

**IDENTIFICACIÓ DE MECANISMES D'INFLAMACIÓ I  
PROLIFERACIÓ CEL·LULAR IMPLICATS EN LA RESTENOSI.  
APLICACIÓ D'UN MODEL MURÍ D'HIPERPLÀSIA INTIMAL**

Tesi presentada per

**Mercè Roqué i Moreno**

Per optar al grau de

**Doctor en Medicina**

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Ginés Sanz Romero i el Dr. Juan José Badimón, a l' Hospital Clínic i Provincial de Barcelona i al Mount Sinai School of Medicine de Nova York.

FACULTAT DE MEDICINA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Els sotasignants Dr. Ginés Sanz i Romero, Professor Titular de Medicina de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i el Dr. Juan José Badimón, Professor Titular de Medicina del Mount Sinai School of Medicine de Nova York,

**CERTIFIQUEN:** que la Tesi Doctoral “**IDENTIFICACIÓ DE MECANISMES D’INFLAMACIÓ I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR IMPLICATS EN LA RESTENOSI. APLICACIÓ D’UN MODEL MURÍ D’HIPERPLÀSIA INTIMAL A RATOLINS GENÈTICAMENT MODIFICATS**”, presentada per Mercè Roqué i Moreno, per optar al grau de Doctor en Medicina, ha estat realitzada sota la seva direcció i assoleix els requisits necessaris per a ser llegida davant el corresponent Tribunal.

El que es fa constar a Barcelona a l’any dos mil quatre.

Prof. Ginés Sanz i Romero

Prof. Juan José Badimón

Als meus pares

A Cristina, Elisabet i Adriana

A la família i als amics

Són moltes les persones que en el curs de la meva carrera professional m'han influït i m'han ajudat a desenvolupar el meu interès en la recerca, contribuint així a dur a terme aquesta tesi doctoral. Ara tinc l'ocasió d'expressar el meu agraïment.

Al Dr. Ginés Sanz i al Dr. Juan José Badimón que, en dos llocs distants del planeta i en dues etapes diferents de la meva formació professional, han estimulat el meu interès clínic i científic i m'han donat suport per desenvolupar els meus objectius.

Al Dr. Valentí Fuster per saber transmetre la seva gran motivació per la cardiologia i la recerca.

Als Drs. Mark Taubman, Edward Fisher i Yale Nemerson per donar-me l'oportunitat de participar en projectes de recerca de gran qualitat científica que han contribuït a la meva formació en aquest camp.

Al Dr. Ernane Reis, per fer-me partícip de les seves idees i pel bon treball en equip que ha estat fonamental pel desenvolupament dels projectes que componen aquesta tesi.

Al Dr. Carlos Cerdón-Cardó i al personal del laboratori de patologia molecular del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center per la seva col.laboració en els projectes referents a la regulació del cicle cel.lular.

Al Dr. John Fallon i al personal del laboratori d'anatomia patològica del Mount Sinai School of Medicine per la seva col.laboració en les tècniques histològiques.

A les Dres. Magda Heras i Eulàlia Roig per motivar-me a entrar en el món de la recerca clínica i experimental i fomentar el meu interès per ampliar la meva formació a l'estranger.

Als companys del laboratori de recerca cardiovascular i del laboratori de microcirurgia del Mount Sinai School of Medicine per la seva col.laboració en la realització dels experiments animals i la seva amistat.

A tots els companys metges de l'Institut de Malalties Cardiovasculars per la bona formació clínica durant la residència i la bona interacció professional i personal que mantenim.

Als companys de residència per compartir la feina i l'amistat.

Als amics dels bons temps a Nova York, que van ser la família que allà no teníem i van fer que la meva estada fos immillorable.

A tot el personal d'infermeria de l'Institut per la seva professionalitat, especialment en els moments difícils de la feina i que amb el seu esforç diari són un puntal de la qualitat assistencial al nostre servei.

A les companyes del laboratori de recerca de l'Institut de Malalties Cardiovasculars perquè amb la seva feina fan possible la realització de projectes com aquests.

Al personal administratiu de l'Institut per l'ajuda en tantes qüestions administratives i en la preparació d'aquesta tesi.

Als meus pares, que amb la seva dedicació i suport constant m'han ajudat en el meu desenvolupament personal i professional i han fet possible que avui tingui una feina que em fa feliç.

### **AGRAÏMENTS INSTITUCIONALS**

A l'Hospital Clínic ("Beca de fi de Residència" 1995)

A la Generalitat de Catalunya (CIRIT/1995).

A la Sociedad Española de Cardiología (1998/2001).

## ÍNDEX



<b>ABREVIATURES .....</b>	<b>VII</b>
<b>ARTICLES QUE COMPONEN AQUESTA TESI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. HIPERPLÀSIA INTIMAL: CONSIDERACIONS GENERALS .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Definició.....	2
1.1.2. Implicacions clíniques .....	2
1.1.3. Tipus i graus de lesió .....	4
1.1.4. Cinètica del desenvolupament d'hiperplàsia intimal.....	5
<b>1.2. MECANISMES DE RESPOSTA A LA LESIÓ VASCULAR .....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Trombosi i inflamació.....	6
1.2.1.1. Adhesió plaquetària .....	6
1.2.1.2. Interacció plaquetes-neutròfils-endoteli .....	7
1.2.1.3. Infiltració per monòcits/macròfags .....	9
1.2.1.4. MCP-1 i CCR2 .....	10
1.2.1.5. Ciclooxygenasa-2.....	11
1.2.2. Migració i proliferació cel.lular .....	12
1.2.2.1. Modulació fenotípica de les cèl.lules musculars llises .....	12
1.2.2.2. Origen de les cèl.lules musculars llises .....	13
1.2.2.3. Inducció de factors de creixement i citoquines a la paret vascular en resposta a la lesió arterial .....	13
1.2.2.3.1. Factors que promouen el desenvolupament d'hiperplàsia intimal.....	15
1.2.2.3.2. Factors que inhibeixen el desenvolupament d'hiperplàsia intimal.....	17
1.2.2.3.3. Factors amb acció mixta .....	17
1.2.2.4. Equilibri quiescència-proliferació-apoptosi.....	18
1.2.2.4.1. p27 <sup>Kip1</sup> .....	20
1.2.2.5. Migració cel.lular .....	23
1.2.3. Síntesi de matriu extracel.lular i remodelat vascular .....	25
<b>1.3. PAPER DELS MODELS ANIMALS EN L'ESTUDI DE LA RESPOSTA A LA LESIÓ VASCULAR.....</b>	<b>26</b>
1.3.1. Models animals de restenosi .....	26

1.3.2. Aplicació de tècniques de manipulació genètica a la recerca experimental.....	29
1.3.3. Models murins d'aterosclerosi i hiperplàsia intimal.....	31
1.3.3.1. Ratolí p27 knockout.....	32
1.3.3.1. Ratolí apoE knockout .....	33
1.3.3.2. Ratolí CCR2 knockout .....	33
1.3.4. Tècniques de lesió arterial en el ratolí. ....	33
<b>1.4. DESENVOLUPAMENT D'ESTRATÈGIES PER PREVENIR L'HIPERPLÀSIA INTIMAL.....</b>	<b>34</b>
1.4.1. Rapamicina .....	36
1.4.2. Inhibidors de la ciclooxygenasa: Sulindac i àcid acetilsalicílic.....	37
<b>2. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS .....</b>	<b>38</b>
<b>3. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>40</b>
3.1. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL MURÍ D'HIPERPLÀSIA INTIMAL.....	41
3.2. REGULACIÓ DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR I EFECTE DE LA MODULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR EN LA RESTENOSI .....	43
3.3. EFECTE DE L'ABSÈNCIA DEL RECEPTOR DE MCP-1, CCR2, EN EL DESENVOLUPAMENT D'HIPERPLÀSIA INTIMAL.....	46
3.4. EFECTE DE L'ANTIINFLAMATORI NO ESTEROIDAL SULINDAC A LA HIPERPLÀSIA INTIMAL EN UN MODEL MURÍ HIPERLIPIDÈMIC.....	47
3.5. DISCUSSIÓ CONJUNTA .....	49
<b>4. CONCLUSIONS.....</b>	<b>51</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>55</b>
<b>6. ARTICLES PUBLICATS .....</b>	<b>74</b>

## TAULES

<b>Taula I.</b> Hiperplàsia intimal: Implicacions clíniques.....	2
<b>Taula II.</b> Sistemes de receptors de superfície cel.lular.....	13
<b>Taula III.</b> Nivells de control del desenvolupament d'hiperplàsia intimal.....	35

## FIGURES

<b>Figura 1.</b> Seccions transversals d'una artèria coronària humana (A) i porquina (B) que mostren lesions restenòtiques post-angioplàstia i post-implantació d'un stent.....	3
<b>Figura 2.</b> Cinètica del desenvolupament d'hiperplàsia intimal en un model porquí d'angioplàstia coronària.....	5
<b>Figura 3.</b> Adhesió leucocitària a l'endoteli activat .....	8
<b>Figura 4.</b> Vies d'interacció entre les cèl.lules de la paret vascular i les cèl.lules circulants a la sang .....	14
<b>Figura 5.</b> Cicle cel.lular.....	19
<b>Figura 6.</b> Expressió de p27, Ki67 i apoptosi en artèries coronàries porquines post-angioplàstia.....	21
<b>Figura 7.</b> Rapamicina redueix la resposta proliferativa post-angioplàstia mitjançant un increment dels nivells de p27 a la paret arterial. ....	22
<b>Figura 8.</b> Vies de migració cel.lular.....	23
<b>Figura 9.</b> Transcripció, activació i inhibició de l'activitat proteolítica de la matriu extracel.lular.....	24
<b>Figura 10.</b> Microfotografia representativa d'una artèria coronària porquina quatre setmanes després d'una angioplàstia. ....	28
<b>Figura 11.</b> Procés de generació de ratolins knockout.....	30
<b>Figura 12.</b> Microfotografia d'una lesió restenòtica en l'artèria femoral d'un ratolí apoE knockout. ....	32

## **ABREVIATURES**

---

ADP	Adenosin difosfat
ApoE	Apolipoproteïna E
C	Ciclina
CC/CXC	Chemotactic chemokines
CCR2	Chemotactic chemokine receptor 2
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor
COX	Ciclooxigenasa
CSF	Colony stimulating factor
ECA	Enzim conversor de l'angiotensina
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
Gax	Growth arrest specific homeobox
HGF	Hepatocyte growth factor
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IGF	Insulin-like growth factor
IL1	Interleuquina 1
KO	Knockout
LEE	Làmina elàstica externa
LEI	Làmina elàstica interna
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MIP1	Macrophage inflammatory protein
MMP	Metalloproteïnases
NF- $\kappa$ B <sup>1</sup>	Nuclear factor kappa B
NO	Òxid nítric
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PCNA	Proliferating cellular nuclear antigen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Platelet endothelial adhesion molecule-1
pRB	Retinoblastoma gene product
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta

TIMP	Tissue inhibitor of metaloproteases
TNF	Tumor necrosis factor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-fluorescein nick-end labeling
UPA	urokinase-type plasminogen activators
VCAM-1	Vascular endothelial cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA-4	Very late antigen-4
VLDL	Very low density lipoproteins

## **ARTICLES QUE COMPONEN LA TESI**

Aquesta tesi es basa en els següents articles:

### **Article I**

Mercè Roqué, John T. Fallon, Juan J. Badimón, Wen X. Zhang, Mark B. Taubman, Ernane D. Reis. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:335–342.

### **Article II**

Ernane D. Reis, Mercè Roqué, Carlos Cordón–Cardó, Marija Drobnjak, Valentin Fuster, Juan J. Badimón. Apoptosis, proliferation, and p27 expression during vessel wall healing: Time course study in a mouse model of transluminal femoral artery injury. *J Vasc Surg* 2000;32:1022–1029.

### **Article III**

Mercè Roqué, Ernane D. Reis, Carlos Cordón–Cardó, Mark B. Taubman, John T. Fallon, Valentin Fuster, Juan J. Badimón. Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: In vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest* 2001;81:895–903.

### **Article IV**

Mercè Roqué, William J. H. Kim, Michaela Gazdoin, Alia Malik, Ernane D. Reis, John T. Fallon, Juan J. Badimón, Israel F. Charo, Mark B. Taubman. CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:554–559.

### **Article V**

Ernane D. Reis, Mercè Roqué, Hayes Dansky, John T. Fallon, Juan J. Badimón, Carlos Cordón–Cardó, Steven J. Shiff, Edward A. Fisher. Sulindac inhibits neointimal formation after arterial injury in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000;97:12764–12769.



## **1— INTRODUCCIÓ**

## 1.1— HIPERPLÀSIA INTIMAL: CONSIDERACIONS GENERALS

### 1.1.1 — DEFINICIÓ

La paret vascular consta de tres capes anatòmiques diferents: l'íntima, la mitja i l'adventícia. La capa íntima, en condicions normals, constitueix una monocapa de cèl.lules endotelials assentades sobre una membrana basal rica en col.lagen i proteoglicans (Newby i col, 2000).

La hiperplàsia intimal és un canvi en l'estructura vascular que es produeix a conseqüència dels mecanismes biològics de reparació després d'una lesió vascular, ja sigui de tipus mecànic, quirúrgic o immunològic (Davies i col, 1994). La troballa més característica d'aquest canvi estructural és l'engruiximent de la capa intimal, degut a un increment en el nombre de cèl.lules, com el terme "hiperplàsia" indica, així com a un augment en la síntesi de matriu extracel.lular, en la que es troben immerses aquestes cèl.lules. En última instància, aquest procés deriva en una estenosi de la llum vascular.

### 1.1.2 — IMPLICACIONS CLÍNIQUES

El desenvolupament d'hiperplàsia intimal és el factor limitant de l'èxit a llarg termini dels processos de revascularització miocàrdica i vascular perifèrica.

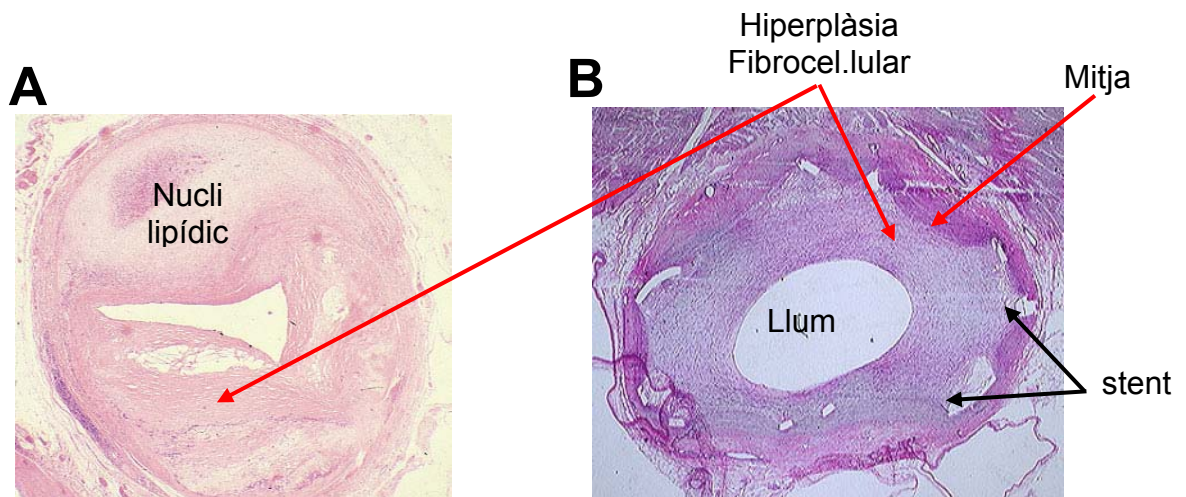
#### Taula I . Hiperplàsia Intimal – Implicacions Clíiques



Aquest procés, altrament conegut com aterosclerosi accelerada, afecta les artèries coronàries natives sotmeses a angioplàstia percutània, els by-

pass de derivació aorto-coronaris arterials o venosos, les artèries perifèriques sotmeses a angioplàstia o endarterectomia i l'arbre vascular del trasplantament d'òrgans sòlids—conegut com a vasculopatia de l'empelt.

Dins cadascuna de les patologies abans esmentades, el desenvolupament d'hiperplàsia intimal té diferents característiques segons l'entitat i tipus de llit vascular afectat. Així, per exemple, sabem que els empelts venosos (generalment de vena safena) s'oclueixen abans que els bypass arterials (d'artèria mamària interna, epigàstrica o radial). En quant al tipus de lesió que podem observar, enfront la típica afectació focal i irregular de l'aterosclerosi en artèries coronàries natives, una característica de la vasculopatia de l'empelt és l'afectació difusa i concèntrica de tot l'arbre arterial. Aquestes peculiaritats poden influir en el tipus d'estratègia terapèutica a aplicar en cada cas.



**Figura 1.** *Seccions transversals d'una artèria coronària humana (A, imatge cedida pel Dr. Fallon, Mount Sinai School of Medicine, Nova York) i porcina (B) que mostren lesions restenòtiques post-angioplàstia i post-implantació de stent, respectivament.*

L'origen embriològic és també un factor determinant de la resposta a la lesió arterial. Les artèries perifèriques s'originen d'un arc branquial diferent a les artèries coronàries. Les diferències pel que fa a l'estructura ja sigui més

muscular o més elàstica de la paret arterial, fan que la resposta a la lesió vascular d'una artèria femoral, per exemple, pugui ésser molt diferent de la que observem en artèries coronàries (Badimón i col, 1998).

Des de l'adveniment dels stents, les taxes de restenosi s'han reduït considerablement, especialment a nivell de la circulació coronària. Amb la implantació d'un stent, s'evita l' "*elastic recoil*", responsable de la pèrdua luminal aguda deguda a les forces elàstiques, que s'observa en alguns casos, generalment a la fase subaguda post-angioplàstia. Malgrat la milloria que han suposat els stents, el desenvolupament d'hiperplàsia intimal continua essent un problema limitant.

### 1.1.3 — TIPUS I GRAU DE LESIÓ

Podem considerar diferents tipus de lesió, depenent del mecanisme pel qual s'hagi originat la lesió vascular. En el cas de la vasculopatia del trasplantament, es tracta d'una agressió de tipus immunològic (rebuig) que, en les fases inicials, afectarà preferentment l'endoteli vascular. En el cas de l'afectació dels by-pass, la hiperplàsia intimal és conseqüència de la manipulació inevitable de l'empelt durant la seva preparació i de l'agressió que suposa la pròpia tècnica quirúrgica, per exemple les sutures a les zones d'anastomosi de l'empelt.

Com les característiques de la hiperplàsia intimal, mecanismes i consideracions terapèutiques són bàsicament les mateixes pel que fa a les diferents entitats clíniques descrites, a partir d'ara em centraré en el desenvolupament de la hiperplàsia intimal post-intervencionisme coronari.

El grau de lesió infligit a la paret arterial és un determinant major de la resposta reparadora, i s'ha establert una classificació (Ip i col, 1990):

- I. Alteració funcional del vas sense canvis morfològics evidents
- II. Denudació endotelial
- III. Denudació endotelial amb lesió de la capa mitja
- IV. Denudació endotelial amb lesió de la capa mitja i l'adventícia.

Tant l'angioplastia coronària com l'endarterectomia indueixen lesions de grau III. En el cas dels by-pass venosos, habitualment les lesions són de grau I i II, però es poden observar lesions de grau III en les zones d'anastomosi. En els empelts sintètics, el grau d'hiperplàsia és menor en el cos de l'empelt i és a la zona d'anastomosi on generalment s'observa engruiximent pseudointimal provinent dels segments arterials nadius (Davies i col, 1994; Clowes i col, 1993).

### 1.1.4 — CINÈTICA DEL DESENVOLUPAMENT D'HIPERPLÀSIA INTIMAL

En primer lloc, cal esmentar que la major part de l'evidència de que disposem actualment prové d'estudis animals, amb les limitacions que aquest fet pot comportar de cara a l'extrapolació d'aquestes observacions experimentals a la clínica humana.

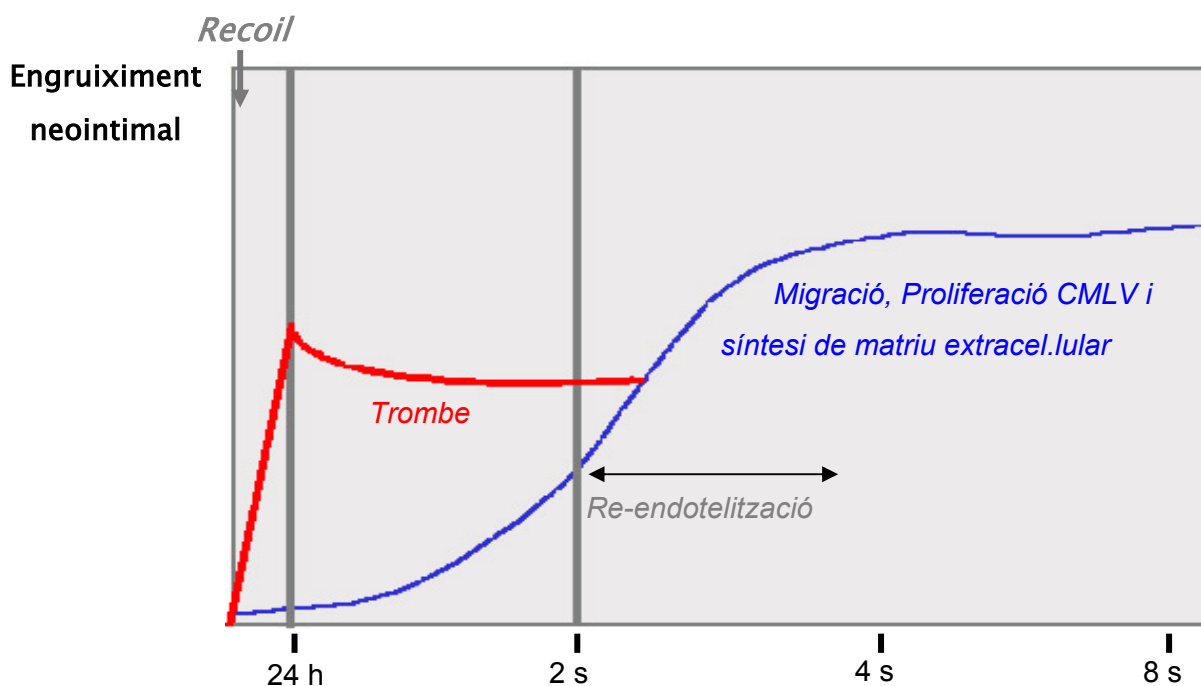


Figura 2. Cinètica del desenvolupament d'hiperplàsia intimal en un model porquí d'angioplastia coronària (Gallo i col, 1996).

En la fase aguda post-angioplàstia, les forces elàstiques o "elastic recoil", juguen un paper important, com hem comentat. Posteriorment, l'organització del trombe mural, juntament amb la posta en marxa dels mecanismes d'activació de les cèl.lules musculars llises de la capa mitja, donarà pas a la fase de migració i proliferació cel.lulars i a la síntesi de matriu extracel.lular, que condicionaran l'engruiximent progressiu de la capa intimal i l'estenosi de la llum vascular (figura 2). Aquesta seqüència, que en models animals com el porc, el conill o la rata, pot oscil.lar entre 4-8 setmanes, en l'humà, és més lenta i es calcula que equivaldria aproximadament a 6 mesos després de l'angioplàstia.

## **1.2 — MECANISMES DE RESPOSTA A LA LESIÓ VASCULAR**

---

---

D'acord amb la seqüència d'esdeveniments que tenen lloc durant el desenvolupament de la hiperplàsia intimal, els mecanismes que hi intervenen s'agrupen en tres fases ben diferenciades: 1) trombosi i inflamació, 2) migració i proliferació cel.lular i 3) síntesi de matriu extracel.lular. Dins de cadascuna d'aquestes fases, es descriuran els mecanismes involucrats més rellevants.

### **1.2.1 — TROMBOSI I INFLAMACIÓ**

#### **1.2.1.1 — ADHESIÓ PLAQUETÀRIA**

De forma immediata després d'una angioplàstia coronària, degut a la denudació endotelial que es produeix, s'exposen els components del subendoteli vascular a la sang circulant. El factor tissular, iniciador de la via extrínseca de la coagulació, s'expressa en les lesions ateroscleròtiques (Falk i col, 1995; Fernández-Ortiz i col, 1994; Moreno i col, 1996) i es troba també circulat a la sang (Giesen i col, 1999). Després de la lesió arterial, l'activació del factor tissular, desencadena la síntesi de trombina, que és l'agonista plaquetari més potent conegut, a més d'ésser un factor de creixement per les cèl.lules musculars llises. Mitjançant la interacció entre els receptors de les

glicoproteïnes de la membrana plaquetària, el col.lagen subendotelial, el factor von Willebrand i la fibronectina, s'inicia el procés d'adhesió i agregació plaquetàries. Com a conseqüència, es forma un trombe mural ric en plaquetes i fibrina sobre la superfície luminal denudada.

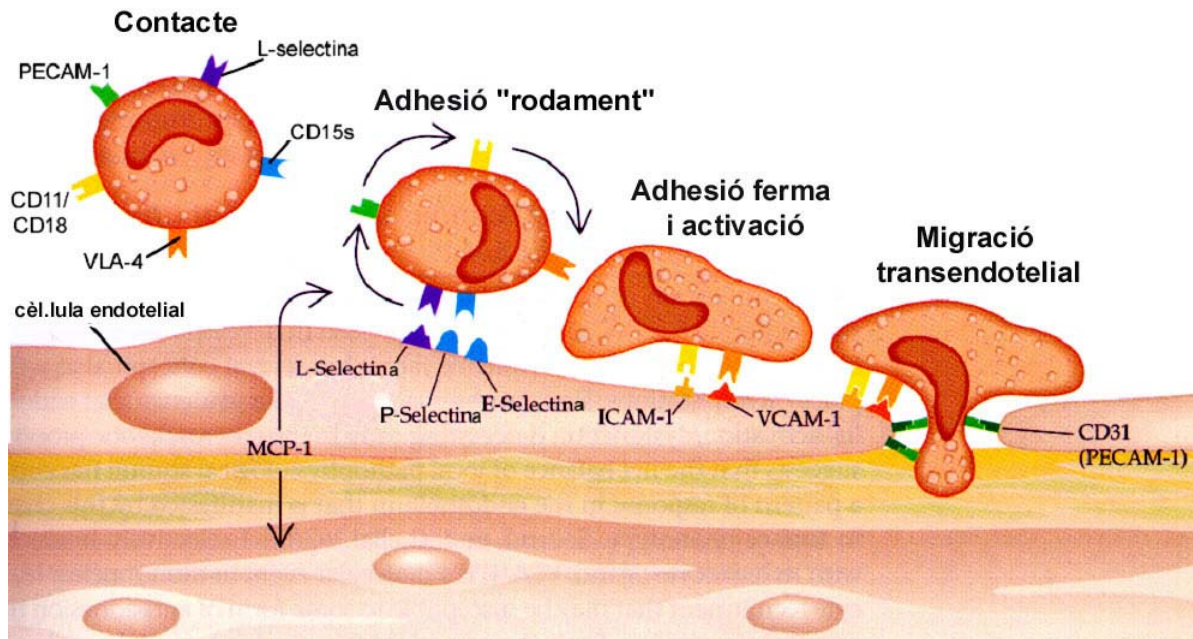
L'alliberament del contingut dels grànuls plaquetaris, rics en ADP, serotonina, tromboxà A<sub>2</sub>, i en factors quimiotàctics i de creixement com el platelet-derived growth factor (PDGF) o el transforming growth factor-β (TGF-β), entre d'altres, contribueix a potenciar l'agregació plaquetària, a la vegada que promou l'activació de les cèl.lules musculars llises de la capa mitja.

S'ha proposat que la formació d'un trombe mural a la fase aguda post-angioplàstia pot contribuir al desenvolupament d'hiperplàsia intimal de forma tardana. Un bon nombre de treballs experimentals han demostrat que la inhibició de la trombosi aguda (amb inhibidors del factor tissular, antitrombines, anti-IIb-IIIa, entre d'altres) redueix la hiperplàsia intimal (Jang i col, 1995; Gallo i col, 1998; Roqué i col, 2000), encara que la seva aplicació humana no ha demostrat un clar benefici (Serruys i col, 1995; The EPILOG investigators, 1997).

#### 1.2.1.2 — INTERACCIÓ PLAQUETES – NEUTRÒFILS – ENDOTELI

La interacció entre plaquetes i leucòcits a l'endoteli i la matriu subendotelial és un aspecte essencial en la resposta inflamatòria a la lesió arterial (Siminiak i col, 1995). L'adhesió leucocitària requereix l'expressió de molècules d'adhesió.

Les selectines promouen la primera fase de "rodament" dels neutròfils sobre la superfície luminal, i les integrines i la intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), faciliten l'adhesió ferma i la migració (Lawrence i col, 1991) (figura 3).



**Figura 3.** Adhesió leucocitària a l'endoteli activat (Gimbrone i col, 1995)

Entre la població leucocitària, els neutròfils tenen un paper primordial en processos d'isquèmia-reperfusió, tals com a l'infart de miocardi o el fenomen de "no-reflow", on poden induir lesió tissular a través de l'alliberament de radicals lliures, lipoxigenasa, citoquines i enzims proteolítics. Diversos estudis han mostrat la presència de neutròfils a la paret vascular a la fase aguda després de la lesió arterial i la persistència de productes derivats d'aquests leucòcits en fases més tardanes, però el seu paper específic no ha estat encara ben definit.

En models experimentals, s'ha demostrat que la inhibició de molècules d'adhesió, protegeix del desenvolupament d'aterosclerosi i restenosi (Merhi i col, 1999/ Dong i col, 2000; Phillips i col, 2003). Tanmateix, en humans, la presència de marcadors sèrics d'activitat dels neutròfils es correlaciona amb el desenvolupament de restenosi després de l'angioplastia coronària (Inoue i col, 1998).



### 1.2.1.3 — INFILTRACIÓ PER MONÒCITS/MACRÒFAGS

La infiltració de la paret vascular per macròfags és un procés que s'inicia amb l'adhesió dels monòcits a la superfície endotelial a través de factors quimiotàctics (colony stimulating factor [CSF], macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  [MIP-1 $\alpha$ ], monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]), integrines com Mac-1, selectines com P-selectina, i E-selectina i molècules d'adhesió com ICAM-1 i VCAM-1, que promouen la transmigració dels monòcits dins la paret vascular a través de les cèl.lules endotelials, on els monòcits es transformen en macròfags tissulars (figura 3).

Els macròfags són un component clau de la placa ateroscleròtica nativa i també de la lesió restenòtica (Moreno i col, 1996). Contribueixen a la progressió de la lesió a través de la seva internalització a la paret vascular i la transformació en cèl.lules escumoses. Secreten factors de creixement, citoquines i metal·loproteïnases que modulen la resposta inflamatòria i estimulen la migració i proliferació de cèl.lules musculars llises. Els macròfags contribueixen també al potencial trombogènic de la placa a través de l'expressió de factor tissular (Thiruvikraman i col, 1996) i de l'inhibidor de l'activador del plasminogen-1 (PAI-1).

Un gran nombre de treballs experimentals han observat la presència de cèl.lules inflamatòries a la paret vascular ja en les primeres hores després d'una angioplàstia i la seva persistència a mig termini. S'ha demostrat que existeix una correlació entre el grau d'infiltració per cèl.lules inflamatòries i el desenvolupament d'hiperplàsia intimal en fases més tardanes (Welt i col, 2002). Més encara, la inhibició o deficiència de molècules implicades en el procés d'adhesió i internalització dels leucòcits, com P-selectina, Mac-1, o VCAM-1, resulta en una reducció de la hiperplàsia intimal (Rogers i col, 1998; Simon i col, 2000; Oguchi i col, 2000; Phillips i col, 2003).

Per totes aquestes observacions, queda palès que la inflamació té un paper clau en la formació d'hiperplàsia intimal així com en el desenvolupament i la progressió de les lesions ateroscleròtiques. En el

proper apartat, aprofundirem en el coneixement d'alguns dels factors directament implicats en aquest procés inflamatori.

#### 1.2.1.4 — MCP-1 i CCR2

Per les seves implicacions en l'aterosclerosi i la hiperplàsia intimal, la proteïna quimiotàctica dels monòcits-1 (MCP-1) mereix un capítol apart.

Les citoquines quimiotàctiques o quimioquines son proteïnes de baix pes molecular que son responsables dels processos d'internalització i activació dels leucòcits. S'agrupen majoritàriament dins de dues famílies: les CC i les CXC. S'accepta que, en general, les quimioquines CXC, com IL-8, son quimiotàctiques pels neutròfils, mentre que les CC, com MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  i RANTES, son quimiotàctiques per diferents tipus de cèl.lules mononucleades, monòcits, limfòcits T, eosinòfils i basòfils (Luster i col, 1998).

La MCP-1 és secretada per les cèl.lules endotelials, monòcits-macròfags i fibroblastes i s'expressa de forma molt marcada en les lesions ateroscleròtiques així com a la paret vascular tan sols dues hores després d'una lesió arterial (Taubman i col, 1992). MCP-1 es considera la quimioquina més important en el procés d' adhesió i migració dels monòcits dins la paret vascular durant el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica. Actualment encara hi ha controvèrsia sobre si la font inicial de MCP-1 són les cèl.lules musculars llises i, en aquest cas, l'expressió de MCP-1 seria anterior a l'adhesió i internalització leucocitàries, o bé, si són els monòcits que han infiltrat la paret arterial els que expressen MCP-1 en primer lloc (Taubman i col, 1992; Wysocki i col, 1996).

CCR2 és el principal receptor de MCP-1 que es coneix actualment. En condicions normals, els monòcits expressen ARN missatger de CCR2, i al transformar-se en macròfags tissulars, aquesta expressió disminueix (Reape i col, 1999).

El paper central de MCP-1 i del seu receptor, CCR2, en el desenvolupament i progressió de l'aterosclerosi s'ha posat clarament de

manifest amb la utilització de models animals genèticament modificats. Els ratolins knockout per la apolipoproteïna E (apoE<sup>-/-</sup>) i pel receptor de LDL (rLDL<sup>-/-</sup>) tenen nivells molt elevats de colesterol i desenvolupen, de forma espontània, lesions ateroscleròtiques severes a l'arbre arterial. S'ha analitzat el paper de la deficiència de MCP-1 en ratolins rLDL<sup>-/-</sup>-MCP-1<sup>-/-</sup> i del seu receptor en ratolins apoE<sup>-/-</sup>-CCR2<sup>-/-</sup>. En aquests models, s'ha demostrat una disminució en l'adhesió leucocitària i una reducció del 50 % en l'àrea de les lesions ateroscleròtiques i la infiltració de macròfags dins la paret vascular (Boring i col, 1998; Dawson i col, 1999; Gu i col, 1998).

La inducció de MCP-1 a la paret arterial després de la lesió arterial forma part de la resposta cel·lular inicial als factors de creixement, com PDGF (Taubman i col, 1992). La inhibició de MCP-1 en diversos models experimentals d'angioplàstia redueix l'acumulació de macròfags i el desenvolupament d'hiperplàsia intimal (Poon i col, 1999; Usui i col, 2002; Mori i col, 2002). En humans, els nivells de MCP-1 circulants són predictors de restenosi (Cipollone i col, 2001). Aquestes dades remarquen la rellevància del component inflamatori, i més específicament del paper de MCP-1, en el desenvolupament d'hiperplàsia intimal.

Les implicacions de CCR2 en la restenosi encara no han estat analitzades i constitueixen un dels objectius d'aquesta tesi.

#### 1.2.1.5 — CICLOOXIGENASA-2

La ciclooxigenasa (COX) regula la producció d'eicosanoides i té dos isoformes. La COX-1 s'expressa de forma constitutiva en molts teixits on porta a terme funcions fisiològiques relacionades amb l'agregació plaquetària i el manteniment del to vascular, mentre que la COX-2 o induïble és un enzim amb funcions pro-inflamatòries (Vane i col, 1994).

A nivell vascular, s'ha demostrat una major expressió de COX-2 en monòcits/macròfags activats i en lesions ateroscleròtiques (Baker i col, 1999; Burleigh i col, 2002).

S'ha observat que els antiinflamatoris no esteroïdals amb una capacitat d'inhibició més selectiva per la COX-2 tenen un efecte antiproliferatiu i proapoptòtic en línies cel·lulars de càncer de colon i en pacients amb poliposi colònica familiar (Shiff i col, 1995).

Els efectes d'una inhibició selectiva de la COX-2 a nivell cardiovascular no han estat investigats i seran també objecte d'estudi d'aquesta tesi.

## **1.2.2 — MIGRACIÓ I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR**

### **1.2.2.1— MODULACIÓ FENOTÍPICA DE LES CÈL·LULES MUSCULARS LLISES**

Les cèl·lules musculars llises de la paret vascular són cèl·lules ben diferenciades, que es caracteritzen per una gran abundància en proteïnes contràctils, com l'actina i la miosina, i poc reticle endoplàsmic rugós. Aquestes cèl·lules tenen una capacitat migratòria i proliferativa molt limitada. Quan s'activen, per una lesió de la paret vascular, ja sigui de tipus mecànic com en l'angioplastia, o d'altres, passen a tenir un estat sintètic, en el que adquireixen més reticle endoplàsmic rugós per la síntesi de les proteïnes de la matriu extracel·lular. Aquest canvi, conegut com a modulació fenotípica, és necessari pels processos de migració i proliferació cel·lulars.

La modulació fenotípica es correlaciona amb una alteració del citoesquelet cel·lular. Entre els canvis més característics, es produeix un augment de la relació vimentina-desmina, una disminució de l'expressió de  $\alpha$ -actina i un augment relatiu de  $\beta$ - i  $\gamma$ -actina, juntament amb una menor expressió de calponina (Kocher i col, 1984). A més, es produeix també un canvi en l'expressió de les isoformes de la miosina: les cèl·lules proliferants només expressen non-muscle (NM)-miosina, mentre que les quiescents expressen les dos isoformes NM- i smooth muscle (SM)-miosina. Aquests canvis en l'expressió de les diferents proteïnes citoesquelètiques de les cèl·lules musculars llises en la fase aguda post-angioplastia, són transitoris i reverteixen posteriorment.

### 1.2.2.2— ORIGEN DE LES CÈL.LULES MUSCULARS LLISES

Arrel de les observacions obtingudes en models experimentals s'ha proposat que la font principal de cèl.lules musculars llises de la neoíntima és la capa mitja (Casscells i col, 1992). Més recentment, aquestes observacions s'han ampliat amb noves dades que suggereixen altres possibles orígens, com la pròpia íntima, l'endoteli, l'adventícia, o també, a partir de cèl.lules progenitores circulants derivades del moll de l'ós o bé d'altres òrgans, que es podrien internalitzar en l'íntima i adoptar un fenotip de cèl.lula muscular llisa (Majesky i col, 1997/Bayes-Genis i col, 2002, Doherty i col, 2003).

### 1.2.2.3 — INDUCCIÓ DE FACTORS DE CREIXEMENT I CITOQUINES A LA PARET VASCULAR EN RESPOSTA A LA LESIÓ

En condicions basals, l'índex proliferatiu de les cèl.lules endotelials i musculars llises és molt baix. L'activació d'aquestes cèl.lules per factors mecànics, cel.lulars o humorals, desencadena els mecanismes de senyalització cel.lular, que són els encarregats de convertir els estímuls externs en respostes cel.lulars (Roqué i col, 2002).

Hi ha dos mecanismes bàsics de senyalització a través dels receptors de membrana cel.lular: 1) receptors units a proteïnes G (Guanine nucleotide regulatory proteins) i 2) receptors amb activitat tirosina quinasa.

**Taula II. Sistemes de Receptors de Superfície Cel.lular**

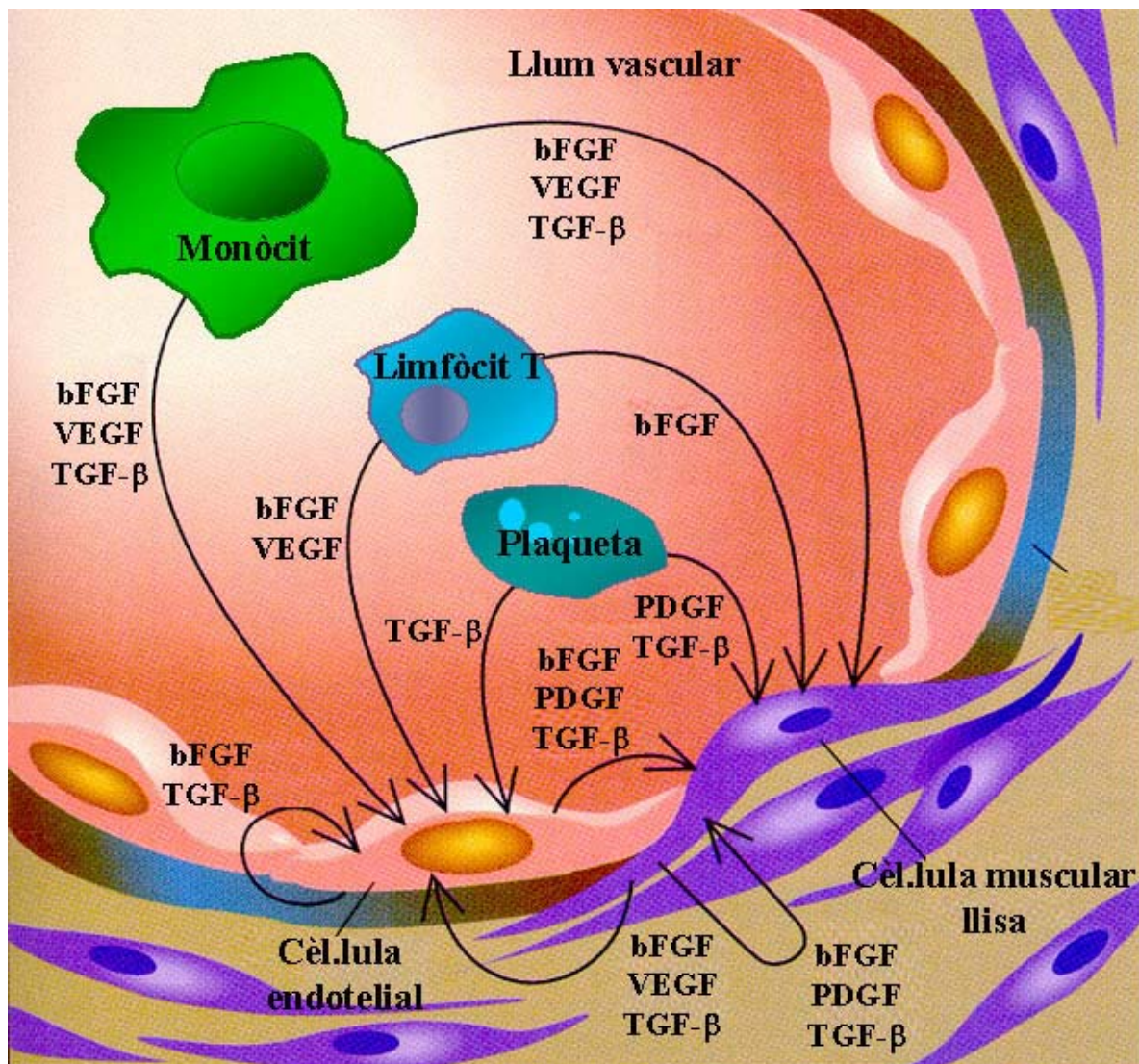
<b>Units a proteïnes G</b>	<b>Units a tirosina-quinasa</b>
Noradrenalina	Platelet-derived growth factor (PDGF)
Angiotensina II	Epidermal growth factor (EGF)
Serotonina	Transforming growth factor (TGF)
Bradiquinina	Fibroblast growth factor (FGF)
Prostaglandines	Insulin-like growth factor I (IGF)

Leucotriens

Vasopressina

Les proteïnes G estan implicades en la síntesi proteica, ensamblatge dels microtúbuls i funcionalisme dels oncogens, a més del seu paper en la senyalització cel.lular. Pel que fa als receptors de tirosina quinases, l'activació del mateix receptor en cèl.lules diferents pot induir també respostes diferents.

La síntesi i alliberament de factors de creixement i citoquines en el lloc de la lesió arterial és el pas inicial a la cadena d'esdeveniments que posteriorment donarà lloc a la migració i replicació cel.lulars.



**Figura 4.** *Vies d'interacció entre les cèl.lules de la paret vascular i les cèl.lules circulants a la sang (Klagsbrun i col, 1995).*

Hi ha un gran nombre de factors que influencien els mecanismes de migració i proliferació cel.lular. Dins la paret vascular, existeix una important xarxa de comunicació entre les cèl.lules de la pròpia paret: endotelials, musculars llises, fibroblastes i les cèl.lules circulants en la sang: monòcits, limfòcits T, neutròfils i plaquetes, fonamentalment. Totes aquestes cèl.lules interaccionen entre si a través de l'alliberament de factors de creixement i citoquines. En la figura 4 es mostren les possibles vies d'interacció entre els diferents tipus cel.lulars.

A continuació es descriuen alguns dels factors de creixement i citoquines més rellevants d'acord amb el seu efecte.

#### **1.2.2.3.1 — Factors que promouen el desenvolupament d'hiperplàsia intimal**

Platelet-derived growth factor (PDGF) — Es sintetitza per les cèl.lules endotelials i musculars llises vasculars i es compon de dues cadenes polipeptídiques (A i B) i actua sobre dos receptors diferents:  $\alpha$  i  $\beta$ . Les plaquetes alliberen predominantment la isoforma BB. S'ha demostrat que l'administració de PDGF-BB potencia la migració cel.lular i que la inhibició de PDGF redueix la formació d'hiperplàsia intimal (Heldin i col, 1992; Poon i col, 1999).

Fibroblast growth factor (FGF) — És sintetitzat també per les cèl.lules endotelials i les musculars llises a nivell vascular. S'han caracteritzat dos membres: bàsic (bFGF) i àcid (aFGF). Després de la lesió arterial, el FGF s'allibera de la matriu extracel.lular i estimula la proliferació de les cèl.lules endotelials i musculars llises. Els estudis experimentals han demostrat un major desenvolupament d'hiperplàsia intimal en relació a l'administració de bFGF, i que l'ús d'un anticòs anti-bFGF redueix l'engruiximent intimal observat després de la lesió arterial (Lindner i col, 1991 i 1993).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) — De forma similar al FGF, el VEGF també estimula la proliferació i migració de les cèl.lules endotelials. A més, incrementa la permeabilitat microvascular i l'angiogènesi mitjançant un efecte pro-migratori en les cèl.lules endotelials (Ferrara i col, 2003).

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) — Actua bàsicament com un factor de progressió en l'activació de la proliferació de cèl.lules musculars llises, i també promou la síntesi d'hidroxiprolina i l'organització de les fibres de col.lagen (Werner i col, 1991).

Enzim conversor de l'angiotensina (ECA) — S'ha documentat que l'activitat de l'ECA es correlaciona amb la hiperplàsia intimal. En un model d'angioplàstia en la rata, l'administració sistèmica d'un inhibidor de l'ECA, va reduir el desenvolupament d'hiperplàsia intimal (Powell i col, 1989).

Angiotensina II — Un bon nombre d'estudis han demostrat el seu efecte a nivell d'induir hipertròfia i estimular també la proliferació cel.lular (Daemen i col, 1991).

Trombina — Generada al activar-se la cascada de la coagulació pel factor tissular, la trombina és un potent factor mitògen per les cèl.lules musculars llises (Okazaki i col, 1992). Una de les estratègies més estudiades per prevenir la hiperplàsia intimal post-angioplàstia, ha estat precisament l'ús de fàrmacs antitrombínics.

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) — És un important mediador inflamatori. No s'expressa en l'arbre vascular en condicions normals, però la seva expressió s'indueix en les cèl.lules musculars llises de la capa mitja i la neoíntima després d'una angioplàstia (Tanaka i col, 1996). S'ha demostrat que activa la proliferació i la migració de cèl.lules musculars llises vasculars *in vivo* i *in vitro*, i per una altra banda, promou també l'apoptosi de les cèl.lules musculars llises de la placa ateroscleròtica (Niemann-Jönsson i col, 2001).

Interleuquina-1 (IL1 $\beta$ ) — És una citoquina pro-inflamatòria a nivell



cardiovascular que promou l'expressió de molècules d'adhesió i la proliferació de les cèl.lules musculars llises vasculars. Els seus efectes són regulats per l'antagonista fisiològic del receptor de IL-1 (IL-1ra) (Isoda i col, 2003). S'ha demostrat l'expressió de IL-1 i IL-1ra en cèl.lules musculars llises en la neointima en models experimentals d'angioplastia i en cèl.lules musculars llises humanes en cultiu (Lin i col, 2003).

#### 1.2.2.3.2 — Factors que inhibeixen el desenvolupament d'hiperplàsia intimal

Heparina — Les cèl.lules endotelials i musculars llises sintetitzen heparina i altres molècules similars. S'ha demostrat que l'heparina inhibeix la migració i la proliferació de cèl.lules musculars llises, així com la síntesi de matriu extracel.lular (Clowes i col, 1977; Snow i col, 1990). Els mecanismes a través dels quals l'heparina exerceix aquest efecte no han estat encara ben definits, però entre els mecanismes proposats hi ha la inhibició dels proto-oncogens *c-myc* i *c-fos*, entre d'altres (Reilly i col, 1989).

Òxid nítric (NO) — A més del seu conegut efecte vasodilatador, inhibeix l'agregació plaquetària i la proliferació de cèl.lules musculars llises. S'ha demostrat l'expressió de la sintasa induïble de l'òxid nítric a nivell de les cèl.lules musculars llises. Aquesta expressió és induïda per diverses citoquines implicades en el desenvolupament d'hiperplàsia intimal, com IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  i IFN  $\gamma$  (Busse i col, 1990). En models experimentals, l'administració del precursor del NO, L-arginina, redueix el desenvolupament d'hiperplàsia intimal, i l'antagonisme del NO mitjançant L-NAME, reverteix aquest efecte beneficiós (McNamara i col, 1993).

Interferó gamma (IFN- $\gamma$ ) — És una citoquina derivada dels limfòcits T, que inhibeix la proliferació i migració de cèl.lules musculars llises vasculars en cultiu (Shimokado i col, 1994; Rolfe i col, 1995) i la formació d'hiperplàsia intimal en models experimentals de lesió arterial (Hansson i col, 1991). Un dels mecanismes d'acció responsables d'aquest efecte és induir la síntesi d'òxid nítric per les cèl.lules musculars llises (Stein i col, 1995).

#### 1.2.2.3.3 — Factors amb acció mixta

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )— S'ha demostrat que aquest factor pot inhibir tant la proliferació com la migració de cèl.lules musculars llises i endotelials *in vitro* (Roberts i col, 1990). Paradoxalment, el TGF- $\beta$  pot tant estimular com inhibir la proliferació de cèl.lules musculars llises. Sembla que en presència de concentracions baixes de TGF- $\beta$ , aquest té un efecte estimulador sobre la proliferació cel.lular, mentre que en concentracions elevades té un efecte inhibidor (Battegay i col, 1990). S'ha descrit també un paper per el TGF- $\beta$  en la composició de la matriu extracel.lular, ja que estimula la síntesi de proteïnes estructurals com els proteoglicans, col.lagen i fibronectina (Ignatz i col, 1986).

#### 1.2.2.4 — EQUILIBRI QUIESCÈNCIA – PROLIFERACIÓ – APOPTOSI

La proliferació de cèl.lules musculars llises és un component primordial de la hiperplàsia intimal i, en última instància, totes les vies de senyalització cel.lular en el procés de la proliferació cel.lular conflueixen en el cicle cel.lular.

El balanç entre quiescència, proliferació i apoptosi, o mort cel.lular programada es manté gràcies a un estricte control a càrrec d'un bon nombre de proteïnes reguladores. La progressió a través de les diferents fases del cicle cel.lular està mitjançada per la formació de complexos enzimàticament actius que consten d'una quinasa (K) i una proteïna dependent de la quinasa (CDK). Entre els reguladors negatius del cicle, els inhibidors de les quinases dependents de les ciclins (CKIs) s'uneixen als esmentats complexos i els inactiven induint la parada del cicle cel.lular (Sherr i col, 1995; Mac Lellan i col, 1997), (figura 5).

Després d'una lesió arterial, el manteniment adequat de l'equilibri entre proliferació i apoptosi pot tenir un gran impacte sobre el desenvolupament d'hiperplàsia intimal i el remodelat vascular.

Recentment, les investigacions en el camp de l'oncologia han despertat gran interès en l'àmbit cardiovascular per les implicacions que tenen en

comú les neoplàsies amb l'aterosclerosi i la restenosi (Ross i col, 2001).

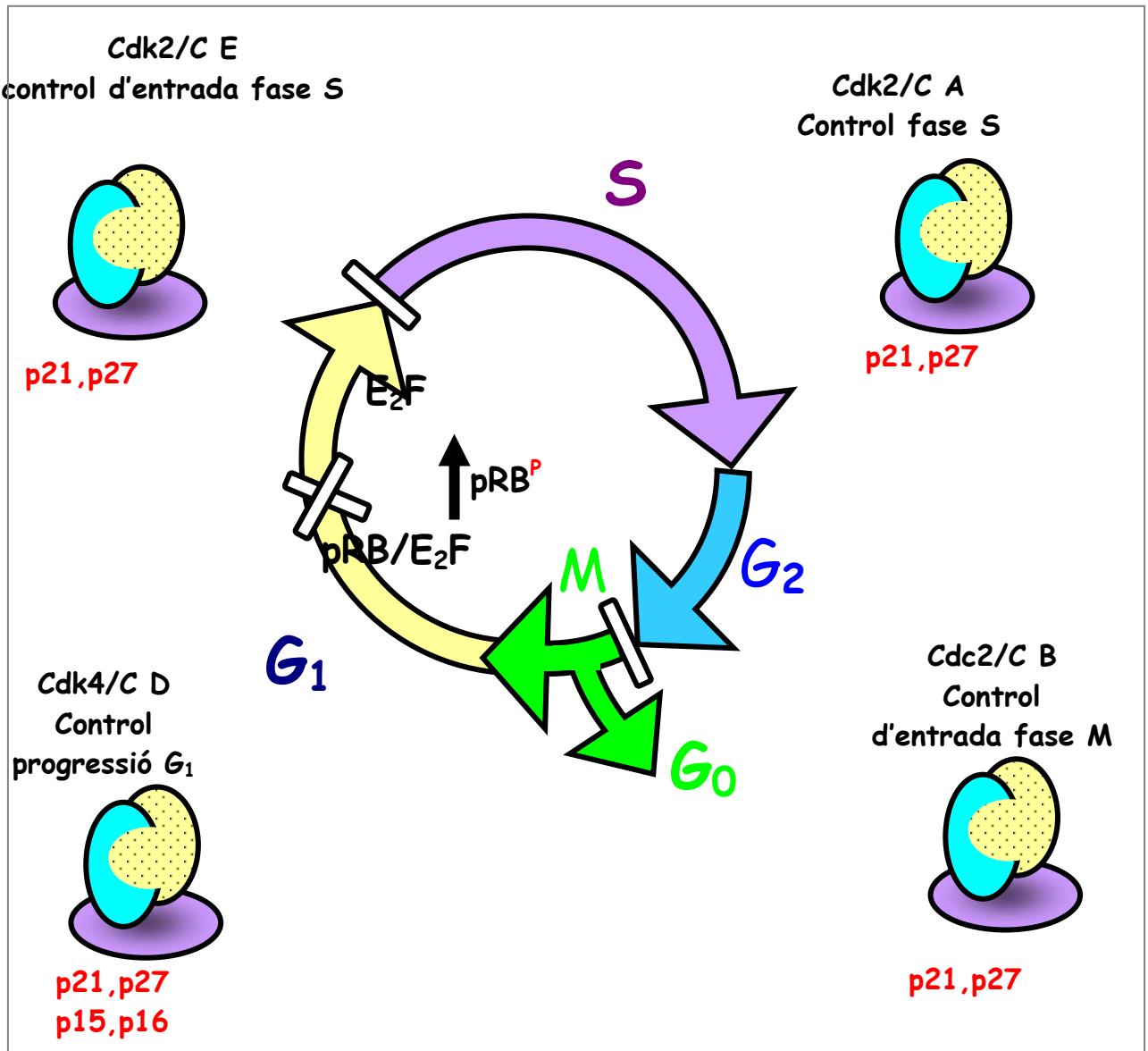


Figura 5. *Cicle cel·lular*

El grau d'expressió tissular i les mutacions de reguladors del cicle cel·lular, com les CDKs, el producte del gen del retinoblastoma (pRB), o p53, entre d'altres, tenen implicacions pronòstiques en neoplàsies humanes, com colon, mama o pròstata. En aquest contexte, una marcada expressió tumoral d'un regulador negatiu, com p27 per exemple, indica un component proliferatiu menys agressiu i un millor pronòstic (Loda i col, 1997; Catzavelos i col, 1998; Cordon-Cardo i col, 1998).

Entre els reguladors de la progressió cel.lular, també s'ha analitzat l'expressió de CDKs (com CDK1 i CDK2) i CDKIs (com p27, p21 i p16) a la paret vascular durant el procés de resposta a la lesió arterial després d'una angioplàstia (Tanner i col, 1998; Braun-Dullaeus i col, 1998; Roqué i col, 2000). Aquests reguladors tenen una seqüència d'expressió al llarg del temps que suggereix que tenen una funció important en el control de la proliferació cel.lular excessiva que està tenint lloc a la paret arterial com a conseqüència de la lesió.

Entre els múltiples reguladors de la progressió del cicle cel.lular, a nivell vascular un membre de la família Kip/Cip de CDKIs, p27, sembla tenir un paper especialment remarcable.

#### 1.2.2.4.1 — p27<sup>Kip1</sup>

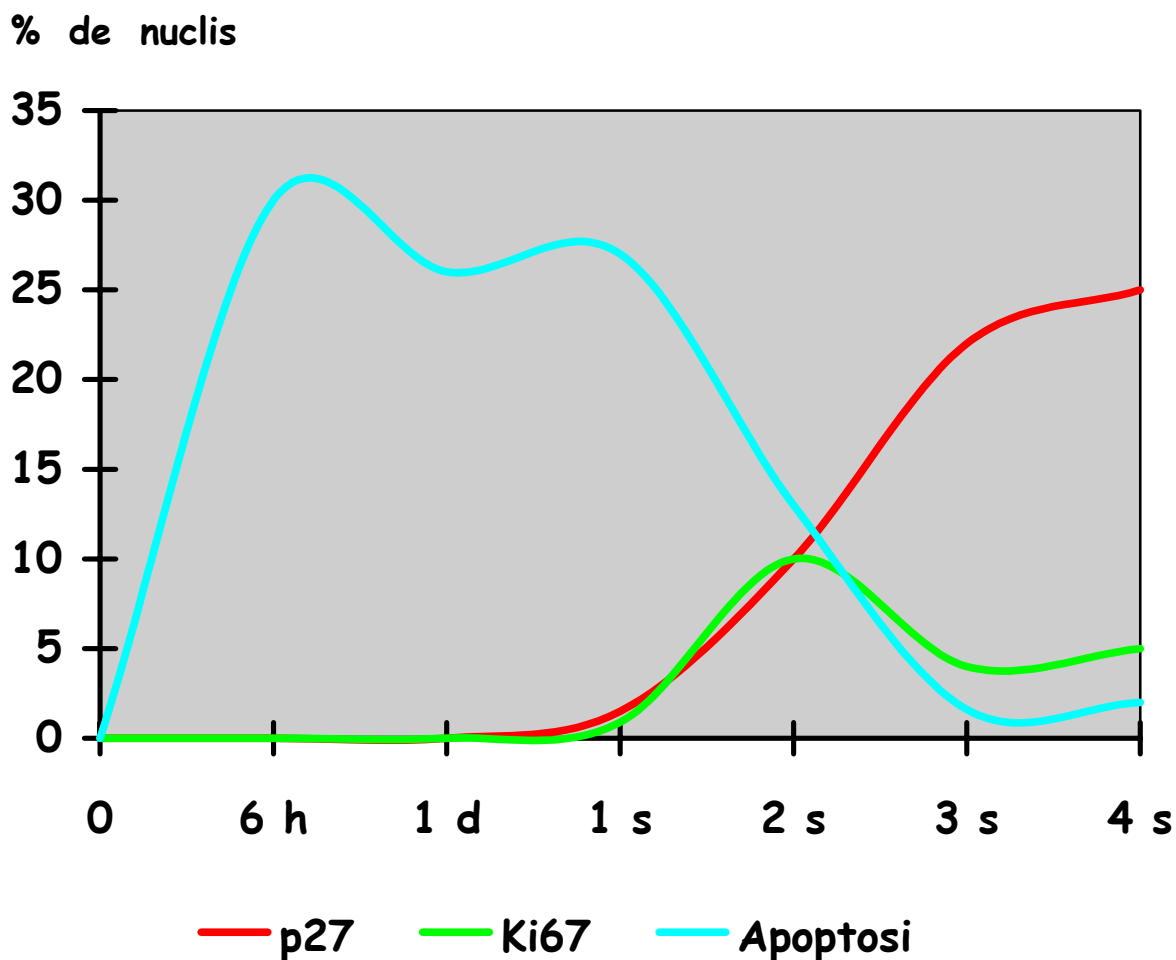
p27 és una CDKI que té com funció predominant la regulació de la transició de la fase G1/S, que determina l'entrada de la cèl.lula a la fase S o la retirada del cicle cel.lular (Polyak i col, 1994). Els estímuls mitogènics, com PDGF o interleuquina 2 (IL-2), indueixen una disminució dels nivells de p27 (Nourse i col, 1994; Agrawal i col, 1996), fet que permet l'hiperfosforilació del pRB, l'alliberament dels factors de transcripció i la replicació cel.lular.

S'han generat ratolins deficientes en p27 que tenen com a característica primordial una marcada hiperplàsia de múltiples òrgans, causada per una hiperproliferació generalitzada (Fero i col, 1996; Kiyokawa i col, 1996; Nakayama i col, 1996). Aquests animals tenen també una elevada incidència de tumors, consistent amb les evidències a favor de l'efecte protector de p27 contra la proliferació cel.lular excessiva i el pronòstic de malalties neoplàsiques, com s'ha comentat prèviament.

Diversos treballs han analitzat l'expressió de p27<sup>Kip1</sup> a nivell vascular. En models experimentals d'angioplàstia sobre l'artèria ilio-femoral al porc o a la caròtida en rata, s'ha demostrat l'expressió de p27<sup>Kip1</sup> a la paret arterial en condicions basals, amb un ràpida desaparició de la seva expressió

després de la lesió arterial, seguida d'un marcat increment en les fases més tardanes (Tanner i col, 1998; Chen i col, 1997; Braun-Dullaeus i col, 1998).

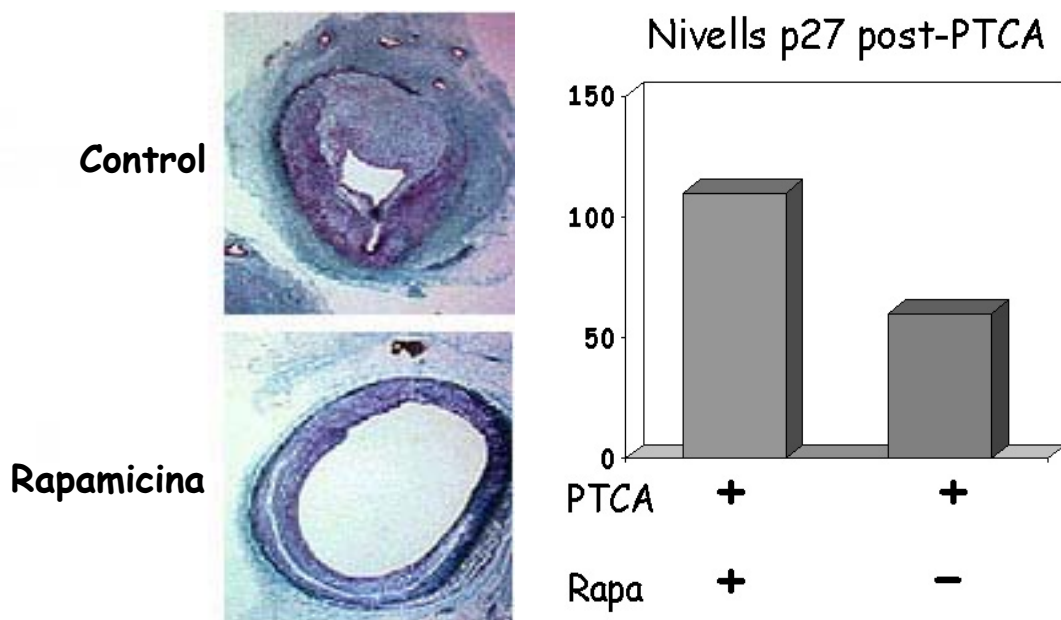
El nostre grup va examinar l'expressió i correlació de marcadors de proliferació cel.lular (Ki67), apoptosi (mitjançant el mètode TUNEL) i del regulador p27<sup>Kip1</sup> a la paret arterial en un model d'angioplàstia coronària en el porc (figura 6). Els resultats d'aquest treball tenen més rellevància de cara a les implicacions clíniques, al tractar-se del mateix procediment i del mateix territori vascular que en els procediments intervencionistes en humans.



**Figura 6.** Expressió de p27, Ki67 i apoptosi en artèries coronàries porquines després d'una angioplàstia (Roqué i col, 2000).

Una hora després de l'angioplàstia, l'expressió de p27<sup>Kip1</sup> i de Ki67 era indetectable i es va observar un increment molt ràpid de la taxa d'apoptosi a la capa mitja i adventícia arterials. Una setmana després, l'índex proliferatiu s'anava incrementant i de forma paral·lela s'incrementava també l'expressió de p27<sup>Kip1</sup>. A partir de la tercera setmana post-angioplàstia, l'índex proliferatiu va disminuir de forma dràstica, mentre que els nivells de p27<sup>Kip1</sup> assolien un "plateau" i es mantien elevats (figura 6). Aquestes dades suggereixen que la inducció de p27 endògena ajuda a controlar la proliferació cel·lular excessiva i a restablir l'equilibri entre quiescència-proliferació a les fases tardanes després de la lesió vascular.

En un model d'angioplàstia coronària en el porc, hem demostrat també que el fàrmac antiproliferatiu rapamicina redueix la formació d'hiperplàsia intimal. Un dels mecanismes d'acció principals de rapamicina és la inducció d'un increment dels nivells de p27<sup>Kip1</sup> a la paret vascular (Gallo i col, 1999), (figura 7). Més recentment, també s'ha documentat que p27<sup>Kip1</sup> intervé en les vies de senyalització que regulen la migració cel·lular (Sun i col, 2001).



**Figura 7.** Rapamicina redueix la resposta proliferativa post-PTCA mitjançant un increment dels nivells de p27 a la paret arterial (Gallo i col, 1999).

El fet que p27 estigui implicada tant en les vies de proliferació com de migració fa que el desenvolupament de tècniques destinades a incrementar i promoure l'expressió de p27 a la paret vascular, després d'una angioplàstia o la implantació d'un stent intravascular, tingui una especial rellevància clínica.

### 1.2.2.5 — MIGRACIÓ CEL.LULAR

Les vies de migració són menys conegudes que les de proliferació, però també es tracta d'un procés que inclou múltiples etapes. La modulació fenotípica de la cèl.lula muscular llisa és un pas imprescindible, juntament amb el remodelat de la matriu extracel.lular i l'establiment de contactes cèl.lula-cèl.lula i cèl.lula-matriu extracel.lular a través d'adhesions focals (Newby i col, 2000).

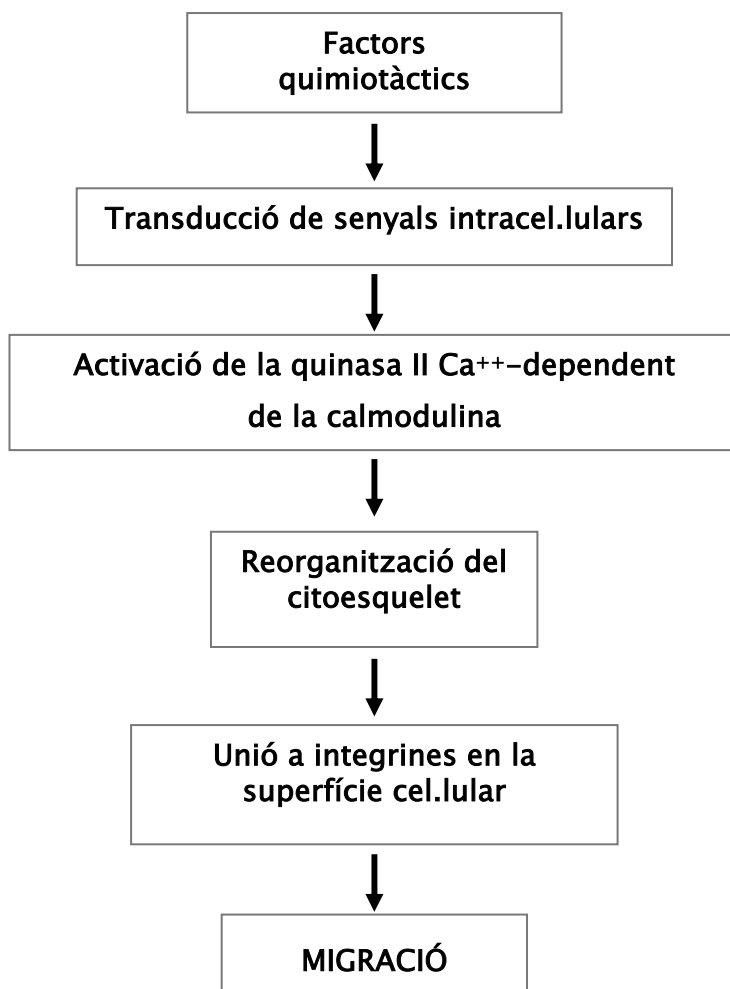
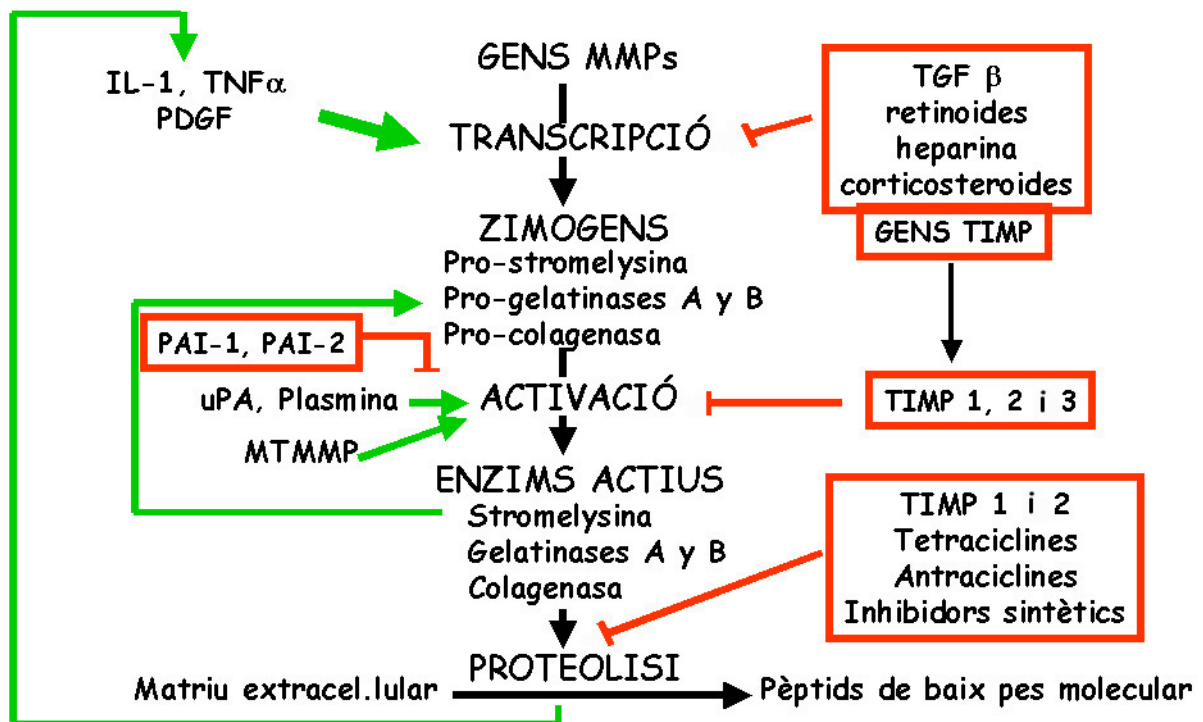


Figura 8. *Vies de migració cel.lular*

La migració cel.lular requereix la degradació de la matriu extracel.lular que envolta la cèl.lula. Les metal.loproteïnases són una família d'enzims zinc-dependents que degraden proteïnes de la matriu extracel.lular—com el col.lagen, elastina i vitronectina, entre d'altres—i d'aquesta manera faciliten el moviment cel.lular.

La lesió arterial indueix un augment local de l'expressió d'activadors del plasminogen, que activen metal.loproteïnases de la matriu extracel.lular, com la gelatinasa B, també coneguda com metal.loproteïnasa 9 (MMP 9), entre d'altres (Reidy i col, 1990).



**Figura 9.** *Transcripció, activació i inhibició de l'activitat proteolítica de la matriu extracel.lular*

La pròpia lesió arterial indueix també l'expressió de MMPs durant les primeres 24 hores post-lesió (Zempo i col, 1994). Algunes MMPs, com la MMP-2 i la MMP-9, han demostrat ésser necessàries per a la migració de les



cèl.lules musculars llises (Pauly i col, 1994; Kenagy i col, 1997). La sobreexpressió de MMP-9 en un model *in vitro* i *in vivo* de migració de cèl.lules musculars llises augmenta la capacitat migratòria de les cèl.lules i altera el remodelat vascular al disminuir el contingut en matriu extracel.lular de la capa intimal (Mason i col, 1999).

Treballs previs en models experimentals han demostrat que la inhibició de metal.loproteïnases retarda el desenvolupament d'hiperplàsia intimal (Bendeck i col, 1996), posant de manifest la importància de les metal.loproteïnases en el procés de migració i la resposta a la lesió vascular.

### 1.2.3 — SÍNTESI DE MATRIU EXTRACEL.LULAR I REMODELAT VASCULAR

Quan, com a conseqüència de la lesió arterial, les cèl.lules musculars llises de la paret vascular abandonen el seu fenotip contràctil, passen a sintetitzar grans quantitats de col.lagen, elastina, proteoglicans i glicosaminoglicans, que seran els components principals de la matriu extracel.lular.

De fet, en les lesions restenòtiques humanes, s'ha objectivat que la major part de l'àrea ocupada per la hiperplàsia intimal correspon a matriu extracel.lular i les cèl.lules, en són el component minoritari (Pickering i col, 1993).

Les molècules d'adhesió, factors de creixement i citoquines juguen també un paper en la síntesi dels constituents de la matriu extracel.lular. Concretament, el TGF- $\beta$  és un potent estimulador de la síntesi de col.lagen i altres proteïnes per les cèl.lules musculars llises (Gibbons i col, 1992).

En la restenosi, així com en l'aterosclerosi, és fonamental que existeixi un equilibri metabòlic entre síntesi i degradació dels diferents components de la matriu extracel.lular. D'aquest fràgil equilibri en depèn, per una banda, l'estabilitat o vulnerabilitat de la placa ateroscleròtica i, per l'altra, determina el remodelat vascular, que serà un factor determinant del compromís que la

placa o lesió restenòtica condiona al flux coronari i a la perfusió tissular.

El procés que anomenem "remodelat" consisteix bàsicament en un canvi del diàmetre de la llum vascular com a conseqüència de canvis estructurals, de tipus adaptatiu, de la paret vascular. Aquest procés, que s'ha demostrat en malalties com la hipertensió arterial, també es produeix en l'aterosclerosi i la restenosi. A mesura que l'àrea de la lesió intimal augmenta, la paret vascular es dilata per adaptar-se a la demanda de flux sanguini.

Entre els mecanismes causants del remodelat, cal destacar la importància dels canvis en la composició de la matriu extracel.lular i altres, com la mort cel.lular programada o apoptosi. L'endoteli, que té com una de les seves funcions principals la regulació del flux sanguini, i l'adventícia, són també components de la paret vascular que tenen un paper clau en la regulació del remodelat arterial (Kakuta i col, 1994).

A la vista del fet que la matriu extracel.lular és un component activament involucrat en el procés de desenvolupament d'hiperplàsia intimal, cal considerar que la modulació de la composició de la matriu extracel.lular podria ésser una estratègia terapèutica a valorar pel tractament i control de la restenosi post-intervencionisme coronari.

## **1.3 — PAPER DELS MODELS ANIMALS EN L'ESTUDI DE LA RESPOSTA A LA LESIÓ VASCULAR**

---

### **1.3.1 — MODELS ANIMALS DE RESTENOSI**

L'estudi de la resposta a la lesió arterial en models experimentals ha estat fonamental per al coneixement dels mecanismes que porten al desenvolupament d'hiperplàsia intimal.

La seqüència d'esdeveniments que condueixen a la hiperplàsia intimal

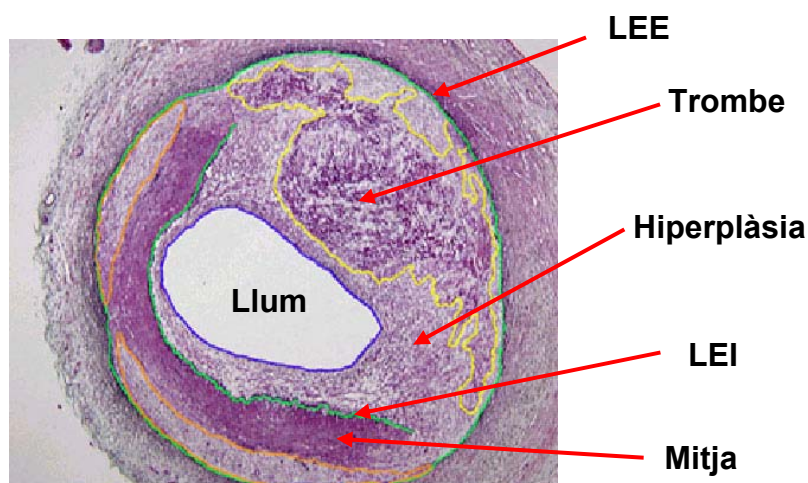
és complexa i, com s'ha descrit prèviament, involucra un gran nombre de processos intracel·lulars. Aquesta complexitat implica una possible variabilitat entre espècies, que fa que els resultats o la informació obtinguts en estudis experimentals o estudis *in vitro* no sempre sigui reproduïble o aplicable en el context humà. D'aquí el gran interès en perfeccionar els models experimentals de que disposem.

En l'estudi de la fisiopatologia de la hiperplàsia intimal i la resposta a la lesió arterial s'ha emprat una gran varietat de models animals: porc, babuí, gos, conill, rata; i una varietat també considerable de territoris vasculars: artèries ilíaqües, femorals, caròtides i coronàries. L'elecció del llit vascular és quasi tant rellevant com l'espècie animal escollida, ja que l'origen embriològic té implicacions en la resposta a la lesió (Badimón i col, 1998). També hi ha diversitat en quant als mètodes de lesió emprats, des de tècniques de lesió endoluminal amb baló o altres tipus de catèters, fins a tècniques de lesió extraluminal mitjançant col·locació d'anells externs o d'altres.

Entre els models animals més emprats i que s'ha proposat com el més proper al sistema cardiovascular humà i que, per tant, millor podria reproduir la biopatologia vascular, destaca el model porquí. Es tracta d'un model de restenosi que, des del punt de vista tècnic, permet l'aplicació de la mateixa metodologia i estratègies de revascularització que en la pràctica clínica i que presenta una resposta a la lesió representativa de la que observem en humans. Cal ressaltar la importància de la trombosi en la fase aguda post-lesió arterial com a determinant clau de la formació d'hiperplàsia intimal, al igual que en els humans (Gallo i col, 1998; Roqué i col, 2000). Una altra característica d'aquest model és la necessitat d'induir una lesió severa durant l'angioplàstia o la implantació d'un stent, de forma que és imprescindible la laceració de la làmina elàstica interna per tal de desenvolupar un engruiximent neointimal considerable (Schwartz i col, 1992). Aproximadament 28 dies després de l'angioplàstia s'observa una resposta proliferativa considerable, comparable a la restenosi que podríem observar

en humans als 6 mesos post-angioplàstia (figura 10).

Amb el model porquí també tenim la possibilitat d'utilitzar animals hiperlipidèmics. Es tracta del porc del Yucatán, un animal que en el seu estat adult no incrementa significativament la seva mida i permet el seu seguiment durant períodes de temps més llargs. Els animals s'alimenten amb dieta hipercolesterolèmica i es sotmeten a procediments de doble lesió, en que es realitza una angioplàstia prèvia en l'animal sota dieta hipercolesterolèmica i en un segon temps s'implanta el stent. És un model d'elecció per avaluar la restenosi intra-stent en condicions d'hiperlipidèmia.



**Figura 10.** *Microfotografia representativa d'una artèria coronària porcina 4 setmanes després d'una angioplàstia (Gallo i col, 1998).*

L'aplicació de tècniques d'angioplàstia i implantació de stents a les artèries ilíacques de primats també ha estat objecte de múltiples treballs experimentals. Tenen l'avantatge de desenvolupar lesions ateroscleròtiques similars a les humanes i aquest efecte es pot potenciar amb l'administració de dietes hiperlipidèmiques (Kritchevsky i col, 2001).

El conill també ha estat àmpliament emprat (Finking i col, 1997). Entre els avantatges, la mida de l'animal ens permet encara la utilització de catèters d'angioplàstia i també la implantació de stents en l'artèria ilio-

femoral i la possibilitat d'estudiar animals amb hiperlipidèmia. Es tracta de les soques de conills anomenades Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit, New Zealand White Rabbit i el Dutch Belted Rabbit. Aquests animals tenen una marcada hipercolesterolèmia, que es potencia amb l'administració d'una dieta hiperlipidèmica. Aquesta característica fa que sigui un model molt utilitzat en estudis de progressió d'aterosclerosi i restenosi. A més, en el conill també s'observa la formació de trombe a la fase aguda post-angioplastia, al igual que en el porc i els humans (Bauters i col, 1995).

La rata, ha estat un dels models més utilitzats degut a avantatges de caire econòmic, estabulació i baixes necessitats d'equipament tècnic. Com inconvenients destaquen la manca de trombosi a la fase aguda, l'escassa formació d'hiperplàsia intimal i la mida reduïda de l'animal que limita les possibilitats d'avaluar procediments similars als emprats en humans.

Fins recentment, el ratolí era l'espècie menys emprada en estudis de restenosi. Obviament, el seu tamany implica una gran dificultat tècnica per la realització de procediments de lesió vascular. Cal recordar que el diàmetre mig de l'aorta es situa entre 1–1,5 mm i el de l'artèria femoral és de 0,4–0,5 mm, aproximadament. En els darrers anys, amb l'adveniment de les tècniques de manipulació genètica, ha crescut l'interès per desenvolupar models de restenosi aplicables al ratolí, per tal de poder estudiar el paper de gens específics.

### **1.3.2 — APLICACIÓ DE TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ GENÈTICA A LA RECERCA EXPERIMENTAL**

La tecnologia transgènica ens permet estudiar l'efecte de l'absència d'un gen aïllat en un determinat procés patològic. L'objectiu de la tecnologia knockout és substituir el gen d'interès per un altre que és inactiu, està alterat o és irrellevant.

La metodologia per generar un ratolí knockout és un procés estàndard (figura 11).

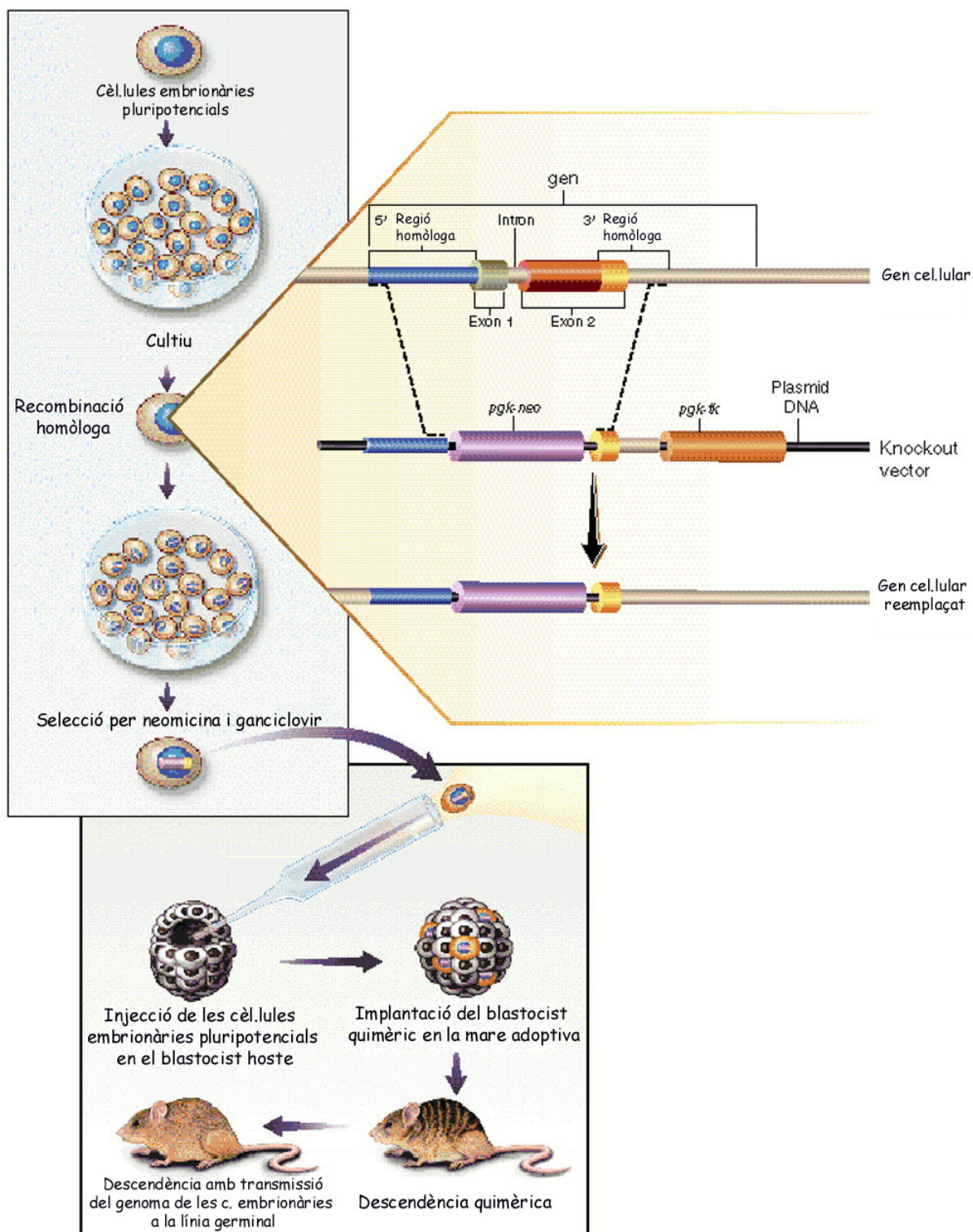


Figura 11. Procés de generació de ratolins knockout (Majzoub i col, 1996)

Aquest procés comporta diferents passos: 1) disseny de la seqüència d'ADN o vector knockout que ha d'ésser transferit, mitjançant tècniques de recombinació homòloga de l'ADN. 2) incubació del vector knockout amb cèl.lules embrionàries pluripotencials en cultiu. 3) doble recombinació entre el gen cel.lular i el vector knockout, que resultarà en la incorporació del vector knockout en el locus genòmic de la cèl.lula embrionària. 4) selecció positiva-negativa de les cèl.lules embrionàries que han incorporat el vector knockout. 5) injecció de les cèl.lules en un blastocist hoste. 6) implantació del blastocist a una femella pseudogestant. La descendència serà quimèrica per la mutació que s'ha introduït. Els ratolins heterocigots resultants es creuen entre ells per obtenir així ratolins amb dèficit homocigot pel gen d'interès (Shuldiner i col, 1996; Gao i col, 1999; Majzoub i col, 1996).

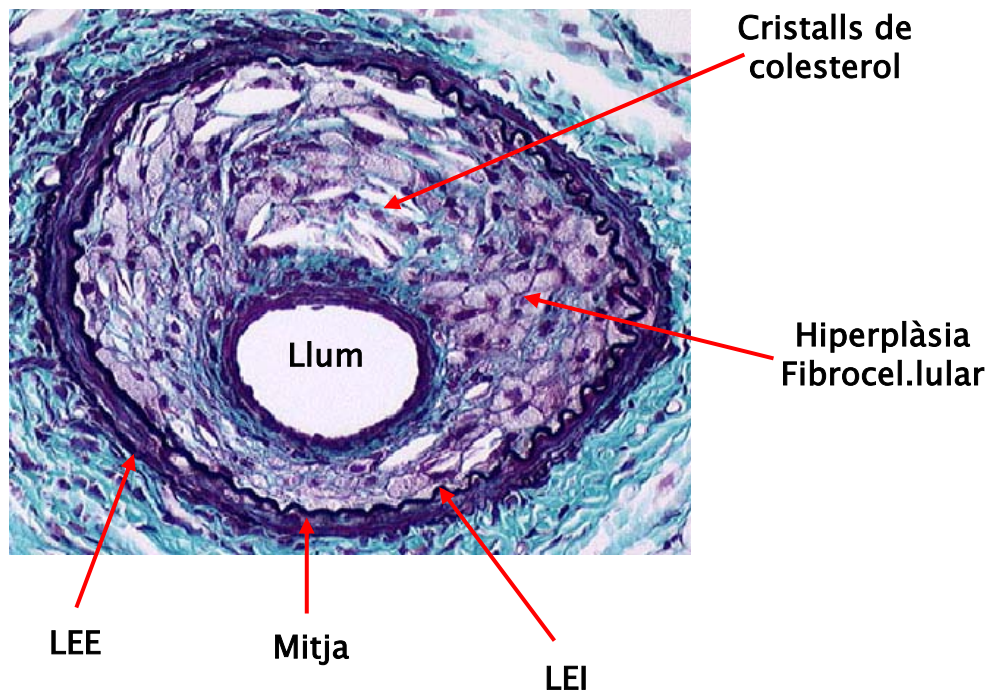
Els estudis en animals genèticament manipulats han constituït un gran avenç en els darrers anys. Aquesta tecnologia és una eina fonamental que ofereix noves possibilitats d'estudi del paper de gens concrets en processos com l'aterosclerosi i la restenosi. És previsible que en el futur aquesta tecnologia ens faciliti el desenvolupament d'estratègies terapèutiques.

### 1.3.3 — MODELS MURINS D'ATEROSCLEROSI I HIPERPLÀSIA INTIMAL

Actualment disposem ja d'un nombre important de ratolins genèticament manipulats als que s'ha deprivat de gens específics relacionats amb una funció concreta dins del procés de desenvolupament d'aterosclerosi. El ratolí apoE KO (apoE<sup>-/-</sup>) i el ratolí KO pel receptor de la LDL (LDLr<sup>-/-</sup>) desenvolupen lesions ateroscleròtiques molt similars a les humanes, des del punt de vista de la seva complexitat, amb un nucli lipídic i càpsula fibrosa (figura 12). A diferència de les soques murines salvatges, aquests models permeten l'estudi del paper dels macròfags en el desenvolupament de la placa.

Recentment, s'ha despertat gran interès pel control de la proliferació cel.lular com estratègia potencialment útil en el control de la restenosi i s'han generat ratolins genèticament manipulats per diferents proteïnes reguladores

del cicle cel.lular, com els ratolins p27KO (p27<sup>-/-</sup>) i p21KO (p21<sup>-/-</sup>), entre d'altres.



**Figura 12.** *Microfotografia d'una lesió restenòtica en l'artèria femoral d'un ratolí apoE knockout.*

Aquests models, han estat fonamentals en el camp de la recerca bàsica en oncologia durant els darrers anys. Actualment, s'ha aplicat el coneixement del paper regulador de p27 i p21 a diferents circumstàncies que comporten una proliferació cel.lular excessiva, com és el cas de la restenosi post-angioplàstia.

### 1.3.3.1 — RATOLÍ p27 KNOCKOUT

Els animals deficientes en p27 tenen com a característica fenotípica primordial una mida més gran, degut a una hipercel.lularitat tissular generalitzada com a conseqüència de l'absència de p27. A més tenen una major incidència de tumors pituitaris, fins un 50% de casos, a partir de les 12 setmanes d'edat. Com altres característiques, els ratolins p27<sup>-/-</sup> tenen una



marcada desorganització cel·lular a la retina i les femelles homocigotes pel dèficit són estèrils, degut a una manca de desenvolupament dels fol·licles ovàrics (Nakayama i col, 1996; Fero i col, 1996; Kiyokawa i col, 1996).

### 1.3.3.2 — RATOLÍ APOE KNOCKOUT

És el model murí d'aterosclerosi més estudiat. L'apolipoproteïna E és un lligand dels receptors de les apolipoproteïnes sèriques, fonamentalment dels quilomicrons i les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL). Com a conseqüència, els nivells de colesterol són elevats (Plump i col, 1992). Aquests animals desenvolupen lesions ateroscleròtiques en les diferents fases d'evolució de forma similar als humans. La localització de les lesions ateroscleròtiques segueix també una distribució similar a la que observem en humans: són típiques les lesions a l'arrel aòrtica, troncs supra-aòrtics i a les bifurcacions en general (Nakashima i col, 1994; Seo i col, 1997; Palinski i col, 2001).

### 1.3.3.3 — RATOLÍ CCR2 KNOCKOUT

S'han generat ratolins deficients en CCR2, el receptor per MCP-1 (Charo i col, 1999). Aquests animals tenen alteracions en l'adhesió leucocitària (Kuziel i col, 1997), la internalització de monòcits/macròfags dins la paret vascular i una menor producció de interferó- $\gamma$  (Kurihara i col, 1997). L'estudi de l'arbre arterial d'animals CCR2<sup>-/-</sup> creuats amb animals apo-E<sup>-/-</sup>, alimentats amb una dieta hipercolesterolèmica, mostra una marcada disminució de la presència de macròfags i de l'àrea de les lesions ateroscleròtiques versus els animals amb dotació normal de CCR2 (Boring i col, 1998).

### 1.3.4. TÈCNIQUES DE LESIÓ ARTERIAL EN EL RATOLÍ

Degut a les dimensions reduïdes de l'arbre vascular del ratolí, les tècniques de lesió arterial més freqüentment emprades en models animals més grans no són factibles. Per això la disponibilitat d'un model reproduïble

de lesió arterial en el ratolí serà un instrument de gran aplicabilitat en un futur proper.

S'han descrit diverses tècniques de lesió arterial externa en ratolins: lligadura de l'artèria caròtida comú (Kumar i col, 1997), aplicació de corrent elèctric perivascular a l'artèria caròtida o femoral (Carmeliet i col, 1997) i implantació d'un anell de polietilè al voltant de l'artèria caròtida o femoral (Moroi i col, 1998). La limitació més important d'aquests mètodes és que la lesió es produeix des de l'exterior de l'artèria, a l'inrevés de com es produeix en humans, des de l'interior del vas. Altres tècniques han intentat induir la lesió des de l'interior, com per exemple a través de la injecció d'aire (Simon i col, 2000), o mitjançant el pas d'una guia metàl·lica a través de l'artèria caròtida (Lindner i col, 1993). Aquest darrer mètode, és tècnicament difícil, fet que en pot condicionar la variabilitat i reproduïbilitat.

En aquesta tesi es descriu un nou mètode de lesió arterial en el ratolí des de l'interior de l'artèria femoral, tècnicament factible i reproduïble, que resulta en una considerable formació d'hiperplàsia intimal, de característiques similars a les lesions restenòtiques humanes.

## 1.4 — DESENVOLUPAMENT D'ESTRATÈGIES PER PREVENIR L'HIPERPLÀSIA INTIMAL

---

L'objectiu principal de tot l'esforç científic que està tenint lloc en els darrers anys és aconseguir desenvolupar opcions terapèutiques efectives en el tractament de la hiperplàsia intimal. La taula 3 resumeix la major part d'estratègies que s'han proposat en aquest sentit.

Un dels factors limitants més importants de la recerca bàsica i experimental és l'aplicabilitat de la informació obtinguda *in vitro* o en models animals a la pràctica clínica en humans. Moltes són les estratègies que s'han mostrat efectives a nivell experimental i en les que la seva aplicació humana ha resultat fallida.

### Taula III. Nivells de control del desenvolupament d'hiperplàsia intimal

#### TROMBOSI

- antiagregants plaquetaris
- inhibició IIb-IIIa
- inhibició via del factor tissular/trombina
- anticoagulants

#### INFLAMACIÓ

- estatines, antioxidants, inhibidors COX-2
- inhibició molècules d'adhesió

#### PROLIFERACIÓ I

#### MIGRACIÓ

- inhibició factors de creixement
- modulació de la progressió del cicle cel.lular

#### → estratègies directes - farmacològiques

G1/S — rapamicina

G1/M — paclitaxel

S — actinomicina D

G1/S — inhibidors competitiu ATP

#### → estratègies indirectes - teràpia gènica

<b>inhibidores</b>	{	oligonucleòtids antisentit (anti-CDKs i C)
		“decoy” anti factors de transcripció
		ribozimes (anti c-myb, PCNA)
<b>promotores</b>	{	CDKIs (p27, p16, p21)
		Gax, GATA-6
		p53 (via apoptosi)

- braquiteràpia
- modulació de l'angiogènesi (VEGF, bFGF, HGF)
- inhibició migració cel.lular (batimastat)

#### REMODELAT

- Ca<sup>++</sup>-antagonistes

#### I SÍNTESI DE MATRIU

- IECAS

#### EXTRACEL.LULAR

- inhibidors síntesi col.lagen i  $\alpha_v\beta_3$

Un altre aspecte clau de la biologia humana és la redundància que hi ha en tots els processos. Tal i com s'ha descrit en aquesta introducció, el procés de desenvolupament d'hiperplàsia intimal el componen diferents etapes i hi estan implicats múltiples mecanismes: activació plaquetària, inflamació, migració i proliferació cel.lulars i síntesi de matriu extracel.lular, entre d'altres. Aquesta complexitat biològica pot limitar l'èxit d'una opció terapèutica encaminada a bloquejar un pas concret en la seqüència d'esdeveniments que porten al desenvolupament de la hiperplàsia intimal, ja que altres mecanismes alternatius poden suplir la funció que hàgim alterat o el dèficit provocat.

Una de les estratègies que actualment es proposa com una de les més efectives és el control de la proliferació cel.lular. Concretament, l'aplicació de l'antiproliferatiu rapamicina en la prevenció de la restenosi intra-stent ha assolit una marcada repercussió clínica (Sousa i col, 2001; Lemos i col, 2003). Altres tècniques, com la bioenginyeria cel.lular vascular i la teràpia genètica ofereixen també grans possibilitats en un futur proper.

#### **1.4.1. RAPAMICINA**

La rapamicina és un potent antiproliferatiu que inhibeix la progressió del cicle cel.lular en la transició de la fase G<sub>1</sub>/S (Marx i col, 1995). Els mecanismes d'acció postulats per rapamicina inclouen la inhibició de la quinasa p70S6, la inhibició de la hiperfosforilació del pRB i la inhibició de la disminució dels nivells de p27 per regulació negativa (Dumont i col, 1996; Marx i col, 1995). S'ha proposat que la regulació dels nivells de p27 és crítica per l'activitat antiproliferativa de la rapamicina (Luo i col, 1996). A més, rapamicina té també un potent efecte antimigratori en cèl.lules musculars llises (Poon i col, 1996).

En un estudi previ, hem demostrat que rapamicina inhibeix el desenvolupament d'hiperplàsia intimal en un model porquí d'angioplàstia coronària, i que aquest efecte s'associa a un increment dels nivells de p27 i una disminució dels nivells de pRB hiperfosforilat a la paret vascular (Gallo i

col, 1999). Recentment, s'ha documentat l'efecte inhibitori de rapamicina en la restenosi intra-stent en humans (Sousa i col, 2001; Lemos i col, 2003).

A la llum d'aquestes observacions, rapamicina es perfila actualment com una de les opcions farmacològiques més efectives per a la prevenció i tractament de la restenosi post-intervencionisme coronari.

#### **1.4.2. INHIBIDORS DE LA CICLOOXIGENASA: SULINDAC I ÀCID ACETILSALICÍLIC.**

Com hem comentat, la ciclooxigenasa-2 (COX-2) és un enzim amb funcions pro-inflamatòries a nivell vascular. Sulindac és un antiinflamatori no esteroïdal que actua més selectivament sobre la COX-2.

S'ha descrit l'efecte antiproliferatiu i pro-apoptòtic de sulindac *in vitro* i *in vivo*. Concretament, s'ha demostrat que sulindac afavoreix la regressió dels pòlips de colon i té un efecte favorable en la prevenció de càncer de colon en pacients amb poliposi colònica familiar (Giardiello i col, 2002; Shiff i col, 1995).

Malgrat sulindac inhibeix la COX, no s'ha definit encara la dependència de l'efecte anti-proliferatiu i pro-apoptòtic de sulindac de la inhibició de la COX-1 i 2, com tampoc ha estat estudiat el seu efecte a nivell vascular en el procés de resposta a la lesió, que serà també un dels objectius d'aquesta tesi.

## **2 — HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS**

---

---

## HIPÒTESI DE TREBALL

---

---

La hipòtesi general de l'estudi és que la interferència a diferents nivells en l'activació dels mecanismes inflamatoris i de proliferació cel.lular que es produeix com a conseqüència d'una lesió arterial, com en el cas de l'intervencionisme coronari percutani, pot prevenir el desenvolupament d'hiperplàsia intimal.

## OBJECTIUS

---

---

1. Desenvolupar un model de restenosi en el ratolí, que ens permeti l'estudi dels mecanismes moleculars i cel.lulars implicats en el desenvolupament d'hiperplàsia intimal, mitjançant la utilització de models murins genèticament modificats.

Emprant aquest model murí de restenosi, s'analitzaran:

2. El balanç entre proliferació i apoptosi després de la lesió arterial i el paper dels reguladors del cicle cel.lular a aquest nivell.
3. Els mecanismes de regulació *in vivo* i *in vitro* de la proliferació cel.lular en la prevenció de la hiperplàsia intimal en ratolins deficientes en el regulador del cicle cel.lular p27. Estudiar els mecanismes d'acció del fàrmac antiproliferatiu rapamicina en aquest model.
4. El paper dels macròfags i de la proteïna MCP-1, a través del seu receptor CCR2, a la hiperplàsia intimal en ratolins knockout per CCR2.
5. L'efecte de l'antiinflamatori no esteroïdal sulindac en el desenvolupament d'hiperplàsia intimal en el model murí hiperlipidèmic deficient en apolipoproteïna E i definir-ne els mecanismes d'acció específics.

## **3 — DISCUSSIÓ**



### 3.1.SUBPROJECTE 1

#### **DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL MURÍ D'HIPERPLÀSIA INTIMAL**

---

En aquest treball es descriu un model de lesió de l'artèria femoral del ratolí mitjançant el pas d'una guia d'angioplastia, que ocasiona una denudació endotelial de l'artèria. La durada de la intervenció quirúrgica és curta, té baixa morbi-mortalitat i es pot dur a terme de forma bilateral sense repercussions per l'animal. Aquest procediment indueix de forma reproducible una marcada resposta proliferativa, comparable a la que s'observa en models animals més grans.

Els models experimentals de lesió arterial han estat fonamentals per l'estudi dels mecanismes cel·lulars de desenvolupament d'hiperplàsia intimal i restenosi. Els ratolins genèticament modificats obren noves possibilitats d'estudi del paper de gens específics en aquest procés.

Davant les dificultats tècniques per establir un model de lesió arterial en el ratolí, degut a les reduïdes dimensions del seu arbre vascular, la major part dels mètodes en ús es basa en l'aplicació de mètodes externs de lesió arterial (Carmeliet i col, 1997; Kumar i col, 1997; Moroi i col, 1998). Aquests mètodes extraluminals poden tenir limitacions al extrapolar els resultats a la pràctica clínica, en que la lesió es produeix endoluminalment. S'ha documentat prèviament un altre mètode murí de lesió endoluminal de l'artèria caròtida (Lindner i col, 1993), tècnicament difícil i que indueix una escassa resposta proliferativa.

Al analitzar la formació d'hiperplàsia intimal al llarg del temps en el present model de restenosi, la seqüència observada és similar a la descrita pels models animals superiors. De la mateixa manera, la proliferació neointimal observada és també comparable a la que s'ha documentat en els models animals més grans (Doonerkamp i col, 1996; Schwartz i col, 1990; Kritchevsky i col, 2001).

Treballs previs han descrit una menor resposta proliferativa en animals

de gènere femení (Moroi i col, 1998; Sullivan i col, 1995). Amb el present mètode, no s'han documentat diferències de gènere en la resposta proliferativa. Aquest fet és especialment rellevant de cara a estudis en animals genèticament modificats amb baixa expectativa de vida, de cara a maximitzar el nombre d'animals disponibles i poder utilitzar animals d'ambdós gèneres, sense que això afecti als resultats.

Una troballa molt significativa del nostre model és que reproduceix esdeveniments inflamatoris aguts similars als documentats en humans i en altres models experimentals. Al cap d'una hora de la denudació endotelial, s'observa una marcada adhesió leucocitària, fonamentalment neutròfils, a la superfície luminal denudada. Una particularitat del nostre model és que la presència de neutròfils coexisteix amb l'expressió de ICAM-1, VCAM-1, P-selectina i micropartícules plaquetàries en la superfície luminal. La ràpida expressió d'aquestes molècules d'adhesió descarta la seva síntesi de novo en la paret vascular. En situacions d'isquèmia-reperfusió, angina inestable i presència d'aterosclerosi, entre d'altres, s'ha documentat l'existència d'un pool circulant de molècules d'adhesió, que s'han considerat marcadors inflamatoris amb possibles implicacions pronòstiques. En el model de lesió arterial que descrivim, davant l'absència d'endoteli, proposem que l'origen d'aquestes molècules d'adhesió és probablement circulatori.

Pel que fa a la presència de neutròfils en la paret arterial en la fase aguda post-angioplàstia, en estudis previs s'ha relacionat amb l'aparició de restenosi en fases tardanes. En humans, l'expressió de molècules implicades en l'adhesió de neutròfils després d'una angioplàstia o un infart agut de miocardi s'ha relacionat també amb el desenvolupament posterior de restenosi (Inoue i col, 1998, Neumann i col, 1996; Kamijikkoku i col, 1998).

En conjunt, el model murí de restenosi que es presenta, resulta en una adequada hiperplàsia intimal i una resposta inflamatòria que reproduceix les observacions documentades en models animals superiors i en humans.

## 3.2. SUBPROJECTE 2

## REGULACIÓ DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR I EFECTE DE LA MODULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR EN LA RESTENOSI

---

La proliferació cel·lular és un component essencial en la seqüència d'esdeveniments que té lloc després de la lesió arterial. Emprant el model murí de restenosi que es descriu en aquesta tesi, s'ha analitzat l'expressió temporal de marcadors de proliferació i apoptosi i del regulador del cicle cel·lular p27.

Com a resposta inicial a la lesió arterial, en aquest treball, a partir de les 6 hores post-denudació de l'artèria femoral, s'observa una elevada taxa d'apoptosi entre les cèl·lules musculars llises de la capa mitja i l'endoteli. La lesió mecànica de la paret vascular, com succeeix durant una angioplàstia o la implantació d'un stent, pot condicionar la mort de cèl·lules musculars llises de la capa mitja. Hi ha dos tipus de mort cel·lular: necrosi o apoptosi. L'apoptosi és un procés actiu que, en condicions normals, ajuda a mantenir la massa tissular de forma que una proliferació cel·lular excessiva es compensa a través de la mort cel·lular programada per apoptosi (Bennett i col, 1998). En altres models experimentals, com en el model d'angioplàstia coronària en el porc, o angioplàstia de la caròtida en la rata, també s'ha descrit aquest pic transitori d'apoptosi (Perlman i col 1997; Malik i col 1998).

En aquest model de lesió de l'artèria femoral, l'índex proliferatiu a la capa mitja i la neoíntima, valorat per marcatge immunohistoquímic amb Ki67, augmenta a partir de la primera setmana post-lesió. En el model de lesió de l'artèria caròtida (Lindner i col, 1993), aquest increment és més tardà, cap a la segona setmana post-lesió. Aquesta discrepància pot ser deguda a diferències en la resposta a la lesió de l'artèria femoral i la caròtida.

Entre la segona i la quarta setmana, s'assoleix l'equilibri entre proliferació i apoptosi. A les fases més tardanes, entre la tercera i la quarta setmana post-lesió, es detecten elevats nivells d'expressió de p27, coincidint amb el descens progressiu de l'índex proliferatiu. Aquesta marcada expressió de p27 a la paret arterial es manté en forma de "plateau", mentre que l'índex

proliferatiu retorna als nivells basals. En aquesta darrera fase de la resposta a la lesió, la disminució de la proliferació té una clara relació amb l'increment de l'expressió del regulador negatiu del cicle cel.lular p27. Aquestes observacions fan palesa la funció de p27 en el control de la proliferació cel.lular durant la resposta a la lesió vascular i són consistents amb treballs previs del nostre grup i d'altres (Roqué i col, 2000; Tanner i col, 1998).

Aquest estudi valida el model de denudació endotelial de l'artèria femoral des del punt de vista de la cinètica de la resposta proliferativa i el balanç entre proliferació–apoptosi i expressió de p27 durant el procés de reparació de la lesió arterial.

El següent pas per aprofundir en el paper de p27 en la resposta de la paret vascular a la lesió ha estat aplicar el model de lesió arterial femoral en ratolins deficientes en p27.

En aquest model, la manca de p27 no va alterar la formació d'hiperplàsia intimal. Les cèl.lules deficientes en p27 tenen una fase G<sub>1</sub> del cicle cel.lular més curta i els animals p27 KO tenen una hiperproliferació tissular generalitzada (Coats i col, 1996; Fero i col, 1996; Kiyokawa i col, 1996; Nakayama i col, 1996). Aquestes característiques haurien fet pensar que els animals p27 KO tindrien una resposta proliferativa a la lesió arterial més marcada. Una possible explicació per la manca de diferències observades entre ratolins p27 KO i ratolins de soca salvatge és que una regulació positiva d'altres inhibidors de les quinases dependents de les ciclins, com p21 o p16, podria haver compensat el dèficit de p27 (Casaccia-Bonfil i col, 1999; Kiyokawa i Koff, 1998).

L'estudi *in vitro* de la proliferació de cèl.lules musculars llises aòrtiques deficientes en p27 demostra que no hi ha diferències entre cèl.lules p27 KO i cèl.lules salvatges al analitzar la proliferació a curt termini (24 hores). Aquestes troballes estan en consonància amb estudis previs en fibroblastes i limfòcits T deficientes en p27 (Nakayama i col, 1996). Malgrat tot, quan analitzem la proliferació cel.lular a llarg termini (1–2 setmanes), les cèl.lules

musculars lises p27 KO tenen un índex proliferatiu marcadament incrementat durant la fase de creixement logarítmic respecte a les cèl.lules control.

El fàrmac rapamicina és un potent inhibidor de la proliferació i migració de cèl.lules musculars lises (Marx i col, 1995; Poon i col, 1996) que actua mitjançant la regulació dels nivells de p27 (Luo i col, 1996). En el present estudi, el tractament de cèl.lules musculars lises en cultiu amb rapamicina va induir una inhibició dosi-dependent de la proliferació cel.lular, tant en cèl.lules p27 KO com en cèl.lules control, amb dotació normal de p27. De la mateixa manera, l'administració de rapamicina a ratolins p27 KO i ratolins control, va reduir la formació de hiperplàsia intimal en resposta a la denudació de l'artèria femoral en ambdós grups.

Rapamicina retarda la progressió del cicle cel.lular en els punts de transició  $G_1/S$  i  $G_2/M$ , encara que no bloqueja completament la proliferació. La inhibició de la capacitat proliferativa és, aproximadament, del 50%, el que explica que les cèl.lules puguin seguir proliferant a un ritme més lent (Terada i col, 1993; Marx i col, 1995). Els nostres resultats són consistents amb aquestes observacions, ja que hem observat una reducció del 50% en l'àrea intimal *in vivo* i una inhibició del 40 al 60% en la síntesi de ADN en cèl.lules musculars lises p27 KO i salvatges en cultiu.

Aquests resultats demostren clarament que rapamicina actua a través de mecanismes independents de p27, a més del ja conegut mecanisme p27-dependent. És possible que, *in vivo*, rapamicina tingui un efecte predominant sobre la migració cel.lular, que explicaria l'absència de diferències en la resposta proliferativa entre ratolins p27 KO i controls. A més, es demostra que rapamicina té també un efecte pro-apoptòtic en cèl.lules musculars lises en cultiu, més marcat en les cèl.lules deficientes en p27. Altres grups han documentat troballes similars en diferents línies cel.lulars (Muthukkumar i col, 1995; Hosoi i col, 1999). S'han proposat diferents mecanismes pro-apoptòtics per rapamicina, com la inducció d'apoptosi independent de p53 i el blocatge de la inducció de bcl-2 (Miyazaki i col, 1995; Hosoi i col, 1999).

Aquest estudi demostra que l'efecte inhibitor sobre la hiperplàsia intimal de rapamicina és independent de p27 i que *in vitro* rapamicina actua mitjançant una disminució de la proliferació i un increment de l'apoptosi. Aquests resultats posen de manifest la rellevància de les estratègies de control de la proliferació i migració cel.lulars en el control de la restenosi.

### 3.3. SUBPROJECTE 3

#### EFFECTE DE L'ABSÈNCIA DEL RECEPTOR DE MCP-1, CCR2, EN EL DESENVOLUPAMENT D'HIPERPLÀSIA INTIMAL

---

En aquest subprojecte, es demostra que els ratolins deficients en CCR2, el receptor de MCP-1, tenen una marcada disminució de la resposta proliferativa a la lesió arterial.

S'ha demostrat prèviament que MCP-1 s'expressa ràpidament a la paret vascular post-angioplàstia (Taubman i col, 1992), així com en diferents línies cel.lulars en resposta a estimulació amb factors de creixement i citoquines (Gu i col, 1999). MCP-1 i el seu receptor, CCR2, són mediadors importants de la infiltració per macròfags de la paret vascular i el desenvolupament de la placa en models murins d'aterosclerosi (Kurihara i col, 1997; Boring i col, 1998), però les seves implicacions en la restenosi no havien estat encara explorades.

Aquest treball demostra que la infiltració leucocitària de la paret vascular després d'una lesió té una marcada rellevància en la regulació de la proliferació i migració de cèl.lules musculars llises. Fins i tot en situació de normolipèmia, en que la infiltració leucocitària de la paret és molt escassa, l'absència de CCR2 redueix la formació d'hiperplàsia intimal. Aquestes observacions suggereixen que petits nombres de leucòcits poden exercir un marcat efecte sobre la proliferació neointimal.

CCR2 s'ha implicat en diverses vies de senyalització associades amb la

proliferació, migració i apoptosi cel·lulars. Malgrat tot, les cèl·lules musculars llises vasculares humanes o murines no contenen CCR2, pel que és poc probable que la menor proliferació neointimal observada en els ratolins CCR2 KO sigui el resultat d'una senyalització directa de CCR2 sobre les cèl·lules musculars llises.

La manca de CCR2 podria haver afectat el desenvolupament d'hiperplàsia intimal de forma indirecta. Sabem que els ratolins CCR2 KO tenen nivells més elevats de MCP-1. L'efecte de MCP-1 sobre la proliferació de cèl·lules musculars llises és controvertit, ja que en estudis previs s'ha demostrat tant un efecte inhibitori com estimulador a aquest nivell (Ikeda i col, 1995; Porreca i col, 1997). És possible que en els ratolins CCR2 KO s'hagi produït un increment local de MCP-1, que hagi causat una menor resposta proliferativa.

Aquest treball posa de manifest que CCR2 és un mediador central de la resposta de la paret vascular a la lesió. Les troballes d'aquest estudi poden contribuir al desenvolupament d'estratègies terapèutiques d'inhibició de quimioquines i els seus receptors per al control i prevenció de la restenosi en l'intervencionisme coronari.

### 3.4. SUBPROJECTE 4

#### **EFFECTE DE L'ANTIINFLAMATORI NO ESTEROIDAL SULINDAC A LA HIPERPLÀSIA INTIMAL EN UN MODEL MURÍ HIPERLIPIDÈMIC**

---

Una limitació important dels models experimentals de restenosi més emprats és la dificultat per reproduir el context lipídic en que es desenvolupa l'aterosclerosi i la restenosi en humans. La disponibilitat de models murins d'aterosclerosi, com el ratolí apoE knockout (apoE ko), ens ofereix la possibilitat d'estudiar l'efecte d'estratègies terapèutiques en situació d'hiperlipidèmia. Per això, en el tercer subprojecte s'ha analitzat l'efecte de l'antiinflamatori no esteroïdal sulindac a la hiperplàsia intimal en ratolins

apoE KO i controls salvatges.

En presència d'hipercolesterolèmia, la lesió arterial induïx una resposta proliferativa molt més marcada que en animals control no hipercolesterolèmics. Aquest fet és clínicament rellevant, ja que la major part dels pacients sotmesos a procediments de revascularització coronària tenen hipercolesterolèmia associada. L'augment de l'àrea intimal va associat a canvis qualitius en la composició de la lesió: hipocel.lularitat (en probable relació a més síntesi de matriu extracel.lular), presència més marcada de macròfags i cristalls de colesterol. Les lesions intimals observades en ratolins salvatges pràcticament no contenen macròfags i les cèl.lules musculars llises són el component predominant.

El tractament amb sulindac va reduir en un 70% la formació neointimal tant en ratolins apoE KO com en ratolins salvatges, de forma independent de la hiperlipidèmia. En els ratolins apoE KO, sulindac va inhibir la infiltració per macròfags i la formació de cristalls de colesterol en la neointima, malgrat nivells de colesterol mig de 1500 mg/dL.

El macròfag és un element clau en el desenvolupament de restenosi i en humans, el grau d'infiltració de macròfags en espècimens d'aterectomia és un predictor de restenosi i d'esdeveniments cardiovasculars (Moreno i col, 1996). Els macròfags secreten gran quantitat de factors que estimulen la proliferació i migració de les cèl.lules musculars llises, pel que sulindac, al interferir amb la infiltració per monòcits/macròfags, podria haver inhibit també l'activació de les cèl.lules musculars llises. Un altre mecanisme que explicaria un efecte directe de sulindac és a través de la inhibició de l'activació del NF- $\kappa$ B<sup>1</sup> que és una important via de regulació de la resposta cel.lular a situacions d'estrès i de la proliferació cel.lular (Yamamoto i col, 1999). Aquest mecanisme explicaria les propietats antiinflamatòries i antiproliferatives de sulindac. Estudis previs han demostrat també que sulindac afavoreix l'apoptosi *in vitro* i *in vivo* (Shiff i col, 1995).

Una altra possibilitat és que l'efecte inhibidor de la hiperplàsia intimal



de sulindac hagi estat mitjançat per una inhibició de la ciclooxigenasa. Donat que el tractament amb àcid acetilsalicílic (tot i tractar-se d'un inhibidor no selectiu de la ciclooxigenasa) no ha induït cap canvi en l'àrea neointimal o la composició de la lesió respecte els controls, aquest mecanisme és poc probable.

En resum, la hiperlipidèmia és un factor amb gran impacte sobre el desenvolupament d'hiperplàsia intimal. Sulindac redueix el desenvolupament d'hiperplàsia intimal en aquest model de lesió arterial a través de mecanismes antiinflamatoris, antiproliferatius i pro-apoptòtics i podria ser un agent farmacològic útil en el tractament i prevenció de la restenosi.

## DISCUSSIÓ CONJUNTA

---

Els models experimentals d'angioplàstia i altres mètodes d'estudi dels processos de reparació vascular han estat fonamentals pel coneixement dels mecanismes cel·lulars que porten al desenvolupament de la hiperplàsia intimal i la restenosi. Actualment, el desenvolupament d'animals genèticament modificats ens permet reproduir les característiques de la malaltia ateroescleròtica humana i la resposta vascular a la lesió. Això ens permetrà explorar en profunditat la implicació de factors específics a nivell cel·lular i molecular i afavorirà el disseny d'estratègies terapèutiques.

Vist en conjunt, aquest projecte representa la integració de la enginyeria genètica, representada en els models murins d'ateroesclerosi i de modulació del cicle cel·lular i els mecanismes de resposta a la lesió vascular. Els resultats derivats d'aquestes investigacions poden portar al desenvolupament d'estratègies terapèutiques de prevenció de la restenosi post-intervencionisme coronari a través del control dels mecanismes inflamatoris i la proliferació cel·lular.

A la llum de les múltiples vies d'interacció intra- i inter-cel·lulars i la redundància que hi ha en tots els processos biològics, sembla poc

probable que una estratègia dirigida a modificar una única via o component tingui èxit en el tractament de la restenosi. El més probable és que el control de la restenosi s'assoleixi mitjançant estratègies que abarquin varies de les diverses vies implicades en aquest procés multifactorial.

## **4 — CONCLUSIONS**

## SUBPROJECTE 1

- El model de denudació endotelial transluminal de l'artèria femoral en el ratolí és reproduïble i resulta en una adequada formació d'hiperplàsia intimal als 28 dies post-lesió arterial i té una seqüència temporal de desenvolupament d'hiperplàsia intimal similar a la descrita en models animals superiors, sense objectivar-se diferències de gènere en la resposta proliferativa.
- Aquest model reproduïx els esdeveniments inflamatoris de la fase aguda que s'han descrit en l'intervencionisme coronari en humans, amb una marcada adhesió de neutròfils a la superfície luminal juntament amb l'expressió de ICAM-1, VCAM-1, P-selectina i micropartícules plaquetàries, d'origen molt probablement circulatori.

## SUBPROJECTE 2

- p27 té un paper regulador de la proliferació cel.lular durant la resposta a la lesió vascular. En la fase més tardana de la resposta a la lesió, es detecta un marcat increment en l'expressió de p27 a la paret arterial en relació amb el descens progressiu de l'índex proliferatiu fins a assolir els nivells basals.
- L'absència de p27 no altera la formació d'hiperplàsia intimal en ratolins p27 KO. La regulació positiva d'altres inhibidors de les quinases dependents de les ciclines, com p21 o p16, podria compensar el dèficit de p27.
- Rapamicina redueix la formació d'hiperplàsia intimal en resposta a la denudació de l'artèria femoral en un 50% en ratolins p27 KO així com en ratolins salvatges *in vivo* i inhibeix d'un 40 al 60% la síntesi d'ADN en cèl.lules musculars llises p27 KO i salvatges *in vitro*.
- L'efecte inhibidor de rapamicina sobre la formació d'hiperplàsia intimal *in vivo* és independent de p27, i, *in vitro*, rapamicina actua mitjançant una

disminució de la proliferació i un increment de l'apoptosi.

### **SUBPROJECTE 3**

- La infiltració leucocitària de la paret vascular després de la lesió té gran rellevància en la regulació de la proliferació i migració de cèl.lules musculars llises.
- En el ratolí normolipèmic, la deficiència en CCR2, el receptor de MCP-1, redueix la resposta proliferativa a la lesió arterial.

### **SUBPROJECTE 4**

- La hiperlipidèmia és un factor amb gran impacte sobre el desenvolupament d'hiperplàsia intimal. Sulindac inhibeix la infiltració per macròfags de la paret arterial i la formació de cristalls de colesterol a la neoíntima en ratolins apoE KO malgrat nivells de colesterol molt elevats.
- Sulindac redueix en un 70% la formació neointimal en ratolins apoE KO i en ratolins salvatges, de forma independent de la hiperlipidèmia. Aquest efecte és conseqüència de mecanismes d'acció antiinflamatoris, antiproliferatius i pro-apoptòtics.

## **5 — BIBLIOGRAFIA**

1. Agrawal D, Hauser P, McPherson F, Dong F, García A, Pledger WJ. Repression of p27Kip1 synthesis by platelet-derived growth factor in BALB/c3T3cells. *Mol Cell Biol* 16:4327–4336.
2. Badimon JJ, Fernández Ortiz A, Meyer B, Mailhac A, Fallon JT, Falk E, Badimón L, Chesebro JH, Fuster V. Different response to balloon angioplasty of carotid and coronary arteries: effects on acute platelet deposition and intimal thickening. *Atherosclerosis* 1998;140:307–314.
3. Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, Pomerance A, Maclouf J, Creminon C, Yacoub MH, Polak JM. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:646–655.
4. Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, et al. TGF- $\beta$  induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 1990;63:515–524.
5. Bauters C, Lablanche J, McFadden E, Hamon M, Bertrand M. Angioscopic thrombus is associated with a high risk of restenosis. *Circulation* 1995;92:2473–2479.
6. Bayes-Genis A, Campbell JH, Carlson PJ, Holmes DR Jr, Schwartz RS. Macrophages, myofibroblasts and neointimal hyperplasia after coronary artery injury and repair. *Atherosclerosis* 2002;163:89–98.
7. Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res* 1996;78:38–43.
8. Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, Boyle JJ, Weissberg PL. Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from

- atherosclerotic plaques. *Circ Res* 1998;82:704–712.
9. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894–897.
  10. Braun-Dullaeus RC, Mann MM, Dzau V. Cell cycle progression. New therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* 1998;98:82–89.
  11. Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2002;105:1816–1823.
  12. Busse R, Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1990;275:87–90.
  13. Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, De Mol M, Bouche A, van den Oord JJ, Kockx M, Collen D. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol* 1997;150:761–776.
  14. Casaccia-Bonnelil, Hardy RJ, Teng KK, Levine JM, Koff A, Chao MV. Loss of p27<sup>Kip1</sup> function results in increased proliferative capacity of oligodendrocyte progenitors but unaltered timing of differentiation. *Development* 1999;126:4027–4037.
  15. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation* 1992;86:723–729.
  16. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morave-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Singerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27 Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997;3:227–230.



17. Charo IR. CCR2: from cloning to the creation of knockout mice. *Chem Immunol* 1999;72:30–41.
18. Chen D, Krasinski K, Chen D, Sylvester A, Chen J, Nisen P, Andrés V. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27<sup>Kip1</sup>, an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest* 1997;99:2334–2341.
19. Cipollone F, Marini M, Fazia M, Pini B, Iezzi A, Reale M, Paloscia L, Materazzo G, D'Annunzio E, Conti P, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:327–334.
20. Clowes AW, Karnovsky MJ. Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature* 1977;265:625–626.
21. Clowes AW. Intimal hyperplasia and graft failure. *Cardiovasc Pathol* 1993;2:S179–186.
22. Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement for p27<sup>Kip1</sup> for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 1996;272:877–880.
23. Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodieci P, Osman I, Millard SS, Gaudin PB, Fazzari M, Zhang ZF, Massague J, Scher HR. Distinct altered patterns of p27<sup>KIP1</sup> gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1284–1291.
24. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991;68:450–456.
25. Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *British Journal of Surgery* 1994;81:1254–1269.

26. Davies MG, Hagen P-O. Structural and functional consequences of bypass grafting with autologous vein. *Criobiology* 1994;31:63-70.
27. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999;143:205-211.
28. Doherty TM, Shah PK, Rajavashisth T. Cellular origins of atherosclerosis: toward ontogenetic endgame. *FASEB J* 2003;17:1-6.
29. Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation* 2000;101:2290-2295.
30. Doonerkamp FNG, Brost C, Post MJ. Endothelial cell recoverage and intimal hyperplasia after endothelium removal with or without smooth muscle cell necrosis in the rabbit carotid artery. *J Vasc Res* 1996;33:146-155.
31. Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin . *Life Sci* 1996;58:373-395.
32. Falk E, Fernández-Ortiz A. Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol* 1995;75:3B-11B.
33. Fernández-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1562-1569.
34. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27<sup>Kip1</sup>-deficient mice. *Cell* 1996;85:733-744.
35. Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-673.

36. Finking G, Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885–1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1997;135:1–7.
37. Gallo R, Chesebro JG, Badimon L, Fuster V, Badimon JJ. Restenosis after coronary angioplasty: Basic mechanisms underlying cellular proliferation. *Cardiol Rev* 1996;4:146–152.
38. Gallo R, Padurean A, Toschi V, Bichler J, Fallon JT, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ. Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation* 1998;97:581–588.
39. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx SO, Roque M, Adelman S, Chesebro JH, Fallon JT, Fuster V, Marks AR, Badimon JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 1999;2164–2170.
40. Gao X, Kemper A, Popko B. Advanced transgenic and gene-targeting approaches. *Neurochemical Res* 1999;24:1181–1188.
41. Giardiello FM, Yanh VW, Hylind LM, Krush AJ, Petersen GM, Trimbath JD, Piantadosi S, Garrett E, Geiman DE, Hubbard W, Offerhaus GJ, Hamilton SR. Primary prevention of familiar adenomatous polyposis with sulindac. *N Engl J Med* 2002;346:1054–1059.
42. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992;90:456–461.
43. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2311–2315.
44. Gimbrone MA. Vascular endothelium in health and disease. In: Haber E ed.

- Molecular Cardiovascular Medicine. Scientific American, New York, 1995, pp.49–61.
45. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte Chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* 1999;72:7–29.
  46. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998;2:275–281.
  47. Hansson GK, Holm J. Interferon-gamma inhibits arterial stenosis after injury. *Circulation* 1991;84:1266–1272.
  48. Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J* 1992;12:4251–4259.
  49. Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS, Abraham RT, Houghton PJ. Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* 1999;59:886–894.
  50. Igotz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986;261:4337–4345.
  51. Ikeda U, Okada K, Ishikawa S, Saito T, Kasahara T, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein 1 inhibits growth of rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995;268:H1021–H1026.
  52. Inoue T, Sakai Y, Fujito T, Hoshi K, Hayashi, T, Takayanagi K, Morooka S. Clinical significance of neutrophil adhesion molecules expression after coronary angioplasty on the development of restenosis. *Thromb Haemost* 1998;79:54–58.
  53. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and

- smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1667–87.
54. Isoda K, Shiigai M, Ishigami N, Marsuki T, Horai R, Nishikawa K, Kusuhara M, Nishida Y, Iwakura Y, Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation* 2003;108:516–518.
55. Jang Y, Guzman LA, Lincoff AM, Gottsauner-Wolf M, Forudi F, Hart CE, Courtman DW, Ezban M, Ellis SG, Topol EJ. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation* 1995;92:3041–3050.
56. Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation* 1994;89:2809–2815.
57. Kamijikkoku K, Murohara T, Tayama S, Matsuyama K, Honda T, Ando M, Hayasaki K. Acute myocardial infarction and increased soluble intercellular adhesion molecule-1: a marker of vascular inflammation and a risk of early restenosis? *Am Heart J* 1998;136:231–236.
58. Kenagy R, Hart C, Stetler-Stevenson W, Clowes A. Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation* 1997;96:3555–3560.
59. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27<sup>Kip1</sup>. *Cell* 1996;85:721–732.
60. Kiyokawa H, Koff A. Roles of cyclin-dependent kinase inhibitors: Lessons from knockout mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;227:105–120.

61. Klagsbrun M. Vascular cell growth factor and the arterial wall. In: Haber E ed. *Molecular Cardiovascular Medicine*. Scientific American, New York, 1995, pp.63–78.
62. Kocher O, Skalli O, Sampson–Bloom W, Gabbiani G. Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental intimal thickening. *Lab Invest* 1984;50:645–652.
63. Kritchevsky D, Nicolosi RJ. Atherosclerosis in nonhuman primates. In: Simon DI, Rogers C, ed. *Vascular disease and injury. Preclinical research*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2001, pp.193–204.
64. Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2238–2244.
65. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 1997;186:1757–1762.
66. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:12053–12058.
67. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859–873.
68. Lemos PA, Lee CH, Degertekin M, Saia F, Tanabe K, Arampatzis CA, Hoyer A, van Duuren M, Sianos G, Smits PC, de Feyter P, van der Giessen WJ, van Domburg RT, Serruys PW. Early outcome after sirolimus–eluting stent implantation in patients with acute coronary syndromes: insights from the Rapamycin–Eluting Stent Evaluated at Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) registry. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2093–2099.

69. Lin SJ, Yen HT, Chen YH, Ku HH, Lin FY, Chen YL. Expression of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in oxLDL-treated human aortic smooth muscle cells and in the neointima of cholesterol-fed endothelia-denuded rabbits. *J Cell Biochem* 2003;88:836-847.
70. Lindner V, Fingerle J, Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circ Res* 1993;73:792-796.
71. Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3739-3743.
72. Lindner V, Reidy MA. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by smooth muscle cells and endothelium in injured rat arteries: an en face study. *Circ Res* 1993;73:589-595.
73. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997;3:231-234.
74. Luo Y, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, Massagué J, Marks A. Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27<sup>Kip1</sup>. *Mol Cell Biol* 1996;16:6744-6751.
75. Luster AD. Chemokines- chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-445.
76. MacLellan WR, Majesky MW. Cell cycle regulators in vascular disease. *Circulation* 1997;96:1717-1719.
77. Majesky MW, Schwartz SM. An origin for smooth muscle cells from endothelium?. *Circ Res* 1997;80:601-603.
78. Majzoub JA, Muglia LJ. Knockout mice. *N Engl J Med* 1996;334:904-907.
79. Malik N, Francis SE, Holt CM, Gunn J, Thomas GL, Shepherd L,

- Chamberlain J, Newman CM, Cumberland DC, Crossman DC. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation* 1998;98:1657–65.
80. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin–FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Cir Res* 1995;76:412–417.
81. Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, Bowen–Pope DF, Seifert RA, Coats S, Hawkins SM, Clowes AW. Matrix metalloproteinase–9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 1999;85:1179–1192.
82. McNamara DB, Bedi B, Aurora H, Tena L, Ignarro LJ, Kadowitz PJ, Akers DL. L–Arginine inhibits balloon catheter–induced intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:291–296.
83. Merhi Y, Provost P, Chauvert P, Théorêt, Phillips ML, Latour JG. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:372–377.
84. Miyazaki T, Liu Z, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, Barsoumian EL, Perlmutter RM, Taniguchi T. Three distinct IL–2 signaling pathways mediated by bcl–2, c–myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 1995;81:223–231.
85. Moreno PR, Bernardi VH, López–Cuéllar 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;94:3090–3097.
86. Moreno PR, Bernardi VH, López–Cuéllar 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;94:3098–3102.
87. Mori E, Komori K, Yamaoka T, Tanii M, Kataoka C, Takeshita A, Usui M, Egashira K, Sugimachi K. Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2002;105:2905–2910.
  88. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest* 1998;101:1225–1232.
  89. Muthukkumar S, Ramesh TM, Bondada S. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation* 1995;60:264–270.
  90. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE- deficient mice develop all lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994;14:133–140.
  91. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27kip1 display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cel* 1996;85:707–720.
  92. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schomig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:819–824.
  93. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000;190:300–309.
  94. Niemann-Jönsson A, Ares MPS, Zhong-Qun Y, Bu DX, Nordin G, Brånén L, Pörn-Ares I, Hultgårdh A, Nilsson J. Increased rate of apoptosis in intimal arterial smooth muscle cells through endogenous activation of TNF

- receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1909–1924.
95. Nourse J, Firpo E, Flanagan MW, Meyerson M, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM. Rapamycin prevents IL-2 mediated elimination of the cyclin CDK inhibitor, p27<sup>Kip1</sup>. *Nature* 1994;372:570–573.
96. Oguchi S, Dimayuga P, Zhu J, Chyuk Y, Yano J, Shah PK, Nilsson J, Cercek B. Monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 inhibits neointimal formation after periadventitial carotid artery injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1729–1736.
97. Okazaki H, Majesky MW, Harker LA, Schwartz SM. Regulation of platelet-derived growth factor ligand and receptor gene expression by alpha-thrombin in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992;71:1285–1293.
98. Palinski W, Napoli C, Reaven P. Mouse models of atherosclerosis. In Simon DI and Rogers C ed. *Contemporary Cardiology: Vascular Disease and Injury: Preclinical Research*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2001, pp 149–174.
99. Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, Gluzband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, Crow MT. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Cir Res* 1994;75:41–54.
100. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* 1997;95:981–987.
101. Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, Hesselbacher SE, Czarnik AC, Manka D, Vestweber D, Ley K, Sarembock IJ. Single injection of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody blocks neointima formation after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2003;107:2244–2249.

102. Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM. Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization. *J Clin Invest* 1993;91:1469–1480.
103. Plump AS, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992;71:343–353.
104. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994;78:59–66.
105. Poon M, Cohen J, Siddiqui Z, Fallon JT, Taubman MB. Trapidil inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage accumulation after balloon arterial injury in rabbits. *Lab Investigation* 1999;79:1369–1373.
106. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 1996;98:2277–2283.
107. Porreca E, Di Febbo C, Reale M, Castellani ML, Baccante G, Barbacane R, Conti P, Cuccurullo F, Poggi A. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 1997;34:58–65.
108. Powell JS, Clozel JP, Muller RK, et al. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 1989;245:186–188.
109. Reape TJ, Groot PHE. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;147:213–225.
110. Reidy MA, Irvin C, Lindner V. Migration of arterial wall cells. Expression of plasminogen activators and inhibitors in injured rat arteries. *Circ Res*

- 1990;78:405–414.
- 111.Reilly CF, Kindy MS, Brown KE, Rosenberg RD, Sonenshein GE. Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *J Biol Chem* 1989;264:6990–6998.
- 112.Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor- $\beta$ s. Peptide Growth Factors and Their Receptors, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 95/I. Sporn MB, Roberts AB, Eds Springer-Verlag, Berlin, 1990, p 491.
- 113.Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:10134–10139.
- 114.Rolfe BE, Campbell JH, Smith NJ, Cheong MW, Campbell GR. T lymphocytes affect smooth muscle cell phenotype and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1204–1210.
- 115.Roqué M, Reis ED, Fuster V, Padurean A, Fallon JT, Taubman MB, Chesebro JH, Badimon JJ. Inhibition of tissue factor reduces thrombus formation and intimal hyperplasia after porcine coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2303–2310.
- 116.Roqué M, Cordon-Cardo C, Fuster V, Reis ED, Drobnjak M, Badimon JJ. Modulation of apoptosis, proliferation, and p27 expression in a porcine coronary angioplasty model. *Atherosclerosis* 2000;153:315–322.
- 117.Roqué M, Reis ED, Roig E. Role of smooth muscle cell migration and proliferation in allograft vascular disease. *Transplantation Proc* 2002;34:333–334.
- 118.Ross JS, Stagliano NE, Donovan MJ, Breitbart RE, Ginsburg GS. Atherosclerosis and cancer: common molecular pathways of disease development and progression. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:271–292.
- 119.Schwartz R, Huber K, Murphy J, Edwards W, Camrud A, Vlietstra R, Holmes

- DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267–274.
- 120.Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powel–Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME. Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3593–3601.
- 121.Serruys P, Herrman J, Simon R, Rutsch W, Bode C, Laarman G, van–Dijk R, for the HELVETICA Investigators. A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after PTCA. *N Engl J Med* 1995;333:757–763.
- 122.Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149–1163.
- 123.Shiff SJ, Qiao L, Tsai L, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-20 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96:491–503.
- 124.Shimokado K, Yokota T, Kato N, Kosaka C, Sasaguri T, Masuda J, Ogata J, Numano F. Bidirectional regulation of smooth muscle cell proliferation by IFN-gamma. *J Atheroscler Thromb* 1994;Suppl 1:S29–33.
- 125.Shuldiner AR. Transgenic animals. *N Engl J Med* 1996;334:653–655.
- 126.Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J* 1995;16:160–170.
- 127.Simon DI, Dhen Z, Seifert P, et al. Decreased neointimal formation in Mac-1(–/–) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *J Clin Invest* 2000;105:293–300.
- 128.Snow AD, Bolender RP, Wight TN, Clowes AW. Heparin modulates the composition of the extracellular matrix domain surrounding arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1990;137:313–330.

- 129.Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: A quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001;103:192-195.
- 130.Stein CS, Fabry Z, Murphy S, Hart MN. Involvement of nitric oxide in IFN-gamma-mediated reduction of microvessel smooth muscle cell proliferation. *Mol Immunol* 1995;32:965-973.
- 131.Sullivan TF Jr, Karas RH, Aronovitz M, Falks GT, Ziar JP, Smith J, O'Donnell TF Jr, Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. *J Clin Invest* 1995;96:2482-2488.
- 132.Sun J, Marx SO, Chen H, Poon M, Marks AR, Rabbani LE. Role for p27 Kip1 in vascular smooth muscle cell migration. *Circulation* 2001;103:2967-2972.
- 133.Tanaka H, Sukhova G, Schwartz D, Libby P. Proliferating arterial smooth muscle cells after balloon injury express TNF- $\alpha$  but not interleukin-1 or basic fibroblast growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:12-18.
- 134.Tanner FC, Yang Z, Duckers E, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circ Res* 1998;82:396-403.
- 135.Taubman MB, Rollins BJ, Poon M, Marmur J, Green RS, Berk BC, Nadal-Ginard B. JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992;70:314-325.
- 136.Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Domenico J, Gelfand EW. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *J Cell Physiol*

- 1993;154:7–15.
137. The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997;336:1689–1696.
138. Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT. In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors. *Lab Invest* 1996;75:451–461.
139. Usui M, Egashira K, Ohtani K, Kataoka C, Ishibashi M, Hiasa K, Katoh M, Zhao Q, Kitamoto S, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. *FASEB J* 2002;16:1838–1840.
140. Vane JR. Towards a better aspirin. *Nature* 1994;367:215–216.
141. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1769–1776.
142. Werner H, Woloschak M, Stannard B, Shen-Orr Z, Roberts CTJ, LeRoith D. The insulin-like growth factor-1 receptor: molecular biology, heterogeneity and regulation. In: LeRoith D, ed. *Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*. 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991:17–47.
143. Wysocki SJ, Zheng MH, Smith A, Lamawansa MD, Iacopetta BJ, Robertson TA, Papadimitriou JM, House AK, Norman PE. Monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in injured pig artery coincides with early appearance of infiltrating monocyte/macrophages. *J Cell Biochem* 1996;62:303–313.
144. Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF- $\kappa$ B<sup>1</sup> pathway. *J Biol Chem* 1999;274:27307–27314.
145. Zempo N, Kenagy R, Au Y, Bendeck M, Clowes M, Reidy M, Clowes AW. Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-

injured rat carotid artery. J Vasc Surg 1994;20:209-217.