

## **1. INTRODUCCIÓ**



## I. PATOGÈNIA DE L'ATEROSCLEROSI

L'arteriosclerosi és un procés multifactorial que cursa amb l'engruiximent i enduriment de les artèries amb la consegüent reducció de la llum del vas. El desenvolupament de la malaltia efecte a l'arbre arterial de manera difosa, lesionant fonamentalment les artèries que irriguen el cor (coronàries), el cervell (caròtides, vertebrals i cerebrals), i les extremitats inferiors (aorta, ilíacques i femorals). Quan afecta a artèries de mitjà i gran calibre és anomenada aterosclerosi i es caracteritza per lesions circumscrites a la paret arterial anomenades plaques d'ateroma, formades principalment per lípids, teixit fibrós, cèl·lules musculars llises (CML) i cèl·lules inflamatòries. L'aterosclerosi generalment es complica per la ruptura de la placa i la formació d'un trombus en la seva superfície. La presència del trombus potencia l'obstrucció del vas, induint l'aparició d'isquèmia o necrosi de la zona irrigada pel vas obstruït, fet responsable de les manifestacions clíniques. Així doncs, també s'empra el terme de malaltia aterotrombòtica constatant la implicació dels dos processos: aterosclerosi i trombosi.

Les malalties vasculars són la primera causa de mortalitat a Europa, Estats Units i gran part de l'Àsia (Breslow JL 1997). Cal dir però, que la malaltia aterotrombòtica forma part de l'espècie humana des dels seus inicis, però no ha estat fins al segle XX que la incidència d'aquesta malaltia ha assolit una magnitud epidèmica. La principal causa de l'increment en la incidència de l'aterosclerosi ha estat l'augment en l'esperança de vida (incrementant les malalties associades a l'envelliment), però sobretot hi ha influït el substancial canvi en l'estil de vida: els hàbits alimentaris, el grau d'activitat física, l'estrès, ....

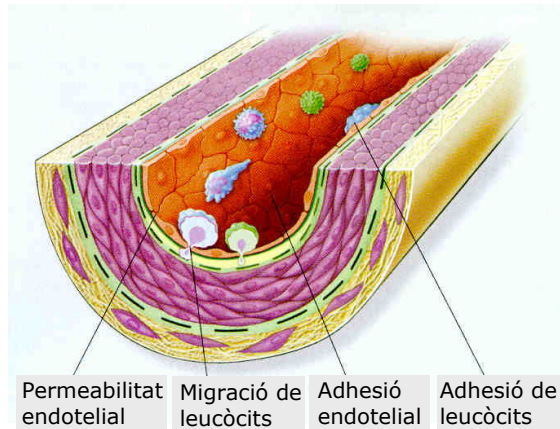
S'han descrit un gran nombre de factors de risc que contribueixen a la iniciació i/o progressió del procés ateroscleròtic. Entre ells es troben: nivells plasmàtics elevats de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), nivells elevats de lipoproteïna (a) (Lp(a)), hiperhomocisteïnèmia, obesitat, hipertensió, tabaquisme, diabetis, manca d'activitat física, resposta immune a processos infecciosos de virus o bacteris com *C. pneumoniae*. Tot i això, existeixen altres factors de risc, que malgrat no poder ser modificats, són de gran importància, com l'edat, el sexe, els antecedents familiars i determinats marcadors genètics.

L'associació de l'aterosclerosi a diferents factors de risc generà la hipòtesi de "resposta al dany" que pretén explicar la gènesi i el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques. Segons aquesta hipòtesi, un dels primers esdeveniments que porten a la

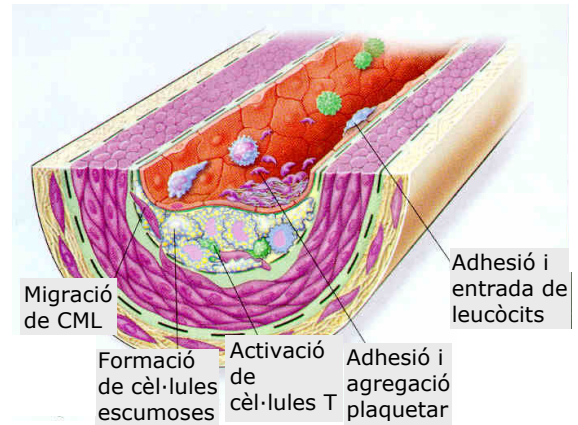
---

iniciació de l'aterogènesi és l'acumulació de LDL en la paret vascular i la seva modificació. Les LDL modificades alteren la funcionalitat de l'endoteli amb la conseqüent modificació de les propietats antiaterogèniques d'aquest. A més, incrementen l'expressió de les molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials, afavorint així, un major reclutament de monòcits circulants i facilitant la seva migració a l'íntima arterial (Ross R 1993). Els monòcits infiltrats es diferencien a macròfags (MØ) degut a l'estimulació que exerceixen les LDL modificades i les diferents citoquines secretades per les cèl·lules endotelials, les CML i els limfòcits. D'altra banda, la retenció de LDL a la paret vascular i la seva captació pels MØ i les CML, a través de diferents receptors, facilita la formació de cèl·lules escumoses. Tot i que l'acumulació de cèl·lules escumoses en l'íntima arterial és una característica dels estadis inicials (estria de greix) de la malaltia, aquestes cèl·lules també contribueixen a l'evolució de la lesió ateroscleròtica (Brown MS 1983). Si bé la progressiva acumulació lipídica és un dels processos claus en el desenvolupament de la lesió, també ho és la migració i proliferació de les CML, processos induïts per múltiples factors de creixement, citoquines i altres substàncies produïdes per les cèl·lules endotelials, les CML, els MØ i els limfòcits T (Ross R 1993). Així doncs, l'increment en el contingut lipídic de la lesió i la resposta fibroproliferativa resultat de la migració i proliferació cel·lulars porten a la formació de plaques ateroscleròtiques més complexes que, a llarg termini, cursen amb símptomes isquèemics. Observacions clíniques i patològiques evidencien que en el desenvolupament dels símptomes aguts és més important la composició de la placa ateroscleròtica (tipus de placa) que el grau d'estenosi (tamany de la placa) que aquesta provoca (Falk E 1995, Jukema JW 1995, Pitt B 1995, Fernández A 1994). Estudis histològics han demostrat que les plaques estables es caracteritzen per tenir poc contingut lipídic i una gruixuda càpsula fibrosa rica en CML i matriu extracel·lular (MEC) (Libby P 1998, Fernandez A 1994, Lafont A 1998). Les CML migren de la mitja cap a l'íntima arterial on sofreixen canvis fenotípics que les porten a incrementar la secreció de MEC, responsable de l'estabilitat de les plaques. Mentre que, les plaques amb tendència a trencar-se (plaques vulnerables) estan formades per un gran nucli lipídic i una prima coberta fibrosa que conté poca proliferació de CML, escassa quantitat de col·lagen i un important infiltrat inflamatori (Kullo IJ 1998). Aquest nucli està format per lípid intracel·lular, internalitzat pels MØ i les CML, i per lípid extracel·lular, procedent de la retenció de les lipoproteïnes circulants i/o del que és alliberat per les cèl·lules escumoses que pateixen

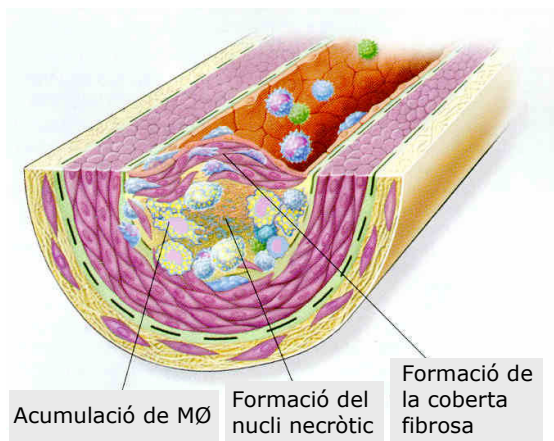
**Figura 1. Progressió de la lesió ateroscleròtica** (Adaptada de Ross R 1999)



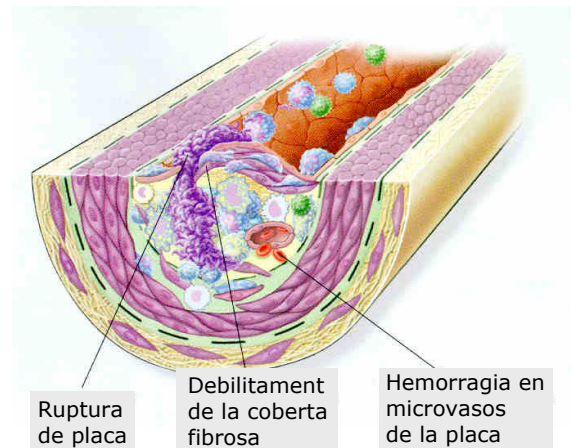
**LESIÓ INICIAL:** Alteració de l'endoteli i infiltració de LDL. Increment en l'expressió de molècules d'adhesió que afavoreix l'adhesió de leucòcits i la seva migració a l'íntima arterial. Acumulació de lípids i MØ en l'íntima arterial. Canvis microscòpics sense lesió en el teixit.



**ESTRIA DE GREIX (Lesions tipus I-II) i PLACA FIBROSA (Lesions tipus III-IV):** Retenció i modificació de les LDL en l'espai subendotelial. Acumulació de cèl·lules escumoses derivades de la captació de LDL modificades pels MØ i CML. Les plaques evolucionen incrementant l'acumulació de lípid extracel·lular, l'adhesió plaquetària, i la secreció de factors de creixement que estimulen la migració de les CML. Microscòpicament s'evidencia el desordre i la lesió tissular que progressa massivament en l'íntima.



**LESIÓ AVANÇADA: (Lesions tipus V)** Augmenta la proliferació i migració de les CML que rodegen el nucli lipídic. Incrementa la secreció de MEC per les CML portant a un engruiximent de la coberta fibrosa entorn el nucli lipídic. Aquestes plaques acostumen a ser asimptomàtiques.



**RUPTURA DE LA PLACA:** L'activitat de determinats enzims com les MMPs, secretades pels MØ activats, contribueix a la ruptura de la coberta fibrosa i a la formació del trombus mural. S'obstrueix parcial o completament la llum del vas, donant lloc a manifestacions clíniques agudes. La reorganització del trombus per teixit connectiu i posteriors dipòsits de calci evolucionarà augmentant la oclusió del vas amb l'aparició de manifestacions isquèmiques.

---

necrosi. De fet, l'evolució de les lesions cap a plaques avançades porta a una davallada en el contingut de CML i un increment en el contingut lipídic el qual estimula la secreció de metal·loproteases (MMPs), per part dels MØ, que degraden la MEC que conforma la coberta fibrosa, afavorint la ruptura de la placa (Shah PK 1995, Libby P 1996). La ruptura o ulceració de les plaques inestables, procoagulants i protrombòtiques, provoca l'activació de plaquetes i la formació de trombus. Fet que pot desencadenar complicacions clíniques o contribuir al creixement de la placa de manera asimptomàtica (Badimon L 1992).

## **II. PAPER DE LES LIPOPROTEÏNES EN L'ATEROGÈNESI**

Com s'ha esmentat, la iniciació de la lesió ateroscleròtica es caracteritza per l'acumulació de lípid, principalment colesterol esterificat (CE), en la MEC de l'íntima arterial. Els lípids acumulats procedeixen fonamentalment de lipoproteïnes plasmàtiques, especialment LDL, que transporten aproximadament dos terços del colesterol plasmàtic total. Les LDL travessen l'endoteli mitjançant un gradient de concentració per un procés anomenat transcitosi que no està mediat per receptor.

### **II.1. Retenció de LDL**

Tot i que en la iniciació i progressió de l'aterosclerosi hi intervenen varis factors de risc, la "hipòtesi de resposta a la retenció" estableix que la retenció subendotelial de les lipoproteïnes-apoB plasmàtiques és necessària i alhora suficient per provocar la iniciació de l'aterogènesi (Williams KJ 1995, Glass CK, 2001, Skalen K 2002). La retenció de LDL en l'íntima arterial es veu modulada per factors sistèmics com la hipertensió i/o la hipercolesterolèmia que afavoreixen la penetració i retenció de les lipoproteïnes a l'íntima arterial (<sup>a,b</sup>Schwenke DC 1989, Nordestgaard BG 1994). Però cal destacar també el paper fonamental de la MEC, els components de la qual conformen una densa malla que facilita la unió i retenció de les LDL. Els principals components de la MEC que hi contribueixen són: el teixit connectiu (col·lagen, elastina, glucosaminoglicans (GAGs) i proteoglicans (PGs)) (<sup>a,b</sup>Camejo G 1993), elements estructurals (fibronectina, fibrina) (Cseh K 1989, Harpel PC 1989, Labat J 1990), enzims lipolítics, lipoproteïna lipasa (Eisenberg S 1992) i esfingomielinasa (SMasa) (Tabas I 1993, Schissel SL 1994). Alguns d'aquests components es

veuen incrementats durant la progressió de la lesió (veure *seccions II.3.3 i III.2*, on també s'aprofundeix en l'estructura de la MEC). D'altra banda és important esmentar el paper de les cèl·lules vasculars (CML i MØ) en la retenció de les LDL, doncs aquestes cèl·lules són responsables de la síntesi i secreció de la major part d'enzims i proteïnes presents en la paret vascular.

La "hipòtesi de resposta a la retenció" suggereix que l'acumulació de colesterol en l'íntima arterial és directament proporcional a la concentració de lipoproteïnes circulants (Proctor SD 2002). En artèries sanes existeix un equilibri entre les lipoproteïnes del plasma i les del fluid extracel·lular de l'íntima, fet que impedeix l'acumulació de lípid en l'artèria. Però en produir-se un desequilibri en aquest balanç, s'incrementa l'entrada i/o permeabilitat de les lipoproteïnes que evoluciona cap a una major interacció i/o retenció amb la MEC (Camejo G 1998). La retenció de les lipoproteïnes augmenta el seu temps de residència en l'íntima arterial incrementant així la susceptibilitat d'ésser modificades (veure *secció II.2*). La modificació de les lipoproteïnes evoluciona cap a l'acumulació de colesterol extracel·lular en forma d'agregats de lipoproteïnes (<sup>b</sup>Camejo G 1993, Guyton JR 1991, 1994) o d'estructures lipídiques vesiculars (Tabas I 1993) i, facilita l'acumulació intracel·lular, doncs incrementa la predisposició de les lipoproteïnes a ésser captades pels MØ i CML, transformant-les en cèl·lules escumoses (Guyton JR 1994, Camejo G 1998, Proctor SD 2002). D'altra banda, la presència de lipoproteïnes en la paret del vas pot alterar la funció endotelial així com l'estructura de la MEC, ja que pot modular l'expressió de determinats enzims que la degraden, influint així, en l'estabilitat de la placa ateroscleròtica. Per tant, la retenció de lipoproteïnes podria desencadenar directa o indirectament una sèrie de respostes moleculars i cel·lulars que influïrien en la iniciació i progressió de la lesió i en les seves complicacions.

## **II.2. Modificació de LDL**

S'ha descrit que les LDL natives (LDL<sub>n</sub>) no presenten característiques aterogèniques però les adquireixen en ésser modificades, ja que s'alteren les seves propietats físicoquímiques (Steinberg D 1983). Les LDL<sub>n</sub> són internalitzades per les cèl·lules vasculars mitjançant el receptor de les LDL (rLDL), l'expressió del qual és regulada a la baixa pels nivells intracel·lulars de colesterol (Brown MS 1986, Osborne TF 1985), així doncs, s'hipotetitza que l'acumulació intracel·lular de colesterol es donaria per la captació de lipoproteïnes modificades.

Com s'ha esmentat, la retenció de les LDL en l'íntima arterial afavoreix la seva modificació en interaccionar amb els components de la MEC, o bé per acció de determinats d'agents oxidants (lipoxigenases, mieloperoxidasa, radicals lliures,...), i per l'activitat enzims proteolítics (quimasa, triptasa, MMPs, trombina,...), enzims lipolítics (SMasa, fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), fosfolipasa C,...) i enzims hidrolítics (esterases). D'aquesta manera es donen determinats processos químics i/o estructurals que generen partícules de LDL agregades (LDLag), oxidades (LDLox), liposomes rics en colesterol no esterificat, grànuls de ceroid-lipofucsina i complexos d'apoB<sub>(LDL)</sub>-condroitin sulfat (<sup>a,b</sup>Hurt-Camejo E 1997, <sup>a,b</sup>Camejo G 1993, Öörni K 2000), que s'acumulen a l'íntima arterial (*taula I*).

**Taula I. Modificacions de les LDL**

Modificació LDL	Cèl·lules que les internalitzen	Presentes <i>in vivo</i>	Referències
Interacció amb PGs	MØ, CML	+	Yla-Herttuala S 1986 <sup>a,b</sup> Camejo G 1993
Glicosilació	MØ, CML	+	Witztum JL 1982 Hunt JV 1990
(4-HNE)-LDL	MØ	+	Jürgens G 1987 Hoff HF 1989
MDA-LDL	MØ	+	Fogelman AM 1980 Haberland ME 1988
Autoagregació	MØ, CML, acumulació extracel·lular	+	Khoo JC 1988 Öörni K 2000 Hevonoja T 2000
Carbamilació i maleilació	MØ	+	Weisgraber KH 1978
Desialilació	MØ, CML	+	Orehov AN 1991 Tertov VV 1993
Oxidació	MØ	+	Henriksen T 1981 Witztum JL 1993 Chisolm GM 1996
Activitat de l'anió superòxid	MØ, CML, CE, fibroblasts	+	Heinecke JW 1987 Steinbrecher UP 1988 Cathcart MK 1989
Activitat de grups tiols	MØ, CML, CE	+	Heinecke JW 1987, 1993 Sparrow CP 1993
Acetilació	MØ	-	<sup>b</sup> Goldstein JL 1979
Degradació per hidròlisi	acumulació extracel·lular	+	Chao FF 1992 Bhakdi S 1995
NEFA-LDL	MØ, CML	+	Rumsey SC 1995 Laughton CW 1988 Benítez S 2002

MØ: macròfags, CML: cèl·lules musculars llises, CE : cèl·lules endotelials, PGs : proteoglicans, (4-HNE)-LDL: LDL modificada amb 4-hidroxinonenal, MDA-LDL: LDL modificada amb malondialdehid, NEFA-LDL: LDL enriquida en àcids grassos no esterificats. +/- : presents o no *in vivo*.



## **II.3. Conseqüències de la modificació de LDL en la paret vascular**

### **II.3.1. Disfunció endotelial**

L'endoteli integra diverses funcions reguladores que contribueixen a mantenir l'homeostasi de la paret vascular. S'ha anomenat disfunció endotelial a qualsevol alteració de la fisiologia de l'endoteli que cursa amb la descompensació d'aquestes funcions. Un dels factors més rellevants que porten a l'alteració endotelial és la presència de concentracions aterogèniques de LDL o certes LDL modificades. Les LDL modificades incrementen l'expressió de molècules d'adhesió com E- i P-selectines, molècula-1 d'adhesió vascular (VCAM-1), molècules d'adhesió (ICAM-1,-2,-3) en la membrana de les cèl·lules endotelials que faciliten el reclutament dels monòcits circulants (Cushing 1990, Cybulsky MI 1991, Navab M 1991, Jang Y 1994, Vora DK 1994). Les LDL modificades també indueixen la secreció de citoquines (Williams KJ 2001) i de radicals lliures (Pritchard KA 1995). D'altra banda, la retenció de lipoproteïnes pot alterar més directament l'homeostasi vascular, ja que determinades LDL modificades (LDLox) poden resultar citotòxiques per les cèl·lules endotelials induint-los apoptosi (Sata M 1991); incrementen la permeabilitat endotelial (Langeler EG 1989, Rangaswamy S 1997, Gardner G 1999); generen una resposta disminuïda a la dilatació dependent d'endoteli (Zeicher AM 1991); influeixen en la protecció antiaterogènesi que exerceix l'endoteli, alterant el to vascular modificant els nivells d'òxid nítric (NO) (agent vasodilatador) (Vidal F 1998), i/o d'endotelina (potent vasoconstrictor) (Boulager CM 1992); i afavoreixen l'activitat protrombòtica mitjançant la inducció de factors implicats en el control de vies de coagulació (factor tissular (TF), inhibidor de l'activador del plasminogen tissular-1 (PAI-1),...) (Drake TA 1991, Weis JR 1991, Latron Y 1991) i la inducció de l'agregació plaquetària (Pedreño J 1994). Recentment, en el nostre grup hem demostrat que la hipercolesterolèmia sistèmica pot induir la disfunció endotelial per alteració de l'expressió de gens que són regulats mitjançant les proteïnes d'unió a elements regulats per esterols (SREBPs) (Rodríguez C 2001).

### **II.3.2. Formació de cèl·lules escumoses**

L'acumulació de lípid intracel·lular porta a la formació de l'estria de greix, primer estadi de la lesió. Les LDL modificades, en ésser captades per receptors no regulats a la baixa pel colesterol intracel·lular, indueixen la transformació de les cèl·lules vasculars en cèl·lules

escumoses. La formació de cèl·lules escumoses en la paret vascular pot derivar de monòcits que travessen l'endoteli i es diferenciïn a MØ o, especialment en plaques més avançades, deriven també de CML que migren de la mitja a l'íntima arterial (Brown MS 1983). Estudis *in vitro* han evidenciat que la captació de determinades LDL modificades porta a la transformació de les CML i MØ en cèl·lules escumoses (Brown MS 1979, <sup>b</sup>Goldstein JL 1979, Lougheed M 1996, Khoo JC 1998, Llorente-Cortés V 2000). Tot i això, s'ha descrit que l'acumulació lipídica intracel·lular en les CML requereix necessàriament de l'agregació de les LDL (Tertov VV 1992, 1989, Nermine A 1994).

Les concentracions intracel·lulars de colesterol lliure (CL) i CE estan altament regulades. El rLDL controla l'entrada de colesterol exogen i l'enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzim A reductasa (HMG-CoA reductasa) regula la síntesi endògena de colesterol. Donada la citotoxicitat del CL, aquest s'acumula en forma de CE per l'activitat de l'enzim acil-coenzim A: colesterol acil transferasa (ACAT). Quan el contingut de CL augmenta per sobre del líndia, s'inhibeix l'activitat del rLDL i de l'enzim HMG-CoA reductasa i s'activa l'enzim ACAT (Brown MS 1986). Cal dir però, que quan la síntesi endògena de colesterol està inhibida, en presència d'un alt contingut de colesterol intracel·lular, el CL pot continuar entrant a la cèl·lula per la captació de LDL modificades, d'aquesta manera s'estimula l'enzim ACAT i es dona una elevada acumulació intracel·lular de CE, indicador de la formació de cèl·lules escumoses.

Almenys quatre tipus de receptors s'han implicat en la captació de lípid arterial: receptors escombriaires (*scavenger*), el rLDL, la proteïna relacionada amb el rLDL (LRP) i el receptor de les lipoproteïnes de molt baixa densitat (rVLDL) (veure *secció IV*). La majoria de LDL modificades porten a una progressiva acumulació intracel·lular de CE, no únicament pel fet d'ésser captades per receptors que no es regulen a la baixa pel colesterol intracel·lular, sinó també perquè la majoria d'aquests receptors es veuen regulats a l'alça per les mateixes lipoproteïnes que transporten (Mehta JL 1998, Tsukamoto K 2002).

D'altra banda, l'excés de colesterol intracel·lular pot evolucionar cap a la mort per necrosi de les cèl·lules escumoses, fet que contribueix a incrementar el nucli lipídic acel·lular propi de les lesions avançades (Guyton JR 1994, 1996). Donat que les plaques ateroscleròtiques més riques en lípid presenten un major índex d'inestabilitat, i l'extensa presència de cèl·lules escumoses sembla ser una de les causes principals dels incidents

cardíacs (St. Clair R 1997), d'aquí l'interès per entendre el procés de formació de cèl·lules escumoses i la seva participació en la formació i ruptura de les plaques.

### **II.3.3. Síntesi i degradació de la matriu extracel·lular**

La MEC és responsable de les propietats mecàniques de la paret vascular i també està implicada en determinats processos biològics com l'adhesió, la regulació i proliferació cel·lular, i la interacció cèl·lula-cèl·lula. Cal dir també que juga un paper fonamental en les lesions avançades ja que la MEC forma una coberta fibrosa entorn al nucli lipídic que contribueix a l'estabilitat de les plaques ateroscleròtiques. Així doncs, és fonamental mantenir un adequat balanç entre la síntesi i degradació de la MEC. Determinats desordres vasculars afecten aquest balanç (incrementant o disminuint la síntesi de MEC) i poden afavorir al desenvolupament del procés ateroscleròtic. La retenció de LDL modificades és un d'aquests factors que afecten a la biosíntesi o degradació dels diferents components de la MEC.

Un dels principals components de la MEC que conforma la coberta fibrosa que recobreix les plaques d'ateroma és el col·lagen intersticial que procedeix de les CML arterials (Barnes MJ 1999, Leskinen MJ 2003). En aquest sentit el col·lagen exerceix un paper protector. S'ha descrit que la síntesi de col·lagen està incrementada durant la progressió de la lesió ateroscleròtica i especialment en les regions riques en lípids (Barnes MJ 1999). Estudis *in vivo* han demostrat que el col·lagen I i III es troba incrementat en la paret arterial d'animals hipercolesterolèmics (Xu C 2000) i la síntesi de nou de col·lagen intersticial té lloc en les regions ateroscleròtiques caracteritzades per contenir una alta deposició lipídica, fet que pot contribuir a la progressió de les lesions (Andreeva ER 1997). Però també es veu alterada la seva distribució al llarg de la paret, així el col·lagen tipus I de nova síntesi es distribueix principalment en l'íntima, la mitja més externa i l'adventícia (Xu C 2000) mentre que, el col·lagen tipus III de nova síntesi es troba uniformement distribuït per la paret, incloent l'adventícia. Dades que concorden amb els estudis *in vitro* on s'ha demostrat que les LDL modificades (LDL<sub>ox</sub>), a diferència de les LDL<sub>n</sub>, estimulen la producció de col·lagen en les CML en cultiu (Jimi S 1995, Bachem MG 1999). D'altra banda, el col·lagen tipus V també es troba incrementat en les plaques avançades i s'ha descrit que podria actuar estabilitzant la xarxa de col·lagen durant la fibrosi (Ooshima A 1981). Així doncs, és fonamental el manteniment dels nivells de col·lagen ja que una davallada en la quantitat de col·lagen o defectes en la síntesi i deposició poden portar a un debilitament del cap fibrós, fet que facilita

---

la ruptura de la placa o fins i tot la formació d'aneurismes i la ruptura arterial (Löhler J 1984, Tunon J 2000). En el trencament del col·lagen hi juguen un paper fonamentals una elevada varietat d'enzims anomenats MMPs els quals són capaços de degradar la matriu contribuint al debilitament del cap fibrós (Moreno MJ 1994, Libby P 1996). En aquest sentit la captació de LDL modificades (LDLox) pels MØ és un element clau ja que incrementa l'expressió de MMPs (Ardans JA 2002, Kalela A 2002). Donat que un increment en l'expressió i activitat de les MMPs s'associa a un trencament del cap fibrós de les lesions amb la consegüent ruptura de la placa, és fàcil pensar amb la transcendència de les conseqüències que porta la presència de LDL modificades en la paret vascular.

Un altre component de la MEC són els PGs. S'ha descrit que durant l'aterogènesi es produeixen canvis en el contingut i distribució de PGs en la paret arterial, canvis que poden afectar a la permeabilitat de la paret vascular. Així s'ha observat que, la concentració de PGs és menor en les lesions més avançades i fibròtiques (Guyton JR 1993). La modificació de LDL també pot modular la síntesi de PGs en diferents tipus cel·lulars (veure *secció III.2*). La captació de LDL acetilades, incrementa la biosíntesi i secreció de proteoglicans heparan sulfat (HSPG) i de proteoglicans condroitin sulfat (CSPG) en els MØ (Ghiselli G 1998), fet que afavoriria la retenció de lipoproteïnes en l'íntima arterial. Pel que fa a la biosíntesi de PGs en les CML existeix certa controvèrsia. D'una banda, s'ha observat que l'acumulació lipídica intracel·lular derivada de la captació de LDLox porta a un increment en la síntesi de PGs en CML procedents d'aorta de mono o de conill (<sup>a</sup>Vijayagopal P 1993, Chang MY 2000). Resultats que contrasten amb els trobats en estudis *in vitro* amb CML d'aortes humanes, on s'ha observat que la captació de LDLox disminueix la síntesi de PGs (<sup>a,b</sup>Vijayagopal P 1996). Diferències que podrien ser degudes a diferents mecanismes de transformació de les CML en cèl·lules escumoses en funció de l'espècie. Tot i això, també s'ha descrit que la síntesi i secreció de PGs també es veu alterada per la presència d'àcids grassos en el medi de cultiu, ja que la seva internalització altera l'expressió gènica de gens que codifiquen pel nucli proteic de determinats PGs (versicà, decorí i sindecà) (Olsson U 1999).

### III. PAPER DELS COMPONENTS DE LA PARET VASCULAR EN L'ATEROGÈNESI

L'organització de la paret vascular és semblant en totes les artèries. La paret sana consta de tres capes concèntriques (Fawcett DW 1989): l'*íntima*, la capa més interna, constituïda per una monocapa de cèl·lules endotelials orientades longitudinalment, sota les quals es troba la làmina basal i la MEC; la capa *mitja*, formada per capes de CML rodejades de MEC; i l'*adventícia*, la capa més externa que la formen fibroblasts, fibres elàstiques i feixos de col·lagen, a més de petits vasos (*vasa vasorum*) encarregats de nodrir les cèl·lules de la capa mitja. Aquesta capa s'integra en el teixit conjuntiu que acompanya a tots els vasos sanguinis. Tot i això, en l'íntima arterial de les lesions ateroscleròtiques, a part de les cèl·lules esmentades, s'hi poden trobar monòcits/MØ, cèl·lules T i CML, així com, acumulació de lípid extracel·lular i intracel·lular. Seguidament, s'aprofundirà en els diferents components de la paret més relacionats amb el present estudi.

#### III.1. Lípid

La presència de lípid en la paret arterial no és un element clau únicament en les plaques ateroscleròtiques més vulnerables, sinó que també té una elevada importància en els primers estadis de la lesió (formació de l'estria de greix). Els principals lípids presents en les plaques ateroscleròtiques són el colesterol i els seus esters que poden trobar-se com a lípid intracel·lular o extracel·lular. Cal dir però, que les estries de greix estan formades principalment de cèl·lules escumoses i poca o nul·la presència de lípid extracel·lular, el qual és característic de lesions ateroscleròtiques avançades que presenten un important nucli lipídic envoltat d'una coberta fibrosa (Öörni K 2000).

S'han trobat tres tipus de components lipídics extracel·lulars en l'íntima ateroscleròtica arterial (Öörni K 2000, Jerome WG 2003):

- a) *partícules semblants a les LDL plasmàtiques* derivades de la retenció i/o modificació de les LDL plasmàtiques (veure *seccions II.1 i II.2*) que s'acumulen en l'íntima: LDLox, complexes de LDL amb PGs (LDL-PGs), fragments de partícules de LDL derivats de l'activitat d'enzims o d'agents oxidants, LDLag riques en ceramida per acció de la SMasa,

LDL hidrolitzades per acció de la PLA<sub>2</sub>, productes de la peroxidació lipídica de les LDL per acció del MDA i de 4-HNE, entre d'altres.

- b) *petites gotes lipídiques* derivades de LDL plasmàtiques. Es caracteritzen per tenir un tamany (20-400 nm) inferior al de les gotes intracel·lulars presents en les cèl·lules escumoses (>400 nm), de les que també es diferencien per la composició química. Les gotes extracel·lulars són fonamentalment esters de colesterol rics en linoleat a diferència de les gotes lipídiques intracel·lulars que són riques en oleat.
- c) *petites vesícules lipídiques* de les que es desconeix l'origen, encara que s'ha proposat que podrien derivar de tres possibles fonts: de VLDL o de LDL (el nucli lipídic de les quals és modificat per processos lipolítics), de vesícules secretades per cèl·lules escumoses, o bé de la mort per necrosi de les cèl·lules escumoses.

Pel què fa a la presència de lípid intracel·lular, en l'íntima arterial sana, els lípids procedents de les lipoproteïnes són metabolitzats per les cèl·lules vasculares i no s'acumulen, ja que el contingut de colesterol intracel·lular està altament regulat. Però en les lesions ateroscleròtiques, els mecanismes de regulació del colesterol estan inhibits, i el colesterol i els seus esters són acumulats intracel·lularment donant a la cèl·lula un aspecte escumós (microscòpicament), d'aquí el seu nom de cèl·lules escumoses, veure *secció II.3.2* (Stary HC 1994).

### III.2. Matriu extracel·lular

La MEC és un ampli compartiment constituït per fibres de col·lagen i fibres elàstiques incloses en un gel viscoelàstic format per PGs, hialuronà, glicoproteïnes i aigua (veure *taula II i figura 2*). Tots aquests components interactuen entre ells i s'entrecreuen formant un polímer reticular actiu que confereix a la paret les seves propietats biomecàniques (capacitat tensora i compressiva, viscoelasticitat,...). També presenta la capacitat d'unir lipoproteïnes plasmàtiques, factors de creixement, citoquines i altres enzims presents en l'espai íntim que li permeten modular el metabolisme de la paret vascular.

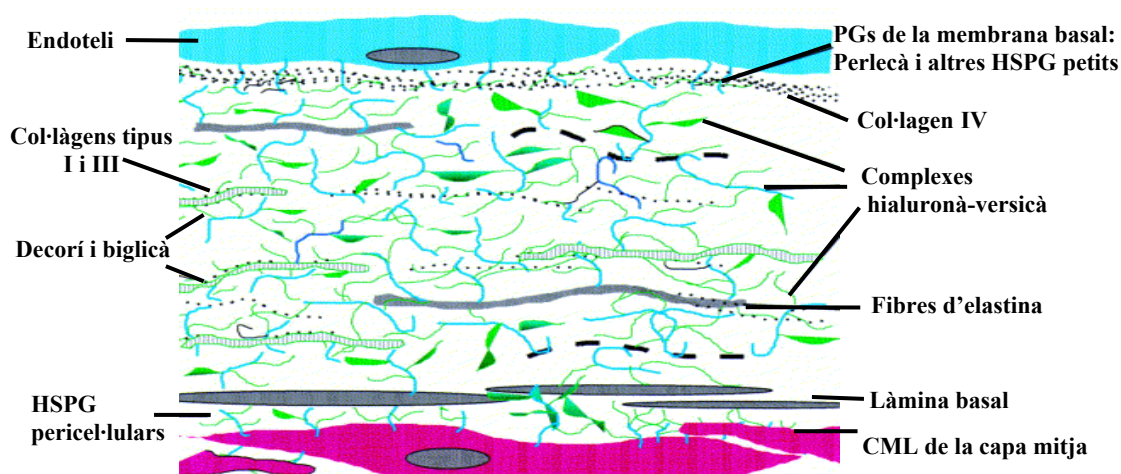
D'altra banda la interacció de la MEC amb les cèl·lules vasculares, la fa participar en el desenvolupament de la placa ateroscleròtica, ja que contribueix a la regulació de l'adhesió, migració i proliferació de les cèl·lules vasculares. Els components majoritaris de la MEC són els PGs i el col·lagen, que a continuació s'explicaran amb més detall.

**Taula II. Matriu extracel·lular: components i estructures que la conformen (adaptada de Wight TN 1996)**

Fibres de col·lagen	Glicoproteïnes	Fibres elàstiques	Membrana o làmina basal	PGs i molècules associades
Col·lagen tipus I	Fibronectina	Elastina	Col·lagen tipus IV	GAGs: <i>Hialuronà</i>
Col·lagen tipus III	Trombospondina	Fibrilina	Col·lagen tipus VIII	CSPG: <i>versicà i agreçà</i>
Col·lagen tipus V	Tenascina	Emilina	Laminina	HSPG: <i>perlecà i sindecà</i>
Col·lagen tipus VI	Osteopontina	Lisil-oxidasa	Entactina	DSPG: <i>decorí i biglicà</i>
			HSPG: <i>perlecà</i>	KSPG: <i>lumicà</i>

PGs: proteoglicans, HSPG: heparan sulfat proteoglicans, CSPG: proteoglicans condroitin sulfat, DSPG: proteoglicans dermatan sulfat i KSPG: proteoglicans queratan sulfat.

**Figura 2. Esquema de la MEC (adaptada de Camejo G 1998)**



### III.2.1. Col·lagen

El col·lagen és el component majoritari de la MEC de la paret vascular. La principal font de col·lagen en l'íntima i mitja de la paret arterial són les CML (que modulen la síntesi de col·lagen segons el fenotip que presenten), tot i que, altres tipus cel·lulars com les cèl·lules endotelials, els fibroblasts o els MØ també en sintetitzen (Barnes MJ 1999, Joseph J 2003). S'han descrit 19 tipus de col·làgens, 13 dels quals s'han trobat en la paret vascular o s'expressen en cèl·lules de la paret vascular *in vitro* (Mayne R 1993, Rauterburg J 1993, Prockop DJ 1995, Wight TN 1996, Rekhter MD 1999). En la **taula II** es mostren els més rellevants així com la seva localització en diferents estructures de la MEC. S'ha observat que

l'expressió i distribució en la paret vascular dels diferents tipus de col·lagen no és la mateixa (veure *secció II.3.3*). Així, per exemple, el col·lagen tipus I s'expressa principalment en la coberta fibrosa i en les regions vascularitzades de les plaques primàries i la proporció és menor en el centre de la placa on la concentració de lípids és major. Mentre que, el col·lagen tipus IV s'incrementa en la membrana basal i al voltant de les CML (Ross R 1984) donant lloc a una membrana basal hipertrofiada que efecte principalment a la permeabilitat i metabolisme de les cèl·lules de l'entorn.

El col·lagen és essencial pel manteniment de la integritat i elasticitat de la paret vascular, però també participa en diverses funcions cel·lulars. Està implicat en processos de diferenciació cel·lular, adhesió, migració, proliferació i apoptosi (Ross R 1995, Barnes MJ 1999, Rekhter MD 1999), d'aquí el seu impacte en l'aterogènesi. A més, els col·làgens poden estar implicats en la retenció de proteïnes plasmàtiques, de lipoproteïnes (les LDL i les LDLox poden unir-se als col·làgens tipus I i III (Jimi S 1994)), factors de creixement i calci en les lesions ateroscleròtiques. I la seva glicosilació pot ser un dels agents promotors de l'aterogènesi especialment l'associada a diabetis ja que afavoreix la retenció de les LDL (Chappey O 1997, Bailey AJ 1998, Barnes MJ 1999). Però on juga un paper clau és en les plaques ateroscleròtiques avançades ja que un increment en la síntesi de col·lagen en aquestes regions estabilitza les lesions encara que en redueix la llum vascular. Així un defecte en la síntesi i/o deposició de col·lagen en les plaques avançades pot evolucionar cap a un debilitament i/o ruptura de la placa (Löhler J 1984), fet que pot complicar-se ja que l'exposició de col·lagen al torrent sanguini indueix l'activació de les plaquetes (Barnes MJ 1998) afavorint la formació del trombus.

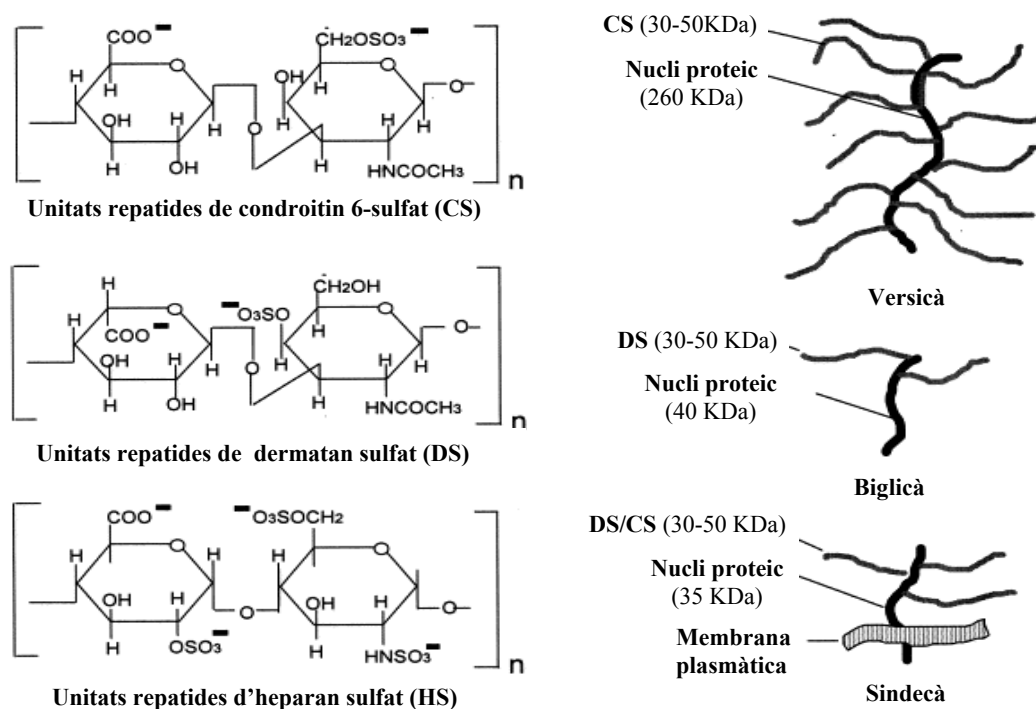
### III.2.2. Proteoglicans

Els PGs són molècules hidrofòbiques formades per llargues cadenes de GAGs unides covalentment a un nucli proteic. Existeix una gran varietat de PGs en la MEC, que es classifiquen segons els GAGs que contenen (*figura 3*) (Bihari-Varga M 1998). La principal font de PGs en la paret vascular són les CML, encara que les cèl·lules endotelials, els mastòcits, els limfòcits i els monòcits també poden sintetitzar-ne. La síntesi de PGs pels diferents tipus cel·lulars està específicament regulada tant a nivell de síntesi del nucli proteic com de les cadenes de GAGs (Pillarsetti S 2000). La producció de PGs depèn dels estadis fenotípics cel·lulars (Banerjee SD 1992, <sup>a,b</sup>Camejo G 1993), de la presència de determinats



factors de creixement i citoquines (PDGF, TGF- $\beta$  i IL-1) (Schönherr E 1993, 1997) i de la presència de LDL (Pillariseti S 2000).

**Figura 3. Estructura dels GAGs dels diferents tipus de PGs presents en la paret vascular (adaptada de Camejo G 1998)**



Els PGs són substàncies biològicament molt actives que intervenen en el control de les propietats físiques (confereix viscoelasticitat i turgència a l'artèria), en la permeabilitat i homeostasi de la paret arterial, i contribueixen en el metabolisme lipídic i en la trombosi. Però d'altra banda, interaccionen amb factors de creixement i citoquines que els permeten regular l'adhesió, migració, diferenciació i proliferació cel·lular (Wight TN 1992). La distribució de PGs en la paret arterial és variable, localitzant-se fonamentalment a l'íntima arterial i en menor grau en la mitja i adventícia. En l'íntima arterial els PGs formen part de l'espai pericel·lular (anclats a la membrana plasmàtica) o bé són secretats i esdevenen el component majoritari de la MEC.

El remodelat de les artèries (restenosi), la hipertensió, i la progressió de l'aterosclerosi van acompanyats de canvis en la distribució de PGs en la paret arterial (Riessen R 1994, Wight TN 1996, Gutierrez P 1997, Evanko SP 1998). Així, el versicà es troba principalment en la matriu d'àrees riques en CML, en la càpsula fibrosa i en plaques marginals. Mentre que,

el decorí es localitza en la coberta fibrosa i en regions riques en MØ en la zona del nucli lipídic de lesions avançades. A més, el versicà, a diferència del decorí, no es troba associat a feixos de col·lagen. Dades que fan pensar que cada tipus de PG pot tenir un determinat paper biològic en la patogènia de l'aterosclerosi. D'altra banda, s'ha demostrat que en artèries ateroscleròtiques el contingut de CSPG i DSPG es troba incrementat a diferència dels nivells de HSPG que presenten una davallada (Cherchi GM 1990).

La rellevància dels PGs en el processos que tenen lloc en la paret vascular ha centrat l'atenció de part d'aquest treball experimental. En concret ens centrarem en els HSPG i els CSPG que continuació s'explicaran amb més detall.

### **Proteoglicans condroitin sulfat**

Els principals PGs estructurals de la MEC són els CSPG, sintetitzats principalment per les CML i MØ. Dins aquesta família de PGs es troba el versicà.

Els CSPG han estat considerats importants elements aterogènics, degut a l'elevada capacitat que tenen per interaccionar, retenir i agregar lipoproteïnes riques en colesterol (Camejo G 1990, <sup>a</sup>Camejo G 1991). S'ha observat que entre els CSPG, el versicà és el que presenta major afinitat per les LDL. Degut al fet que el versicà està format per llargues cadenes de GAGs (veure *figura 3*) carregats negativament (pels grups sulfats) que interaccionen electrostàticament amb les càrregues positives dels dominis d'unió a heparina de l'apoB-100 i de l'apoE. Cal dir però, que en la interacció dels PGs amb les LDL, la naturalesa d'aquestes últimes hi té un paper important. Les LDL petites i amb major densitat presenten major afinitat pels PGs arterials i en conseqüència tenen un fenotip lipoproteic més aterogènic (Hurt-Camejo E 1990, Camejo G 1998). De fet, la presència de LDL petites i denses ha estat considerat un factor de risc per l'aterosclerosi ja que s'ha trobat associat a patologies com la diabetes, hipertensió, hiperlipidèmia familiar, ... (Reaven GM 1993, Hokanson JE 1995, Galeano NF 1994, 1998). D'altra banda, el versicà té capacitat de formar complexes macromoleculars amb el hialuronà donant lloc a estructures que contenen centenars de cadenes de condroitin sulfats, que contribueixen a incrementar aquesta afinitat per les LDL (Williams KJ 2001). La interacció dels GAGs del versicà amb les partícules de LDL els hi produeix modificacions estructurals que faciliten la seva oxidació, la modificació enzimàtica i la fusió i agregació de les partícules de LDL (<sup>b</sup>Pentikäinen MO 1997, Camejo G 2002).

Estudis *in vivo* han demostrat que les apoproteïnes colocalitzen amb determinats PGs en les plaques ateroscleròtiques humanes i se n'han aïllat complexos apoB-100 amb CSPG (Camejo G 1985, 1998, Williams KJ 2001). Per tant, el fet que un dels esdeveniments claus en la iniciació de l'aterogènesi és la retenció subendotelial de lipoproteïnes aterogèniques, els CSPG jugarien un paper principal en la iniciació de l'aterogènesi, confirmant la "hipòtesi de resposta a la retenció". A més, les LDL modificades tenen major avidesa per ser captades pels MØ i les CML, fet que converteix als CSPG en elements clau en la formació de les cèl·lules escumoses.

L'íntima normal i les regions propenses a desenvolupar lesió són inicialment riques en grans PGs com el versicà (Gutierrez P 1997). Generalment, el contingut de CSPG s'incrementa durant la progressió de la lesió i eventualment disminueix en les lesions avançades (Völker W 1989, Radhakrishnamurthy B 1990, Wight TN 1996). A més, l'estructura dels CSPG també pateix canvis durant el desenvolupament de les lesions humanes així, s'ha observat que l'acumulació de colesterol intracel·lular en les CML provoca un increment en la longitud de les cadenes de GAGs dels PGs sintetitzats (<sup>a,b</sup>Vijayagopal P 1996).

Adicionalment, els DSPG (diferent família gènica dels CSPG), menys abundants que el versicà, també formen complexos amb les LDL. El decorí, un petit DSPG localitzat principalment en l'adventícia en les zones riques en col·lagen, regula l'associació de les LDL al col·lagen tipus I i III. A més, regula el creixement cel·lular, l'activitat de determinats factors de creixement i és un important component de la coberta fibrosa (Pentikäinen M 1997). Un altre petit DSPG, el biglicà, es troba també en les lesions ateroscleròtiques unit a LDL (Wight TN 1996, Olin KL 1999).

### **Proteoglicans heparan sulfat**

Els HSPG estan formats per un nucli proteic i almenys una cadena d'heparan sulfats (HS). Són sintetitzats principalment per les cèl·lules endotelials i les CML que poden secretar-los (perlecà) o mantenir-los anclats a la superfície cel·lular (perlecà, sindecà o glicicà) (Williams KJ 1997, Iozzo RV 1999). El HSPG més gran que es troba en el subendoteli és el perlecà (Iozzo RV 1994), l'estructura proteica del qual té elevada influència en determinats processos implicats en l'aterosclerosi.

---

A diferència dels CSPG, que tenen gran rellevància en la retenció de LDL en la paret arterial, els HSPG actuen com a molècules dinàmiques que faciliten la unió i el catabolisme de determinats lligants, funcionant com a receptors cel·lulars (Williams KJ 2001). Poden actuar de receptors de varis factors de creixement com el bFGF (que estimula la proliferació de les CML), de citoquines i d'altres enzims vasculars (Lindahl U 1994). D'altra banda, poden modular la interacció de determinats lligants proteics extracel·lulars amb els seus receptors mitjançant la formació de complexos HS-proteïna que incrementen la disponibilitat del lligant pel seu receptor. Així, poden contribuir en la internalització de lipoproteïnes aterogèniques, com les partícules lipoproteïques riques en apoE-triglicèrids (Al-Haideri M 1997), lipoproteïna lipasa (LpL) (Sehayek E 1996), o poden facilitar la captació de lligants mitjançant processos anomenats de transferència de lligant a receptors lipoproteïcs, tals com el LRP (Beisiegel U 1994, Mahley RW 1994, Kounnas MZ 1995, Rohlmann A 1998, Sarafanov AG 2001).

Igual que els CSPG, la concentració de HSPG en la paret vascular es veu alterada per determinats processos. Així, amb l'edat, l'aterosclerosi, la inflamació i la diabetis s'observa una disminució en la síntesi de HSPG en la paret arterial (Hollman J 1989, Goldberg IJ 1998). S'ha demostrat que les molècules aterogèniques regulen a la baixa l'expressió de HSPG. Així, nivells aterogènics de LDL i LDL modificades disminueixen la síntesi del nucli proteic del perlecà, així com també, incrementen la degradació dels GAGs (Pillarsetti S 1995, 1997). De fet, s'ha observat que l'acumulació de colesterol en la lesió és inversament proporcional a la concentració de HSPG en les aortes. D'altra banda, l'expressió de HSPG es veu incrementada per determinats agents antiaterogènics com l'apoE i l'apoE-HDL, que incrementen la proteïna del perlecà en les cèl·lules endotelials i CML, i també afavoreix la sulfatació dels grups HS en les cèl·lules endotelials (Pillarsetti S 2000).

Els HSPG poden modular esdeveniments relacionats amb l'aterogènesi com el metabolisme lipídic, el reclutament de monòcits, la proliferació de les CML i la trombosi. D'altra banda, s'ha observat que un increment en el perlecà s'associa a un augment en la capacitat antitrombòtica i antiproliferativa de les cèl·lules endotelials (Pillarsetti S 2000). Així doncs, la regulació de l'expressió dels HSPG vasculars podria jugar un paper clau en la modulació de l'aterogènesi.

### III.3. Components cel·lulars

#### III.3.1. Cèl·lules endotelials

En la paret arterial sana, l'endoteli vascular forma una interfase multifuncional entre la sang circulant i els diferents teixits i òrgans del cos. Exerceix de barrera permeable i selectiva a través de la qual s'intercanvien macromolècules amb el plasma, i constitueix una activa superfície antitrombogènica. L'endoteli és un òrgan complex i dinàmic que respon a estímuls ambientals i a substàncies vasoactives, agents vasoconstrictors com angiotensina II i vasodilatadors com el NO, substàncies que modulen el to, l'estructura i la funció vascular i influeixen en el creixement i/o apoptosi de les CML, en l'agregació plaquetar, l'adhesió de monòcits i leucòcits i en la trombosi. D'altra banda, l'endoteli també juga un paper clau en l'angiogènesi ja que la migració i proliferació de les cèl·lules endotelials són processos clau per la gènesi de nous vasos a l'interior de les lesions ateroscleròtiques.

Determinats estímuls arterials porten a la disfunció endotelial contribuint en la iniciació i progressió de l'aterosclerosi. Entre aquests estímuls es troben la hipertensió, l'activació per citoquines i endotoxina bacteriana, infecció per virus, productes finals de la glicosilació avançada (en diabetis i envelliment), hiperhomocisteïnèmia, hipercolesterolèmia i LDL modificades (LDLox), estrés mecànic i determinades forces bioquímiques generades pel volum sanguini. Com s'ha esmentat en la *secció II.3.1* els lípids plasmàtics exerceixen importants efectes sobre la funció endotelial, especialment concentracions aterogèniques de LDL. D'altra banda, les VLDL alteren la regulació de la fibrinolisi que realitza l'endoteli ja que modifiquen la secreció de l'activador tissular del plasminogen (t-PA) i del seu inhibidor PAI-1 (Grafe M 1998). A més l'endoteli activat per agents inflamatoris expressa valors més elevats de molècules d'adhesió (CAM) i de substàncies quimiotàctiques (proteïna quimiotàctica per monòcits-1 (MCP-1)) que faciliten la unió i migració de leucòcits circulants (Martínez J 2001). El flux sanguini, i en concret les forces biomecàniques que aquest genera, modulen la majoria de molècules produïdes per l'endoteli: molècules que regulen el to vascular (NO, endotelina-1), factors de creixement (Factor de creixement de fibroblasts (FGF), Factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF-AA i -BB), Factor de creixement transformant beta (TGF- $\beta$ )), molècules d'adhesió (MCP-1, VCAM-1, ICAM-1), molècules implicades en la fibrinolisi (t-PA) i la trombosi (trombomodulina i el TF) (Ando J 1994, Davies PF 1995, Tsao PS 1996).

### III.3.2. Monòcits/macròfags

Els monòcits/MØ estan implicats en menor o major grau en tots els estadis del desenvolupament de la lesió ateroscleròtica, des de la gènesi fins a la ruptura de les plaques. Un dels primers esdeveniments que porten a la formació de les lesions ateroscleròtiques és l'adhesió dels monòcits circulants a l'endoteli i la seva migració en l'íntima arterial (Ross R 1993). L'increment en la unió dels monòcits a l'endoteli és degut a l'augment en les molècules d'adhesió (VCAM-1, ICAM-1) que expressa l'endoteli activat (com s'ha esmentat anteriorment). Els monòcits adherits migren cap a l'íntima atrets per les LDL modificades i per substàncies quimiotàctiques sintetitzades per l'endoteli activat tals com la MCP-1 (Navab M 1991). En l'íntima arterial els monòcits es diferencien a MØ en ésser estimulats per les LDL modificades i per diferents molècules (Factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF), Interferó gamma (INF- $\gamma$ )) secretades pels limfòcits T, les cèl·lules endotelials i les CML (Ross R 1993).

La presència de MØ a l'íntima arterial contribueix a dos nivells en la formació i progressió del nucli lipídic. D'una banda, l'elevada capacitat que presenten els MØ per internalitzar LDL modificades (mitjançant algun dels receptors de la família del receptor *scavenger* (veure *apartat IV*)) porta a la formació i acumulació de cèl·lules escumoses en la paret del vas. Però, l'acumulació lipídica intracel·lular en els MØ és limitada, fet que a llarg termini desencadena la seva mort per necrosi que contribueix al nucli lipídic acel·lular.

L'aterosclerosi també s'ha considerat un procés inflamatori crònic (Libby P 2002). En aquest sentit els MØ són els principals mediadors de la inflamació en l'aterogènesi, ja que estant implicats en la presentació d'antígens, fet que els fa partícips en les respostes immunes locals que es donen en el procés ateroscleròtic. Una característica fonamental de qualsevol resposta inflamatòria és l'activitat d'enzims amb capacitat de degradar el teixit connectiu extracel·lular. En aquest procés s'atribueix un important paper als MØ, que produeixen enzims capaços de degradar el teixit connectiu, com les MMPs (Galis ZS 1994). La destrucció de la MEC debilita la coberta fibrosa de les plaques contribuint a la seva inestabilitat i ruptura.

### III.3.3. Cèl·lules musculars llises

Les CML són el component cel·lular majoritari de la paret vascular sana, de les lesions inicials i també de la neoíntima de les plaques restenòtiques. Constitueixen l'únic tipus cel·lular en la capa mitja de la paret vascular sana. Així, en la paret arterial sana o en lesions

inicials, les CML representen un 90-95 % del component cel·lular, percentatge que decau fins a un 50 % en les plaques ateroscleròtiques avançades (Ip JH 1990, Wissler RW 1990).

En les artèries sanes les CML presenten un “fenotip contràctil” caracteritzat per respondre a agents agonistes que produeixen la vasoconstricció o la vasodilatació del vas i es caracteritzen per donar suport estructural a les artèries. A més, les CML en fenotip contràctil presenten un baix índex proliferatiu i reduïda capacitat secretora de MEC. Però durant l’aterogènesi les CML de la capa mitja són activades per molècules secretades (Factor de creixement de fibroblasts (bFGF), PDGF, Factor de creixement endotelial (EGF), trombina, angiotensina II) per la resta de cèl·lules presents en les lesions ateroscleròtiques, induint-los una transformació fenotípica (Ross R 1993). Així, les CML de fenotip contràctil no proliferatiu es transformen en cèl·lules que proliferen activament (fenotip sintètic), que migren atretes per agents quimiotàctics i que tenen incrementada la síntesi de MEC (col·lagen, elastina i PGs) (Thyberg J 1996). Fet que actualment qüestiona la rellevància de la proliferació de les CML en l’aterosclerosi, i fa especular sobre el possible paper protector que exerceixen, sobretot per la seva capacitat de sintetitzar les proteïnes de la MEC que conformen la coberta fibrosa de les plaques.

### ***Taula III. Paper de les CML en aspectes clínics rellevants en la malaltia coronària arterial***

**1. Iniciació i progressió de les lesions ateroscleròtiques.** *La disfunció endotelial estimula la proliferació de les CML en els primers estadis de la lesió, contribuint a una lenta progressió del creixement de les plaques que, a llarg termini, cursarà amb la reducció de la llum vascular amb les conseqüents complicacions isquèmiques.*

**2. CML i estabilitat de la placa.** *L’estabilitat de les plaques per resistir la seva ruptura depèn fonamentalment de la seva composició cel·lular. La síntesi de teixit fibrós per les CML tendeix a encapsular el nucli lipídic, altament trombogènic, formant una gruixuda coberta fibrosa que dona estabilitat a la placa. Així les CML semblen exercir un paper protector front la trombosi.*

**3. Apoptosi de les CML i vulnerabilitat de les plaques.** *Les plaques avançades amb una càrrega inflamatòria important són font de citoquines capaces d’induir el procés apoptòtic en les CML, o d’inhibir-los el seu creixement i la seva producció de col·lagen, fet que perjudica la formació de la coberta fibrosa i contribueix a la ruptura de la placa.*

**4. Reorganització de la placa després de la seva ruptura espontània o de la seva erosió.** *La formació del trombus fomenta la migració i proliferació de CML i la síntesi de MEC. Així, es dona la reorganització del trombus fruit de la proliferació de CML, de la deposició de MEC i de la neovascularització que porten a l’estabilització de la lesió trombogènica. Cal dir però, que aquest procés de reparació resulta amb un ràpid episodi d’expansió de la placa ateroscleròtica.*

**5. Resposta de les CML a l’angioplàstia o implantació d’estents.** *El procés de reorganització de la placa que es produeix després d’un procés trombòtic és semblant al que té lloc després d’una angioplàstia o col·locació d’un estent en les coronàries. També es desencadenen els processos de hiperplàsia neointimal i el remodelat vascular que condueixen a la restenosi.*

---

D'altra banda, les CML juguen un paper important en la formació de cèl·lules escumoses. Nosaltres hem demostrat que les LDLag poden causar elevada acumulació de CE intracel·lular en les CML (Llorente-Cortés V 2000) mitjançant la seva captació a través del receptor LRP (veure *apartat IV*).

Podríem dir doncs que, les CML tenen un paper fonamental en les respostes de regeneració de la paret vascular associades als diferents estadis de la progressió de l'aterogènesi. A continuació s'adjunta una taula on es pretén resumir el paper de les CML en diferents aspectes clínics rellevants de la malaltia coronària arterial.

#### **IV. RECEPTORS LIPOPROTEICS. LRP**

Com s'ha esmentat, la captació de LDLn pel seu receptor està regulada a la baixa pels nivells intracel·lulars de colesterol, dades que fan pensar en la possible implicació d'una/es altra/es via/es d'internalització de colesterol independent/s del rLDL en la formació de cèl·lules escumoses. La major part de modificacions que pateixen les LDL porten a un increment en la seva càrrega negativa, afavorint una captació diferencial per les cèl·lules vasculares així com la captació per altres receptors diferents al rLDL. S'han identificat diferents receptors cel·lulars que podrien estar involucrats en la captació de LDL modificades i la conseqüent transformació de les cèl·lules vasculares en cèl·lules escumoses. Entre els quals es troben, els receptors *scavenger*, el rVLDL i el receptor LRP (*taula IV*). Receptors que, a diferència del rLDL, estan altament expressats en les lesions ateroscleròtiques.

Existeixen importants diferències pel què fa a l'expressió d'aquests receptors en els diferents tipus de cèl·lules vasculares. Així, els receptors *scavenger* es troben altament expressats en els MØ, mentre que és necessari estimular les CML per obtenir-ne uns nivells detectables (Pitas RE 1990, Gong Q 1995). D'altra banda, el receptor que presenta major expressió en les CML és el receptor LRP. A continuació, s'aprofundirà en les característiques d'aquest receptor.



**Taula IV. Receptors implicats en la internalització de LDL modificades.**

Receptors	Lligants	Tipus cel·lular	Lesió ateroscleròtica	Referències
<b>Família del rLDL</b>				
rLDL	LDL <sub>n</sub> LDL modificades per PGs	CE, CML i MØ	±	<sup>a</sup> Goldstein JL 1979 Kodama T 1988
rVLDL	VLDL β-VLDL	CE, CML i MØ	++	Wyne KL 1996 Mulhaupt HA 1996 <sup>a,b</sup> Hiltunen TP 1998
LRP	LDL <sub>ag</sub> LDL fusionades per versicà Complexes apoE-lípid	CML i MØ	+++	Llorente-Cortés V 2000 Luoma J 1994
<b>Família de receptors scavenger</b>				
SR-AI, SR-AII	LDL <sub>ox</sub> i LDL <sub>ac</sub>	MØ i CE	++	Freeman MW 1994 Luoma J 1994
CD36	LDL <sub>ox</sub> i LDL <sub>ac</sub>	CE, MØ i plaquetes	+	Rigotti A 1997 Acton SL 1994 Endeman G 1993
SRBI (CLA-1)	LDL <sub>ox</sub> i HDL	MØ	+	Acton SL 1994 Calvo D 1998
CD68	LDL <sub>ox</sub>	MØ	++	Ramprasad MP 1996
FcR2B2	agregats de LDL <sub>ox</sub>	MØ	++	Stanton LW 1992 Sawamura T 1997
LOX-1	LDL <sub>ox</sub> i LDL <sub>ac</sub>	CE, CML i MØ	++	Li DY 2002 Bo Hu 2003
SR-PSOX	LDL <sub>ox</sub>	MØ	++	<sup>a,b</sup> Minami M 2001

Nivell d'expressió: ±: absent o baix, +: moderat, ++: alt, +++: molt alt. CE: cèl·lules endotelials, CML: cèl·lules musculars llises, MØ: macròfags. rLDL: receptor de les LDL, LRP: proteïna relacionada amb el rLDL, rVLDL: receptor de les VLDL, SR-AI, SR-AII, SR-BI: receptors *scavenger* classe AI, AII i BI. CD36: receptor *scavenger* classe B, CD68: receptor *scavenger* classe D, FcR2B2: receptor pel domini Fc de les immunoglobulines, LOX-1: receptor de LDL<sub>ox</sub> receptor *scavenger* classe E, SR-PSOX: receptor *scavenger* per la fosfatidilserina i les LDL<sub>ox</sub>.

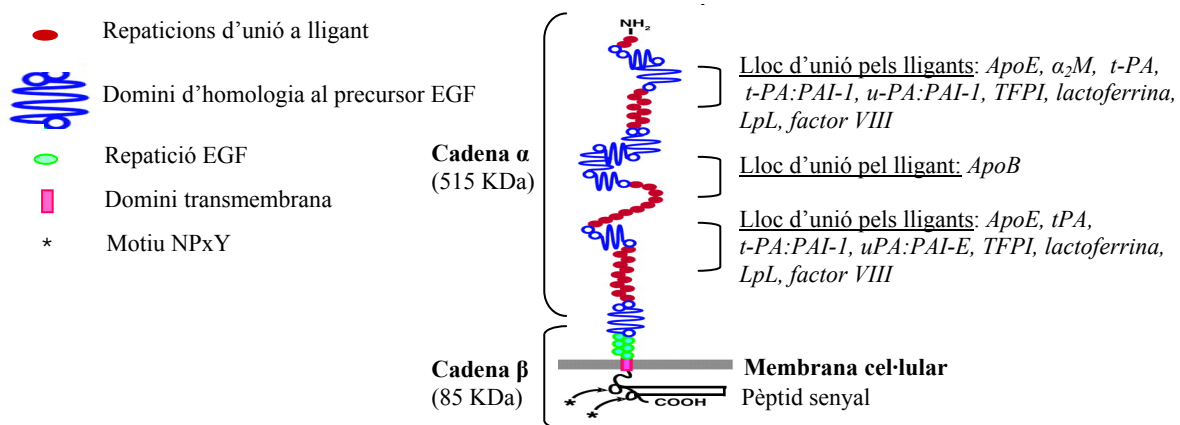
#### IV.1. LRP: proteïna relacionada amb el receptor de les LDL

El LRP és un receptor endocític multifuncional que pertany a la família del gen del rLDL. Rep el nom de proteïna relacionada amb el rLDL degut a l'estreta similitud estructural i bioquímica amb aquest receptor. També se l'anomena receptor de l' $\alpha_2$ -macroglobulina ( $\alpha_2$ MR) doncs no fou fins el 1990 que s'observà que eren la mateixa proteïna (Kristensen T 1990, Strickland DK 1990).

El LRP és sintetitzat en el reticle endoplasmàtic com una proteïna precursora formada per una cadena simple glicosilada, amb un pes molecular aparent de 600 KDa. Eliminat el pèptid senyal, el LRP és transportat a través de l'aparell de Golgi on per un procés proteolític resulta en dues cadenes: la cadena  $\alpha$  (515 KDa), que conté l'extrem amino-terminal, i la cadena  $\beta$  (85 KDa), que conté l'extrem carboxi-terminal (*figura 4*). La forma madura de la

proteïna manté unides les dues unitats associades mitjançant una unió no covalent. En la superfície cel·lular el LRP està insertat a la membrana plasmàtica per la cadena  $\beta$ , que conté un domini transmembrana i una curta cua citoplasmàtica que és essencial per l'endocitosis. La cadena  $\alpha$ , completament extracel·lular, interacciona amb gran nombre de lligants gràcies a la seva estructura multidomini.

**Figura 4. Estructura del receptor LRP (adaptada de Herz J 2001)**



A diferència de la resta de receptors de la mateixa família, el LRP es caracteritza per no tenir una restringida especificitat de lligant, ans al contrari, internalitza una gran quantitat de lligants amb estructures i característiques diverses (*taula V*).

La gran varietat de lligants del LRP evidencia la multitud de processos fisiològics i patològics amb els que pot intervenir. Així, la internalització de apolipoproteïnes i lipases porta al LRP a jugar un paper important en el metabolisme lipídic. D'altra banda el LRP internalitza proteases i els complexos d'aquestes amb els seus inhibidors, proteïnes implicades en el sistema fibrinolític que controlen processos tant importants com la migració cel·lular. La unió del LRP al complexe TF-TFPI fa que tingui gran rellevància en els processos trombogènics. El LRP a l'unir la trombospondina, permet la regulació de processos d'agregació plaquetar, d'adhesió i creixement cel·lular i l'angiogènesi.

El LRP està altament expressat tant en les lesions ateroscleròtiques com en els vasos sans, encara que la seva expressió es veu incrementada amb la progressió de la lesió ateroscleròtica (Moestrup SK 1992, Luoma J 1994, <sup>a,b</sup>Hiltunen TP 1998). S'ha observat que el LRP s'expressa en CML i en MØ presents en les lesions ateroscleròtiques humanes (Luoma J 1994, Lupu F 1994), cèl·lules de les que deriven les cèl·lules escumoses presents en les

plaques d'ateroma. Per tant, el LRP podria tenir un paper clau en el desenvolupament del procés ateroscleròtic.

**Taula V. Taula resum dels principals lligants del LRP**

Lligants lipoproteics i lipases	Lligants fibrinolítics	Altres lligants
VLDL remanents enriquides en apoE (Kowal RC 1989)	$\alpha_2$ -macroglobulina-proteases (Ashcom JD 1990)	Trombospondina-1,-2 (Godyna S 1995, Mikhailenko I 1995)
LpL (Chappell DA 1993)	t-PA (Orth K 1992)	Lactoferrina (Meilinger M 1995)
Complexes LpL-lipoproteïnes riques en triglicèrids (Chappell DA 1993)	u-PA (Nykjaer A 1992)	
Lipasa hepàtica (Kounnas MZ 1995)	PAI-1 (Orth K 1992, Nykjaer A 1992)	
Lp (a) (Reblin T 1997)	Els complexes t-PA/PAI, u-PA/PAI i trombina/PAI (Herz J 1992, Nykjaer A 1992, Orth K 1992)	
LDLag (Llorente-Cortés V 2000)	TFPI i el complexe TF-TFPI (Warshawsky I 1996)	
Quilomicrons remanents (Fujioka Y 1998)	MMP-9 (Hahn-Dantona E 2001)	

VLDL: Lipoproteïnes de molt baixa densitat, LpL: Lipoproteïna lipasa, Lp(a): Lipoproteïna a, LDLag: LDL agregades, t-PA: Activador tissular del plasminogen, u-PA: Activador uroquinasa del plasminogen, PAI-1: Inhibidor de l'activador de plasminogen tipus 1, TFPI: Inhibidor de la via del factor tissular, TF-TFPI: complexe del factor tissular amb el TFPI, MMP-9: metal·loproteasa-9.

L'expressió del receptor LRP no és constitutiva i s'ha descrit que la seva expressió està regulada a l'alça pel factor estimulador de colònies de macròfags-1 (CMSF-1) i per la insulina (Hussaini IM 1990, Misra UK 1999), mentre que la seva expressió es veu disminuïda per efecte del TGF- $\beta$ , pel lipopolisacàrid i l'INF- $\gamma$  (LaMarre J 1993, Hussaini IM 1996, Garner B 1997) en MØ. D'altra banda, tot i que el LRP i el rLDL presenten elevada homologia de seqüència, divergeixen en la regió promotora (Herz J 1988, Kütt H 1989). El rLDL així com la resta de gens del metabolisme lipídic (HMGCoA reductasa, HMGCoA sintetasa), presenten en la regió promotora elements regulats per esterols (SRE-1), que

permeten la unió de SREBPs (Brown MS 1997). S'han descrit tres tipus de factors de transcripció diferents que poden unir-se a l'element SRE-1: SREBP-1a, SREBP-1c, i SREBP-2 (Sakai J 1994, 1998). Cal dir però, que el LRP no presenta un element SRE-1 a la regió promotora sinó que s'ha localitzat en una regió no traduïda a 5', fet que explicaria que el LRP no es regula a la baixa per la concentració lipídica intracel·lular, a diferència del rLDL. Aquestes dades suggereixen que el gen del rLDL podria haver evolucionat des de la forma ancestral del gen del LRP de manera que la seqüència de l'element SRE-1 de la regió 5' no traduïda del LRP podria estar relacionada amb l'element SRE-1 localitzat en la regió promotora del gen del rLDL.