) method under different shear rate conditions. Results are expressed as mean values of platelet deposition ($\times 10^6$ platelets / cm^2) \pm SEM. (* $p < 0.05$ vs. control).

	SHEAR RATE (1/s)	DENUDED VESSEL (N=46)		FATTY STREAKS (N=60)		SEVERELY DAMAGED (N=93)		ATHEROSCLEROTIC PLAQUE (N= 28)	
		Control (N=23)	saratin (N=23)	Control (N=31)	saratin (N=29)	Control (N=46)	saratin (N=47)	Control (N=14)	saratin (N=14)
	800	4.3 \pm 0.6	2.5 \pm 0.5*	5.1 \pm 0.7	2.6 \pm 0.5*	14.9 \pm 2.5	7.6 \pm 0.9*	13.8 \pm 2.7	6.0 \pm 2.2*
	1700	4.8 \pm 0.9	4.3 \pm 0.6	21.1 \pm 10	7.0 \pm 1.5*	28.4 \pm 3.1	23.0 \pm 5.0	27.3 \pm 8.9	24.3 \pm 7.4
	3400	40.2 \pm 8.2	38.3 \pm 10.1	18.2 \pm 4.0	20.1 \pm 5.2	82.2 \pm 20.4	83.1 \pm 23.2	98.9 \pm 34.1	51.7 \pm 36.6

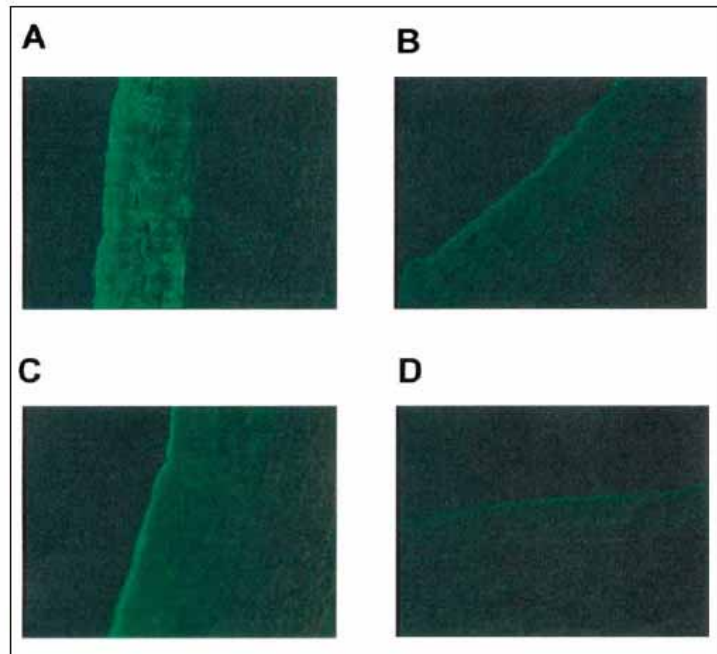


Figure 4: Representative immunophotomicrographs of fibrin deposition under shear rate conditions of 800/s. Non-treated (control) human substrates (A, C) or treated with saratin (B, D). Saratin reduced fibrin deposition. A, B: denuded/eroded vessel; C, D: severely damaged disrupted vessel. (Magnification x200).

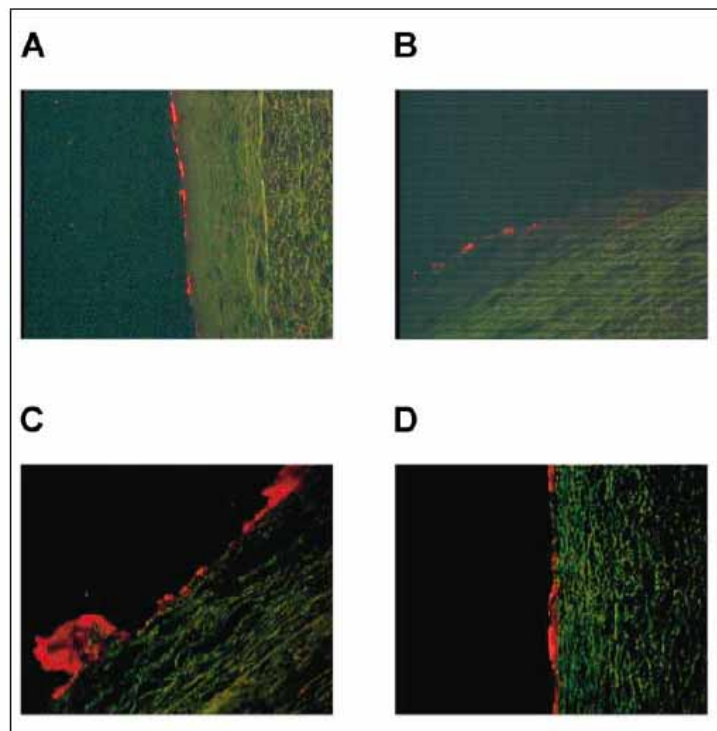


Figure 5: Representative immunophotomicrographs of platelet deposition at shear conditions of 800/s. Non-treated (control) human substrates (A, C) or treated with saratin (B, D). Saratin reduced thrombus formation. A, B: denuded/eroded vessel; C, D: severely damaged disrupted vessel. (Magnification x200)

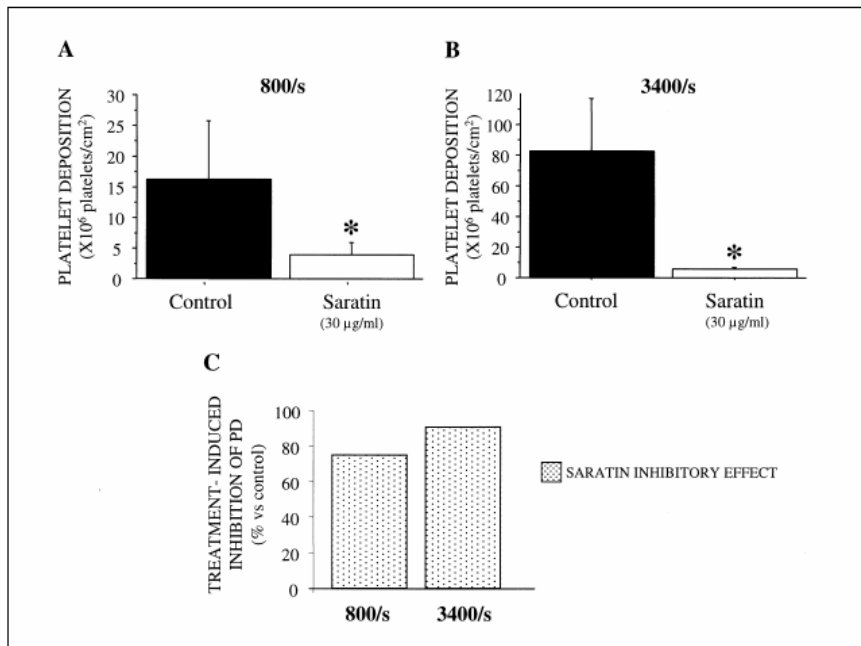


Figure 6: Bar graph of platelet interaction with collagen-coated slides under high shear rate conditions. Results are expressed as mean values of Platelet Deposition ($\times 10^6$ platelets / cm^2) \pm SEM. Collagen-coated slides were incubated in PBS with (N=16) or without (N=16) saratin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 5 min; 37°C)

at 800 and 3400/s. Saratin-treated collagen slides showed a significant decrease on platelet deposition with respect to controls both at 800/s (A) and 3400/s (B). Treatment-induced inhibition of platelet deposition at 800/s and 3400/s (C).

Discussion

Under high shear conditions ($>650/\text{s}$) (22) Von Willebrand Factor-A3 domain (VWF) plays an important role in mediating platelet adhesion to purified collagen preparations (8). VWF-A3 binding to collagen is followed by a conformational change which will enable VWF-A1 domain/GPIb/IX platelet receptor interaction leading to platelet activation (9). Activated platelets provide a surface for the assembly of the coagulation protein complexes that generate thrombin, and also serve as a nidus for fibrin clots (23). Interestingly, there are no studies on the impact of this hemostatic pathway in arterial thrombosis triggered by atherosclerotic plaques.

Up to now, only a few *in vivo* studies in animal models have reported that inhibition of platelet-VWF interaction is effective in reducing thrombogenesis triggered by injured arteries. These studies include the use of anti-GPIb monoclonal antibodies (MoAb) (24, 25), anti-VWF MoAb (26), a recombinant Von Willebrand factor GPIb binding domain (VCL) (27), and other leech-derived substances as calin (28) or leech antiplatelet protein (LAPP) (29). Although potentially efficacious they have shown some secondary unwanted effects in the animal models

and experimental designs studied; as such, anti-GPI MoAbs seem to induce severe thrombocytopenia (25, 30), VCL prolongs bleeding time (31), and local treatment with LAPP has shown no effect on thrombus formation in baboons (29). We show here that local treatment of atherosclerotic human plaques with saratin, seems to reduce their thrombogenicity under certain flow conditions. Saratin, a recombinant protein isolated from the saliva of the leech *Hirudo medicinalis*, had previously shown a potent inhibitory effect on VWF-dependent platelet adhesion to purified collagen at high to very high shear rates (13).

Additionally, Cruz et al (16) demonstrated that topical application of saratin in a normal rat carotid endarterectomy model reduced thrombus formation (low shear rate). In our study, we demonstrate that local treatment of highly thrombogenic atherosclerotic vessels with saratin reduces thrombus formation. Indeed, all damaged human substrates incubated with saratin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and perfused at shear rates of 800/s showed a significant reduction on platelet deposition. However, no significant reduction on platelet deposition was observed at higher shear rate conditions (1700 and 3400/s). Interestingly, our data showing saratin inhibitory effects on platelet deposition induced by

collagen-coated surfaces under high shear rates (800 and 3400/s) suggest that saratin remains bound to collagen as already described (13). Therefore, our results with human atherosclerotic and damaged porcine vessels suggest that thrombosis at high shear rates is not as dependent on VWF as it may be the case for purified collagen. Indeed, we have previously shown that on highly thrombogenic surfaces such as atherosclerotic plaque the blockade of the thrombin pathway seems to be highly effective (32).

While on purified collagen monolayers VWF-dependent effects were evident at shear rates typical of the microcirculation (>1000 /s) (29, 33), in pig arterial substrates we have previously shown that VWF effects were also evident at low shear rates typical of larger vessels (200 to 400/s) (34). Therefore, our data perfusing atherosclerotic human vessels support the concept that saratin effects are significant at those shear rates typical of coronary circulation. Indeed, the highest prevalence of thrombus-dependent acute coronary syndromes occur in coronaries that are moderately stenotic (35). Moreover, saratin was more efficacious in diminishing thrombosis induced by highly thrombogenic surfaces (severe plaques and severely damaged disrupted vessels), conditions that are mainly associat-

ed to the presentation of the acute coronary syndromes. Immunohistochemical analysis supported the decrease in platelet deposition already seen in the radioisotopic quantitative analysis and additionally showed a decrease in fibrin deposition on denuded and severely damaged vessels.

In conclusion, this study demonstrates that local saratin treatment significantly decreases platelet deposition and mural thrombus formation triggered by human atherosclerotic lesions at hemodynamic conditions typical of moderately stenotic coronary arteries. Saratin treatment may become a successful approach in the local treatment of revascularized vessels with drug-eluting stents because interventional procedures usually expose highly thrombogenic surfaces to circulating blood. Additionally, saratin has previously shown anti-restenotic properties (13) that, in addition to its antithrombotic profile, may be of benefit in revascularization stent-mediated procedures.

Acknowledgements

G. Vilalur is a fellow from BEFI (Beca Formación en Investigación). O. Juan Babot is a post-doctoral fellow from Fundación Investigación Cardiovascular. X. Duran and L. Casani are pre-doctoral fellows from Fundación Investigación Cardiovascular. The authors thank P. Catalina and O. Bell for their technical support.

References

- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992; 326: 310-8.
- Muller JE, Kaufmann PG, Luepker RV, et al. Mechanisms precipitating acute cardiac events: review and recommendations of an NHLBI workshop. National Heart, Lung, and Blood Institute. Mechanisms Precipitating Acute Cardiac Events Participants. *Circulation* 1997; 96: 3233-9.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8: 1227-34.
- Dogne JM, Leval Xd X, Benoit P, et al. Recent advances in antiplatelet agents. *Curr Med Chem* 2002; 9: 577-89.
- Patrono C, Collier B, Dalen JE, et al. Platelet-active drugs : the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 2001; 119: 395-635.
- Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol* 1996; 72: 341-8.
- Ruggeri ZM. Von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1997; 99: 559-64.
- Lankhof H, van Hoesj M, Schiphorst ME, et al. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost* 1996; 75: 950-8.
- Obert B, Houllier A, Meyer D, et al. Conformational changes in the A3 domain of von Willebrand factor modulate the interaction of the A1 domain with platelet glycoprotein Ib. *Blood* 1999; 93: 1959-68.
- Watson S, Berlanga O, Best D, et al. Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 2000; 11: 252-8.
- Adams PC, Badimon JJ, Badimon L, et al. Role of platelets in atherogenesis: relevance to coronary arterial restenosis after angioplasty. *Cardiovasc Clin* 1987; 18: 49-71.
- Chandrasekar B, Tanguay JF. Platelets and restenosis. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 555-62.
- Barnes CS, Krafft B, Frech M, et al. Production and characterization of saratin, an inhibitor of von Willebrand factor-dependent platelet adhesion to collagen. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 337-48.
- Maurer T, Bonke J, Frech M, et al. Sequential assignment and secondary structure of saratin, an inhibitor of von Willebrand factor-dependent platelet adhesion to collagen. *J Biomol NMR* 2001; 21: 77-8.
- Smith TP, Alshafie TA, Cruz CP, et al. Saratin, an inhibitor of collagen-platelet interaction, decreases venous anastomotic intimal hyperplasia in a canine dialysis access model. *Vasc Endovascular Surg* 2003; 37: 259-69.
- Cruz CP, Eidt J, Drouilhet J, et al. Saratin, an inhibitor of von Willebrand factor-dependent platelet adhesion, decreases platelet aggregation and intimal hyperplasia in a rat carotid endarterectomy model. *J Vasc Surg* 2001; 34: 724-9.
- Badimon L, Turitto V, Rosemark JA, et al. Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biological and prosthetic materials: deposition of Indium 111-labeled platelets on collagen, subendothelium and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 706-18.
- Gould KL, Lipscomb K, Calvert C. Compensatory changes of the distal coronary vascular bed during progressive coronary constriction. *Circulation* 1975; 51: 1085-94.
- Badimon L, Badimon JJ. Mechanisms of arterial thrombosis in nonparallel streamlines: platelet thrombi grow on the apex of stenotic severely injured vessel wall. Experimental study in the pig model. *J Clin Invest* 1989; 84: 1134-44.
- Alfon J, Royo T, Garcia-Moll X, et al. Platelet deposition on eroded vessel wall at a stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1812-7.
- Kauhanen P, Kovanen PT, Lassila R. Coimmobilized native macromolecular heparin proteoglycans strongly inhibit platelet-collagen interactions in flowing blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: E113-9.
- Sakariassen KS, Baumgartner HR. Axial dependence of platelet-collagen interactions in flowing blood. Upstream thrombus growth impairs downstream platelet adhesion. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 33-42.
- Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, et al. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001; 413: 74-8.

24. Cauwenberghs N, Meiring M, Vauterin S, et al. Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1347-53.
25. Cadroy Y, Hanson SR, Kelly AB, et al. Relative antithrombotic effects of monoclonal antibodies targeting different platelet glycoprotein-adhesive molecule interactions in nonhuman primates. *Blood* 1994; 83: 3218-24.
26. Wu D, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, et al. Inhibition of the von Willebrand (VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in abolition of *in vivo* arterial platelet thrombus formation in baboons. *Blood* 2002; 99: 3623-8.
27. Zahger D, Fishbein MC, Garfinkel LI, et al. VCL, an antagonist of the platelet GPIb receptor, markedly inhibits platelet adhesion and intimal thickening after balloon injury in the rat. *Circulation* 1995; 92: 1269-73.
28. Deckmyn H, Stassen JM, Vreys I, et al. Calin from *Hirudo medicinalis*, an inhibitor of platelet adhesion to collagen, prevents platelet-rich thrombosis in hamsters. *Blood* 1995; 85: 712-9.
29. Schaffer LW, Davidson JT, Siegl PK, et al. Recombinant leech antiplatelet protein prevents collagen-mediated platelet aggregation but not collagen graft thrombosis in baboons. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1593-601.
30. Becker BH, Miller JL. Effects of an antiplatelet glycoprotein Ib antibody on hemostatic function in the guinea pig. *Blood* 1989; 74: 690-4.
31. McGhie AI, McNatt J, Ezov N, et al. Abolition of cyclic flow variations in stenosed, endothelium-injured coronary arteries in nonhuman primates with a peptide fragment (VCL) derived from human plasma von Willebrand factor-glycoprotein Ib binding domain. *Circulation* 1994; 90: 2976-81.
32. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1999; 99: 1780-7.
33. Sugimoto M, Tsuji S, Kuwahara M, et al. Shear-dependent functions of the interaction between soluble von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib in mural thrombus formation on a collagen surface. *Int J Hematol* 1999; 69: 48-53.
34. Badimon L, Badimon JJ, Turitto VT, et al. Role of von Willebrand Factor in mediating platelet-vessel wall interaction at low shear rate: the importance of perfusion conditions. *Blood* 1989; 73: 961-7.
35. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, et al. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation* 1990; 82: II47-59.

ANEXO III.

PUBLICACIONES PENDIENTES.

Diet enrichment with virgin olive oil reduces the atherothrombotic risk profile.

Casani L, MS

Segales E, MS

Llampayas O, MS

Badimon L, PhD, FAHA, FESC.

Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital Santa Creu i Sant Pau,

UAB, Barcelona, Spain

Running head: Casani L *et al.* Olive oil and thrombosis

Total word count: 4249

Correspondence: Prof. L.Badimon

Cardiovascular Research Center. Pavelló del Convent

Avda. Sant Antoni Maria Claret # 167

08025 Barcelona, Spain.

fax # +34 935565559

phone# +34 935565900

e-mail: LBadimon@csic-iccc.santpau.es

Acknowledgements

This work has been possible thanks to funds provided by SAF-2003-03187, FIS-PI 042371, and Red RECAVA C03/01.

ABSTRACT

Background. Epidemiologic studies have demonstrated that the Mediterranean diet due to its high content in antioxidants and mono and polyunsaturated fatty acids is associated to a reduction in the development and manifestation of cardiovascular disease. Olive oil intake has been shown to contribute to these benefits with a wide range of healthy effects (in lipoprotein oxidation, coagulation, fibrinolysis and lipid profile). **Objectives.** To study *in vivo*, whether the effects of olive oil in platelet aggregation could be overridden by the increase in dietary fat associated to the consumption of a diet supplemented with olive oil. **Design.** Control animals fed for 30 days a regular chow (fat 3.83%, protein 22.04%, carbohydrates 50.24%, fiber 5.66%, minerals 8.13%) were compared to animals fed the same diet, but with a daily addition of extra virgin olive oil (Hojiblanca, Málaga, Spain). Platelet aggregation was measured in platelet rich plasma (PRP) using ADP and collagen as aggregating reagents. Thrombosis was evaluated in the previously validated Badimon perfusion chamber measuring mural platelet deposition. Changes in plasma and platelet lipid composition were also analyzed. Genes involved in the atherosclerotic process were analyzed by RT-PCR. **Results.** Platelet aggregation was significantly reduced in animals ingesting olive oil. Mural platelet deposition was similar in groups fed or not olive oil. No significant changes were observed in plasma lipid levels despite of the increase in fat intake. **Conclusions.** Daily olive oil ingestion significantly reduces platelet aggregation and does not affect other risk factors involved in the atherosclerotic process.

Keywords: olive oil, platelets, thrombosis

INTRODUCTION

The influence of dietary habits in the incidence and progression of coronary heart disease has been amply demonstrated in experimental and epidemiological studies [1,2]. The InterHeart Study [3] has shown that a diet rich in vegetables is negatively associated to CDV disease risk. The “Seven Countries” [4] study showed that mortality was lower in the inhabitants of the Mediterranean area than in those of the United States or Northern Europe. The diet ingested by Southern European populations had high proportion of fats due to the large intake of monounsaturated fatty acids (MUFA), mainly as oleic acid and essentially from olive oil, while the Westernized diet consumed in the rest of developed countries included a large proportion of saturated animal fats with high amount of saturated fatty acids (SFA). Interventional studies have demonstrated the pleiotropic effects of olive oil in cardiovascular disease beyond cholesterol lowering. As such, studies performed with healthy volunteers ingesting oleic-enriched diets resulted in a decrease of Low Density Lipoproteins (LDL) susceptibility to lipid peroxidation [5]. These LDL particles enriched in oleic acid promoted less adhesion and chemotaxis of monocytes [6,7]. Consumption of olive oil decreases plasma levels of von Willebrand factor (vWF), tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue plasminogen activator type 1 (PAI-1) plasma levels [8], and reduce a cancer cell line proliferation [9]; MUFA diets decrease the prothrombotic environment, modifying both coagulation and fibrinolysis [10]. The antithrombotic effects of olive oil have been experimentally tested in animals (rats and rabbits) producing favourable results [11,12], although none of these studies evaluated effects of an increase in caloric intake due to olive oil addition to the diet on the thrombotic risk upon vascular wall damage and exposure to circulating blood. Due to the resemblance of the porcine vascular system (structurally and physiologically) to that of humans, we used an in vivo and ex vivo porcine experimental model of extracorporeal perfusion in the Badimon’s chamber that

allows us to mimic different vascular conditions of coronary arteries. We evaluated whether the amount of fat provided by extra virgin olive oil as a single dietary modification could influence thrombosis triggered by a thrombogenic vessel under characterized flow conditions. Therefore, normolipemic animals receiving a complete growing chow were fed (or not) an extra-amount of olive oil ($\geq 80\%$ oleic acid) to evaluate if this hyperlipaemic fat increase could affect thrombosis and expression of different inflammatory markers of cardiovascular disease.

METHODS

Animal Model and Experimental Design

A total of eight littermate female white commercial fixed-breed pigs (initial body weight, BW, 20kg) were randomly assigned to two experimental groups. Animals were individually housed and water provided ad libitum. Animals were weekly weighted to calculate daily chow intake (3.5% BW). One group was fed for 30 days on standard chow (low fat-high carbohydrate diet) (Group A, n=4), and the other group (Group B, n=4) was fed standard chow enriched with extra virgin olive oil (Table 1). Olive oil was freshly supplemented every day to the ration, therefore total daily intake of fat was increased up to 24%, while intake of other nutrients remained similar. Extra virgin olive oil used in this study was Hojiblanca (Hojiblanca, Málaga, Spain) with a low level of saturated fats (<1.5%).

All procedures followed in the study were in accordance with the AHA-guidelines for experimental research and approved by the Ethical Committee of the local Government.

Ex vivo Platelet Aggregation

Blood obtained in sodium citrate (0.16mols/L) at the end of dietary period was used to perform platelet aggregation following standardized methodology [13]. Platelet rich plasma (PRP) light transmission aggregation (LTA) was measured using ADP (3, 5, 10 and, 15 $\mu\text{mol/L}$) and collagen (3, 5, 10 and, 15 $\mu\text{g/mL}$) as aggregating agents. Whole blood platelet aggregation (WBA), measured by impedance, was triggered by collagen (3, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$). Maximal aggregation, lag time and slope were measured for each dose of aggregating agent.

Perfusion chamber

At the end of the experimental period thrombotic risk was assessed by exposure of blood from studied animals, to a thrombus triggering damaged artery in the previously validated and standardized Badimon perfusion chamber [14]. The day before the perfusion experiment, blood was withdrawn in ACD anticoagulant solution (citric acid 0.04mols/L; sodium citrate 0.09mols/L; dextrose 0.07 mols/L) and platelets were labeled with ^{111}In -oxine (Amersham Biosciences, London, UK) as previously described [15]. In brief, platelets were isolated by low speed centrifugation and washed in ACD saline (14.4% ACD solution in saline, pH 6.50). Then, platelets were labeled with ^{111}In -oxine, resuspended in autologous pig plasma and reinjected in the animal. The dosage of radioactivity injected was $256\pm 4\mu\text{Ci}$, the labeling efficiency was $98.85\pm 0.17\%$ and platelet lysis was $3.51\pm 0.72\%$. After 18 to 24 hours after platelet labeling, animals were tranquilized (2.2mg/kg azaperone), anesthetized (5mg/kg pentobarbital), mechanically ventilated, catheterized and heparinized (50UI/kg i.v. bolus and infusion of $50\text{UI}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). The Badimon perfusion chamber was placed in a carotid artery-jugular vein shunt established at a fixed flow velocity of 10 mL/min, as previously described [15-17]. Homologous porcine vessel wall with two types of damage, severe (ruptured vessel wall) and mild (eroded vessel wall) was placed in the chamber and exposed to flowing blood. Blood was perfused through the chamber for 3, 5 and, 10 minutes at two different shear rates of 1690s^{-1} and 212s^{-1} typical of stenotic or patent coronary arteries. After the perfusions, the radioactivity of each vessel was quantified in a gamma-counter and transformed in millions of deposited platelets per surface unit (total platelet deposition, TPD: $\text{PLTsx}10^6/\text{cm}^2$) as previously described [16]. At the end of the experiment, animals were euthanized by an overdose of intravenous KCl (2 mols/L) and autopsy tissue samples were collected and stored at -80°C .

Blood and Plasma Determinations

Blood was withdrawn by venipuncture from the ear marginal vein in fasting animals at days 0, 15 and, 30 of the study. Blood cell counting (System-9000, Serono-Baker Diagnostics U.S.A.) and coagulation parameters (ST4 coagulometer, Diagnostica-Stago, France) were evaluated. Plasma biochemistry, total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDLc) and triglycerides (TG) were enzymatically determined (Kodak Ektachem DT, Eastman Kodak Company U.S.A.).

Fatty acid composition in plasma and platelets was analyzed using the Blight & Dyer extraction method [18]. EDTA plasma samples were obtained at baseline, day 15 and day 30 of the study and ACD-pelleted platelets at the end of experimental procedure. Samples were previously dried, methylated, and extracted with hexane, then injected in a GC/MS analyzer (MD 800 Fisons Instrument). Results were expressed as % of molar composition of each fatty acid from each sample.

Lipoprotein oxidation

Low density lipoprotein (LDL) oxidation capacity was analyzed in EDTA-collected blood at the end of experimental procedure. LDL particles were isolated by sequential ultracentrifugation [19] and oxidation induced by copper as described [20]. Lipoprotein oxidation was also analyzed with thiobarbituric acid-reactive substances test (TBARS).

Rho-A protein expression

Platelets were obtained from blood collected in ACD solution at baseline and days 15 and 30. Washed platelets were homogenised in lysis buffer with protease inhibitors. Platelets were sub-fractionated as described elsewhere [15,17]. Western blot analysis was performed using twenty-five micrograms of total protein, which was separated and blotted onto nitrocellulose

membranes (Bio Rad, U.S.A.). Blots were incubated with monoclonal antibodies anti-human RhoA (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.). Bound antibody was detected by using the appropriate horseradish peroxidase conjugated antibody. Signals were detected with the Super Signal chemiluminescent detection system (Pierce, USA) on a standard X-ray system.

Gene Expression in induced-monocytes

At the end of perfusion experiment blood from studied animals was collected in sodium citrate (0.16mols/L) and processed to obtain monocytes that were stimulated with LPS, as previously described [21]. One μg of total porcine monocyte mRNA was process to obtain cDNA. Expression of mRNA genes (Tissue Factor (TF), Cycloxigenase-2 (Cox2), Lipoprotein Related Protein (LRP) and LDLreceptor (LDLr)) were analyzed by real-time PCR (RT-PCR). TaqMan fluorescent RT-PCR primers and probes for porcine genes were designed using Primer Express software from PE Biosystems: TF forward: 5'-attgagtgcaccagccaagag-3'; TF reverse: 5'-acagacaggacgaggacagaaga-3'; TF probe: 5'-acaccaccgctccaacgatgagga-3'; Cox2 forward: 5'-attgagtgcaccagccaagag-3'; Cox2 reverse: 5'-acagacaggacgaggacagaaga-3'; Cox2 probe: 5'-acaccaccgctccaacgatgagga-3'; LRP forward: 5'-attgagtgcaccagccaagag-3'; LRP reverse:5'-acagacaggacgaggacagaaga-3'; LRP probe: 5'-acaccaccgctccaacgatgagga-3'; LDLr forward: 5'-attgagtgcaccagccaagag-3'; LDLr reverse:5'-acagacaggacgaggacagaaga-3'; LDLr probe: 5'-acaccaccgctccaacgatgagga-3'. The 18S rRNA (4319493E), assay on demand (Applied Biosystems), was used as endogenous control to normalize the genes studied. Taqman real time PCR was performed as previously described [22].

Data analysis

Data were analyzed using ANOVA, followed by Fischer PLSD and Scheffe's F-test. Results are

expressed as mean values \pm standard error.

RESULTS

Atherothrombotic risk assessment

Platelet aggregation was significantly reduced in animals ingesting olive oil compared with standard diet fed animals. Reduction in aggregation was about 40% for ADP and 25% for collagen (Figure 1). Whole blood aggregations showed the same tendency although without reaching statistical significance (data not shown).

Mural platelet deposition was similar in groups ingesting olive oil enriched diet or standard diet in low shear rate conditions (Figure 2A and 2B). Similarly, RhoA protein translocation was not affected by the additional ingestion of olive oil. The expression of RhoA protein in subfractioned platelet membrane and in platelet cytoplasm showed no difference between the groups of study (Figure 2C).

No significant differences in TF, Cox-2, LRP or LDLr gene expression levels were obtained in LPS-induced monocytes derived from the control or olive oil-added group.

Blood and plasma determinations

Ingestion of olive oil with the diet showed significant reduction of LDL cholesterol compared with standard diet fed animals. The atherosclerotic ratios (LDL/HDL, non-HDL/LDL) were significantly reduced for animals ingesting olive oil (Table 2).

No differences in body weight were observed (52.55 ± 1.55 kg Group A vs. 57.2 ± 2.2 kg Group B).

Analysis of plasma (Figure 3) and platelet (Table 3) fatty acid composition showed a significant increase ($p < 0.05$) of oleic acid in animals fed MUFA diet at days 15 and 30 compared with commercial diet fed animals. Other fatty acids studied showed no difference.

LDL oxidation

The LDL oxidation, measured as Maximal Conjugated Dienes (Max CD) was significantly reduced in MUFA diet group (Table 4), although differences in other antioxidant parameters did not reach significance.

DISCUSSION

The aim of our study was to evaluate whether extra virgin olive oil enrichment of a diet could influence thrombotic risk in case of atherosclerotic plaque rupture. Mediterranean diets usually contain high amounts of fats with total fat caloric intake ranging up to 40%, of which 16-29% are provided by MUFA. In our study total fat caloric intake represented 48,34%, the majority of which was from virgin olive oil. Our results show that this supplementation of extra virgin olive oil in pigs fed commercial growing diet induced a general antithrombotic benefit. Animals fed olive oil showed a reduced *in vitro* platelet aggregation, challenged with ADP and/or collagen, compared to controls and total platelet deposition on damaged triggering vessels was not increased as it could be expected due to the high increase in total fat ingestion [23].

The only dietary difference between both groups of study was the extra amount of olive oil that is reflected in the increase of oleic acid in blood plasma and in platelet membrane lipid composition. These changes in fatty acid profile may be responsible of the beneficial effects observed in the study that may span from eicosanoid metabolism, to signal transduction pathway regulation to membrane viscosity changes [24]. Platelet membrane lipid composition has important regulatory roles in platelet morphology and function, and, as showed in the study, is influenced by dietary lipids and cholesterol. The changes in platelet function are directly associated with alterations of fatty acid composition in platelet membranes [25].

The effects of olive oil in reducing platelet response to different aggregating agents could be explained by the ability of phenolic and antioxidant compounds present in olive oil to block the PLA₂ pathway, to reduce thromboxane synthesis or by their radical-scavenging activity. [25-28]. Other studies reported the effects of quercetin (a flavonoid also present in extra virgin olive oil) in reducing GPVI signaling in platelets and therefore suppressing platelet reactivity [29], while

high concentrations of quercetin have been reported to raise platelet cAMP levels and potentiate the inhibitory effect of prostacyclin (PGI₂) on ADP-induced washed human platelet aggregation [30]. All these synergistic effects in *in vivo* conditions may regulate the aggregation and platelet to platelet interactions, as it has been shown in this study.

Interestingly, this elevated amount of dietary monounsaturated fat did not increase total cholesterol levels and significantly reduced LDL cholesterol ($P < 0,05$), compared with pigs fed standard chow. These results are in concordance with human dietary interventional trials [31-35]. The ingestion of the olive oil enriched diet also reduces the atherosclerotic lipid ratios, suggesting less susceptibility to develop atherosclerosis.

In the *in vivo* situation, oxidized-LDL in plasma is a risk marker for CHD. In our study ingestion of virgin olive oil rendered the LDL particles more resistant to *ex vivo* oxidation, as it is reflected in the reduction of MaxDC, TBARS and other oxidative parameters. Therefore, olive oil dietary supplementation decreases susceptibility of LDL to oxidation and its uptake by macrophages [36]. It has been reported that oleic-enriched LDL have a reduced capacity to promote the adhesion and chemotaxis of monocytes [6]. Thus, ingestion of olive oil, for a short period of time, has potential benefits in atherosclerosis, preventing the pro-atherosclerotic lipid changes. Additionally, stimulated monocytes obtained from olive oil fed animals, did not show an increased expression of candidate genes involved in inflammation and lesion development, such as TF and Cox-2, suggesting a prevention of monocyte activation.

The increase of dietary fat (1033kcal) associated to the olive oil ingestion did not have any negative effects in the studied parameters. This study showed that consumption of extra virgin olive oil reduces LDL cholesterol, reduces platelet aggregation *in vitro*, does not increase platelet deposition under flow conditions and reduces the susceptibility of LDL to oxidation. In conclusion, this study suggests that increasing consumption of extra virgin olive oil represents

an enhancement of the antithrombotic profile in normolipemic conditions.

Limitations of the study

This is an experimental study and the dietary conditions are extreme in order to test the hypothesis of the safety of an excess caloric intake from olive oil. The direct extrapolation of these results to human nutrition may not be appropriate. Further conditions with different relative proportions of olive oil and baseline normolipemic and hyperlipidemic conditions deserve to be investigated.

Conclusions

The high intake of MUFA from olive oil results in a wide range of healthy benefits that converge in a preventive effect on cardiovascular risk; effect that could contribute to the low cardiovascular mortality in the population of the Mediterranean countries.

REFERENCES

1. Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans: an overview. *Am J Clin Nutr* 1994 Dec;60(6 Suppl):1017S-1022S. Review.
2. Ross E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2000;151:357-80
3. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004 Sep 11;364(9438):937-52.
4. Keys A. Coronary heart disease in seven countries. 1970. *Nutrition* 1997 Mar;13(3):250-2; discussion 249, 253.
5. Reaven P, Grasse B, Barnett J. Effect of antioxidants alone and in combination with monounsaturated fatty acid-enriched diets on lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 Dec;16(12):1465-72.
6. Tsimikas S, Philis-Tsimikas A, Alexopoulos S, Sigari F, Lee C, Reaven PD. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Jan;19(1):122-30.
7. Larsen LF, Jespersen J, Marckmann P. Are olive oil diets antithrombotic? Diets enriched with olive, rapeseed, or sunflower oil affect postprandial factor VII differently. *Am J Clin Nutr* 1999 Dec;70(6):976-82.
8. Perez-Jimenez F, Castro P, Lopez-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A, Lopez-Segura F *et al.* Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat. *Atherosclerosis* 1999 Aug;145(2):351-8.

9. Colome C, Alonso R, Mata P, Badimon L. Effects of dietary fatty acids and vitamin E levels in HL-60 cell proliferation. *Eur J Clin Invest* 1999 Feb;29(2):129-38.
10. Lopez-Segura F, Velasco F, Lopez-Miranda J, Castro P, Lopez-Pedrerera R, Blanco A *et al.* Monounsaturated fatty acid-enriched diet decreases plasma plasminogen activator inhibitor type 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 Jan;16(1):82-8.
11. Brzosko S, De Curtis A, Murzilli S, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L. Effect of extra virgin olive oil on experimental thrombosis and primary hemostasis in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002 Dec;12(6):337-42.
12. De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martin-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thromb Res* 2000 Nov 15;100(4):305-15.
13. Galvez A, Badimon L, Badimon JJ, Fuster V. Electrical aggregometry in whole blood from human, pig and rabbit. *Thromb Haemost* 1986 Oct 21;56(2):128-32.
14. Badimon L, Turitto V, Rosemark JA, Badimon JJ, Fuster V. Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetics materials: Deposition of indium 111-labelled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluorethylene. *J Lab Clin Med* 1987;110:706-718
15. Vilahur G, Segales E, Salas E, Badimon L. Effects of a novel platelet nitric oxide donor (LA816), aspirin, clopidogrel, and combined therapy in inhibiting flow- and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model. *Circulation* 2004 Sep 21;110(12):1686-93.
16. 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 May-Jun;6(3):312-20.

17. Casani L, Segales E, Vilahur G, Bayes de Luna A, Badimon L. Moderate daily intake of red wine inhibits mural thrombosis and monocyte tissue factor expression in an experimental porcine model. *Circulation* 2004 Jul 27;110(4):460-5.
18. Blight EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37,911-917.
19. Havel R, Eder H, Bragdon J. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-1354.
20. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Oberreither S, Rotheneder M, el-Saadani M *et al.* Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1983;6:67-75.
21. Llorente-Cortes V, Otero-Viñas M, Camino-Lopez S, Llampayas O, Badimon L. Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004 Jul 27;110(4):452-9.
22. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Sánchez S, Rodríguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein up-regulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation* 2002; 106: 31104–31110.
23. Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation* 1995 Dec 1;92(11):3172-7.
24. Smith RD, Kelly CN, Fielding BA, Hauton D, Silva KD, Nydahl MC, *et al.* Long-term monounsaturated fatty acid diets reduce platelet aggregation in healthy young subjects. *Br J Nutr* 2003 Sep;90(3):597-606.

25. Vognild E, Elvevoll EO, Brox J, Olsen RL, Barstad H, Aursand M *et al.* Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. *Lipids* 1998 Apr;33(4):427-36
26. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res.* 1995 Apr 15;78(2):151-60.
27. Togna GI, Togna AR, Franconi M, Marra C, Guiso M. Olive oil isochromans inhibit human platelet reactivity. *J Nutr* 2003 Aug;133(8):2532-6.
28. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP *et al.* The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr* 2000 Nov;72(5):1150-5. Erratum in: *Am J Clin Nutr* 2001 Feb;73(2):360.
29. Hubbard GP, Stevens JM, Cicmil M, Sage T, Jordan PA, Williams CM *et al.* Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *J Thromb Haemos* 2003 May;1(5):1079-88.
30. Beretz A, Stierle A, Anton R, Cazenave JP. Role of cyclic AMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin. *Biochem Pharmacol* 1982 Nov 15;31(22):3597-600
31. Mensink FH, Katan MB. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low density and high density lipoprotein cholesterol in health women and men. *New Engl J Med* 1989;321:436/41.
32. Mata P, Alvarez-Sala L, Rubio MJ, Nuno J, De Oya M. Effects of long-term monounsaturated- vs polyunsaturated-enriched diets on lipoproteins in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1992;55:846/50.

33. Gardner CD, Kraemer HC. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1917/27.
34. Perez-Jimenez F, Espino A, Lopez-Segura F, Blanco J, Ruiz-Gutierrez V, Prada JL, et al. Lipoprotein concentrations in normolipidemic males consuming oleic acid-rich diets from two different sources: olive oil and oleic acid-rich sunflower oil. *Am J Clin Nutr* 1995;62:769/75.
35. Aviram M, Eias K. Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Ann Nutr Metab* 1993;37(2):75-84.

LEGENDS

Figure 1 Ex vivo platelet aggregation. Platelet rich plasma was used to perform platelet aggregation using different concentrations of ADP (top) or collagen (bottom) as aggregating agents. (◆) indicates group fed standard chow (■) indicates group fed standard chow enriched in extra virgin olive oil.

Figure 2 Platelet function. Panels A and B: rate of platelet deposition (TPD /minutes of perfusion). Perfusions were run over severely (A) or mildly (B) damaged vessel wall. (◆) indicates group fed standard chow (■) indicates group fed standard chow enriched in extra virgin olive oil.

Panel C: Expression of RhoA in platelets. Platelet extractions were analyzed by Western Blot. Hatched Bars, plasmatic RhoA platelet subfraction; Open Bars, cytoplasmatic RhoA platelet subfraction

Figure 3. Evolution of plasma fatty acid composition. Results (expressed as % of molar area of each sample) were obtained throughout of dietary period. (◆) indicates group fed standard chow (■) indicates group fed standard chow enriched in extra virgin olive oil.

Table 1 Caloric composition of the experimental diets. Values are given as percentage of energy to final ration.

	Low Fat/High CHO	High-MUFA
	Standard Chow	Extra Virgin Olive Oil
Total Kcal	4023,6±41,7	5056±25,7*
Proteins	24,82%	18,23%
Carbohydrates	64,20%	33,85%
Fats	10,98%	48,34%

* $P < 0,05$

Table 2 Plasma Lipid Composition. Values, expressed as mg/dL, were obtained at the end of the experimental periods.

	Standard Chow	Extra Virgin Olive Oil
Total Cholesterol	72.2±6.2	63.7±6.3
LDLcholesterol	44.6±3.8	29.3±4.2*
HDLcholesterol	24 ±2.7	29.2±2.6
Ratio LDL/HDL	1.88	1.02*
Ratio non-HDL/HDL	3.04	2.2*
Triglycerides	18.3±2.6	25.7±3.7

* $P < 0.04$ Extra virgin olive oil diet vs. Standard chow

Table 3 Fatty acid composition of platelets. Values are expressed as a percentage of molar area of each sample obtained at the end of experimental period.

	Standard chow	Extra Virgin Olive Oil
Stearic acid	9.5±0.5	8.6±0.7
Oleic acid	18.8±0.8	29.3±1.4*
Linoleic acid	15.7±0.6	14.3±0.5
Arachidonic acid	18.8±1.8	17.1±0.7
Others	37.2	30.7

* $P < 0.05$ vs. Standard chow

Table 4 Oxidation of LDL particles. Evaluation of different parameters related to oxidation. Inf. Time: Inflexion Time; Max CD: maximal conjugated diene formation; TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances

	Lag Time	Inf. Time	Max CD	TBARS
	minutes	minutes	nmols/mg protein	nmols MDA /mg protein
Standard Chow	32.3±5.02	51 ± 4.6	301.03±28.8	116.72±12.1
Extra Virgin Olive Oil	32.7±6.9	58 ± 7.25	215.9±20.4*	100.14±6.4

* $P < 0.05$ vs. Standard chow

Figure 1.

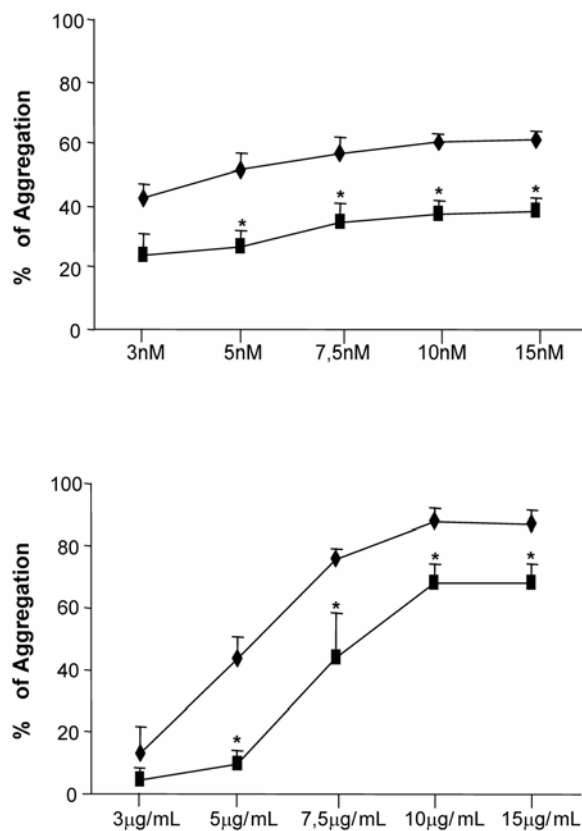


figure 2.

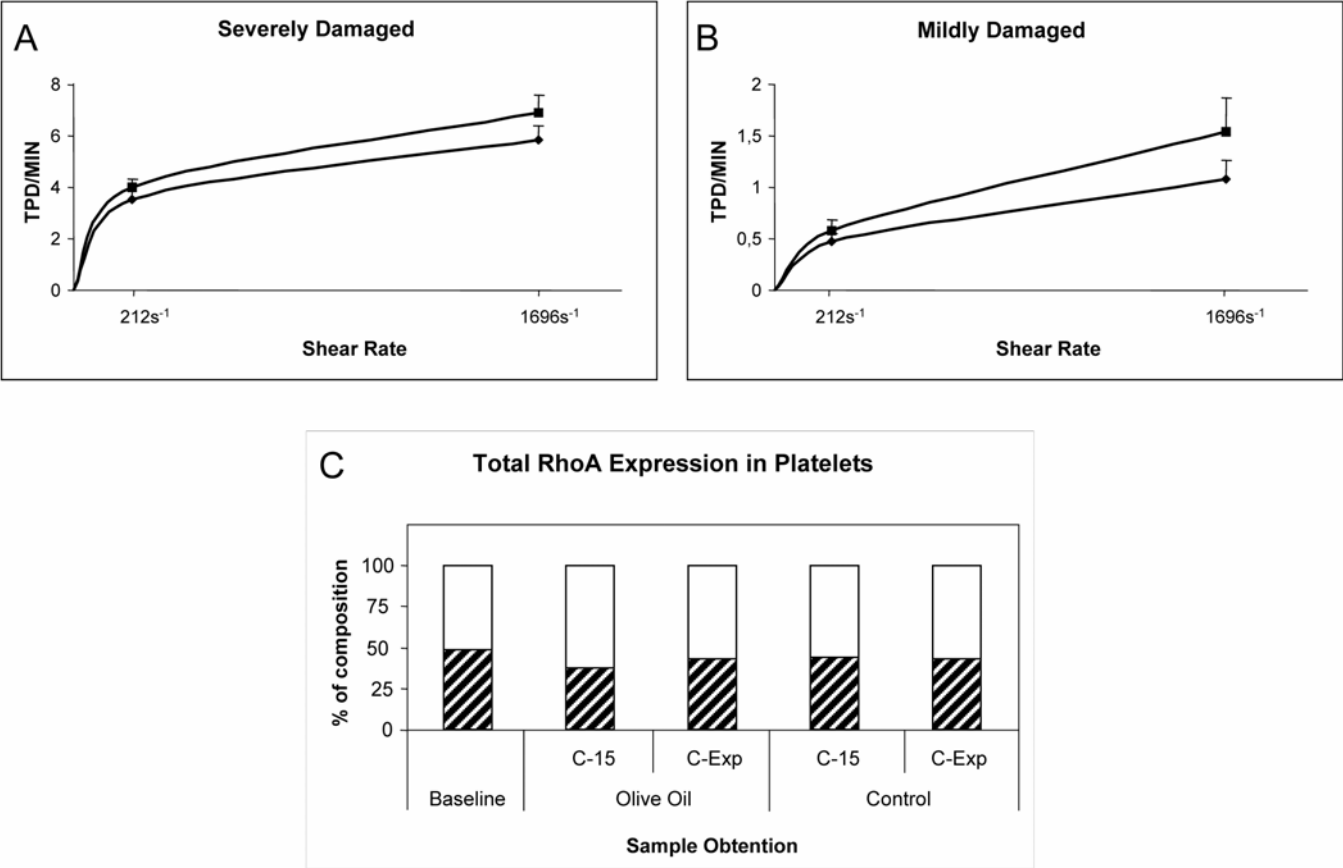


Figure 3.

