

INVESTIGACIÓN BÁSICA

Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en carótida de rata tras denudación endotelial: efecto de las plaquetas y del tratamiento con abciximab

Fernando González-Fernández, Juan Antonio Rodríguez-Feo, Jerónimo Farré*, José Guerra, José Romero*, Juan Gómez, Luis Rico, Rocío Ayala*, Pedro Marcos*, Lourdes Sánchez de Míguel, Santos Casado y Antonio López-Farré

Laboratorio de Nefrología, Hipertensión e Investigación Cardiovascular y *Servicio de Cardiología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

agregación plaquetaria / arterias carótidas / endotelio vascular / estudios experimentales / óxido nítrico / proteínas de matriz extracelular / rata / receptores de citoadhesina / trombosis

Introducción y objetivos. Evidencias funcionales sugieren que la denudación endotelial estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (NOSi), en la pared vascular. Estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la expresión de la NOSi en las células de músculo liso está disminuida en presencia de endotelio. El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de la NOSi tras la denudación endotelial *in vivo*, y el papel de la activación plaquetaria y del abciximab en la expresión de esta proteína.

Materiales y métodos. La denudación endotelial se realizó en la carótida izquierda de ratas Wistar, utilizándose la carótida derecha como control.

Resultados. La NOSi se encontró ligeramente expresada después de la denudación endotelial (6, 24 y 48 h). Puesto que después del daño endotelial se induce la adhesión y agregación plaquetarias, hemos analizado el papel de las plaquetas activadas en la expresión de la NOSi en los dos primeros días después de realizada la angioplastia. En ratas trombocitopénicas observamos una mayor expresión de la NOSi tras la denudación endotelial. Se obtuvieron resultados similares al bloquear la glicoproteína IIB/IIIA (GP IIB/IIIA), en ratas tratadas con abciximab (Reopro).

Conclusiones. La NOSi se expresa tenuemente en la pared arterial tras realizada una denudación endotelial. Las plaquetas a través de un mecanismo dependiente de la GP IIB/IIIA desempeñan un papel importante en la prevención de la expresión de la NOSi después de la denudación endotelial, efecto que se evita con el abciximab.

Palabras clave: Óxido nítrico. Endotelio. Plaquetas. Trombosis.

Correspondencia: Dr. A. López-Farré.
Laboratorio de Nefrología, Hipertensión e Investigación Cardiovascular.
Fundación Jiménez Díaz. Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.
Correo electrónico: alopez@uni.fjd.es

Recibido el 28 de octubre de 1998.

Aceptado para su publicación el 5 de febrero de 1999.

EXPRESSION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE AFTER ENDOTHELIAL DENUDATION OF RAT CAROTID ARTERY: EFFECT OF PLATELETS AND TREATMENT WITH ABCIXIMAB

Background. Functional evidence suggests that endothelial denudation stimulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity in the vascular wall. *In vitro* studies done in our laboratory have shown that iNOS expression in smooth muscle cells is reduced by endothelial cells. The object of this study was to analyze the iNOS protein expression in the arterial wall after *in vivo* deendothelialization, and the role of platelet activation abciximab in the expression of this protein.

Materials and methods. Endothelial denudation was performed in the left carotid artery of Wistar rats. The right carotid artery was used as control.

Results. iNOS protein was only weakly expressed at 6, 24 and 48 hours after endothelial denudation. Since platelet adhesion and aggregation occur early after endothelial damage, we have analyzed the role of activated platelets in iNOS protein expression during the first two days after angioplasty. Early after *in vivo* endothelial injury, thrombocytopenic rats showed a marked iNOS protein expression. Similar results were obtained by blocking the platelet glycoprotein IIB/IIIA in rats treated with abciximab (Reopro).

Conclusions. iNOS protein is weakly expressed in the arterial wall after endothelial denudation. Platelets play a crucial role preventing iNOS protein expression early after endothelial damage through a mechanism that depends on GP IIB/IIIA, an effect that can be avoided with glycoprotein IIB/IIIA blockers, such as abciximab.

Key words: Nitric oxide. Endothelium. Platelets. Thrombosis.

(*Rev Esp Cardiol* 1999; 52: 422-428)

INTRODUCCIÓN

La integridad del endotelio es esencial para conservar la estructura y el funcionamiento normal de la pared vascular. La denudación endotelial estimula la trombogénesis, la activación leucocitaria y su posterior infiltración en la pared vascular, la proliferación de la célula del músculo liso (CMLV), su migración hacia la luz del vaso, y la síntesis de matriz extracelular. Todos estos fenómenos que ocurren también tras realizar una angioplastia con balón, y la implantación de un *stent*, pueden estar implicados en los mecanismos que desencadenan la reestenosis¹⁻⁴.

El óxido nítrico (NO) es una molécula multifuncional que interfiere con los mecanismos anteriormente mencionados activados tras la denudación del endotelio. El NO inhibe la interacción de las plaquetas con la pared vascular, la activación leucocitaria, la proliferación de las CMLV y la síntesis de proteínas de matriz⁵⁻⁸.

El NO se produce mediante el paso de L-arginina a L-citrulina, mediante una serie de sintasas las cuales forman una familia denominada NO sintasas⁹. Hasta el momento se han identificado tres isoformas, que por el orden de su purificación y del aislamiento de su ADN se han denominado: NOS I, constitutiva de tejido neuronal (NOSn); NOS II, inducible por citocinas en macrófagos y CMLV (NOSi), y NOS III, constitutiva de células endoteliales (NOSe). En la pared vascular se expresan dos isoformas de NOS, la NOSe, que se expresa en condiciones normales en la célula endotelial y la NOSi, que no se expresa en condiciones fisiológicas en la pared y cuya expresión en las CMLV aumenta cuando se estimulan estas células con citocinas o endotoxinas⁹.

Joly et al demostraron que las arterias desendotelizadas presentaban una menor respuesta vasoconstrictora, y sugirieron que la denudación endotelial induce la actividad de la NOSi en la pared vascular¹⁰. Estudios *in vitro*, realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que las células endoteliales disminuyen la expresión de NOSi en las CMLV¹¹. Es interesante señalar que la expresión de la NOSi en las CMLV está altamente regulada. Muchos de los factores que regulan la mayor o menor expresión de la NOSi estimulada por citocinas son liberados por las plaquetas¹².

Es interesante señalar que inmediatamente después de denudar el endotelio se activan las plaquetas. En el mecanismo de activación plaquetaria intervienen distintas familias de proteínas expresadas en la superficie plaquetaria. Entre estas proteínas destacan la familia de las integrinas, cuyo principal componente es la glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). El complejo GP IIb/IIIa funciona como receptor del fibrinógeno, fibronectina, factor de Von Willebrand, vitronectina y trombospodina después de la activación de la plaqueta¹³. En la segunda parte de este trabajo se estudió el papel de las plaquetas en la expresión de la NOSi en la pared

vascular tras denudación endotelial analizando la importancia de la GP IIb/IIIa, y de fármacos como el abciximab que bloquean esta glicoproteína.

Por tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos de este estudio han sido: *a*) estudiar la expresión de la NOSi en un modelo de denudación endotelial *in vivo*, realizado en carótida de rata; *b*) analizar el papel de las plaquetas activadas en la expresión de la NOSi en la pared vascular, y *c*) analizar la importancia del uso de antiagregantes plaquetarios como el abciximab, en la expresión de la NOSi en la pared vascular tras la denudación del endotelio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de denudación endotelial *in vivo*

Se realizó un modelo de denudación endotelial estandarizada, y para ello se emplearon ratas Wistar macho de 300 ± 50 g (4-6 meses de edad). La manipulación de los animales se realizó siguiendo las normas aprobadas por el Comité de Investigación Animal de la Fundación Jiménez Díaz.

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia general mediante inyección intraperitoneal de ketamina (6 mg/100 mg de peso) y clorhidrato de 2-(2-6-xilidin)-5,6 dihidro-4-H-1,3 tiazina (23 mg/100 mg de peso). Se disecó la bifurcación interna y externa de la carótida izquierda, y se realizó una pequeña arteriotomía en la carótida externa, insertándose un catéter de balón 2F Fogarty (Baxter, EE.UU.).

El catéter se introdujo en la aorta, 2 cm detrás de la bifurcación de la carótida. A continuación se infló con 0,2 ml de aire, a 6 atmósferas, durante 60 s, y durante el tiempo que duró el inflado se manipuló el balón en sentido rotatorio axial y longitudinal, con el fin de obtener un área vascular de unos 20 mm de denudación endotelial completa. Este procedimiento se repitió 3 veces y posteriormente se retiró el catéter hasta el punto de entrada.

Retirado el balón, se suturó el lugar de la punción carotídea, y los animales se mantuvieron vivos, con una dieta normal a demanda, hasta el sacrificio. La elección del vaso se debe a la facilidad de acceso al mismo, su diámetro, que permite el uso de balones convencionales (2F Fogarty), y su bilateralidad, que permite disponer de una arteria control.

Para prevenir el desarrollo de infecciones, 2 días antes de realizar la denudación las ratas fueron tratadas con 1,17 g de amoxicilina por litro de agua de bebida a demanda y 0,29 g de ácido clavulánico por litro de agua de bebida a demanda. Este tratamiento se continuó hasta que los animales fueron sacrificados.

Las arterias denudadas con el balón se obtuvieron 6, 24 y 48 h tras la denudación endotelial (6 ratas en cada grupo). En todos los experimentos, la arteria carótida derecha contralateral se usó como control. A los tiem-

pos indicados, las ratas de cada grupo fueron anestesiadas y exsanguinadas. Los posibles restos de sangre fueron lavados por perfusión a través de la aorta abdominal con 100 ml de salino isotónico a una presión de 100 mmHg. Inmediatamente después de estas maniobras, ambas carótidas fueron extraídas y congeladas rápidamente en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento.

Expresión de la proteína óxido nítrico sintasa inducible

Se determinó la expresión de la proteína NOSi por la técnica de Western blot. La solubilización de las proteínas se realizó mediante incubación de las muestras con tampón de lisis (0,25 M Cl_2Mg ; 10% glicerol; 5% Nonidet; 0,025 M Hepes; 10^{-4} M PMSF; 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina; 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina A) durante 1 h a 4 °C. Tras la centrifugación a 13.000 rpm a 4 °C durante 5 min se determinó la concentración de proteínas de las muestras mediante el método de Bradford. Las proteínas se mezclaron con solución de Laemmli¹⁴ conteniendo 2- β -mercaptoetanol.

Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de 10% de poliacrilamida (15 $\mu\text{g/línea}$), transfiriéndose a unas membranas de nitrocelulosa (Immobilon-P, Millipore). Estas membranas se bloquearon mediante incubación a 4 °C durante toda la noche con 5% de albúmina en TBS-T (20 mM Tris-ClH; 137 mM ClNa; 0,1% Tween 20). El análisis de Western blot se hizo con un anticuerpo monoclonal anti-NOSi (Transduction Laboratories, Lexington). Para ello las membranas se incubaron con el primer anticuerpo (1:2.500) durante 1 h a temperatura ambiente y después de sucesivos lavados, se expusieron a un segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa) a una dilución de 1:1.500 durante 1 h a temperatura ambiente. La proteína específica correspondiente a la NOSi se detectó mediante el revelado de las membranas por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y se evaluó la expresión de la proteína por densitometría (Molecular Dynamics). Para la determinación del peso molecular se usaron proteínas como marcadores del peso molecular (Sigma Chemicals).

Para determinar la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-NOSi se hicieron dos comprobaciones. En primer lugar, se analizó la reactividad cruzada del anticuerpo contra la isoforma NOSe usando homogenizados de células endoteliales (CE) de rata y de aorta bovina. Los cultivos de CE de rata se realizaron según el método de McGuire et al¹⁵.

La segunda comprobación de la especificidad del anticuerpo contra la NOSi fue la reacción de reconocimiento con el control positivo obtenido de un homogenado de macrófagos de rata activados con lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli*.

Producción de un suero antiplaquetas de rata

La sangre de 6 ratas fue recogida en una solución al 10% (v/v) de ácido-citrato-dextrosa y centrifugada a 1.000 rpm durante 30 min, a temperatura ambiente, recogiendo de esta forma el plasma rico en plaquetas (PRP)¹⁶. Las plaquetas fueron obtenidas de ratas Wistar control y se homogeneizaron en el adyuvante de Freund. A continuación se inyectaron de forma subcutánea a un conejo New Zealand White. El plasma del conejo se recogió por plasmaféresis 10 días después de la segunda inmunización. Un suero no inmune, obtenido de conejos que no habían sido inmunizados, se obtuvo también como control (grupo IgG).

Las ratas se dividieron en dos grupos de 6 ratas cada uno, a un grupo se les inyectó el suero antiplaquetas (acAP) y al otro el suero control (IgG), 30 mg/100 mg de peso, 24 h antes de la intervención. Esta dosis de suero acAP produce una grave trombocitopenia, encontrándose recuentos de plaquetas menores de 10.000 células/ μl a las 24 h de inyectado el suero, lo que representa una reducción del 85% ($p < 0,01$) con respecto a las cantidades de plaquetas de las ratas tratadas con el suero IgG. Las arterias dañadas se recogieron 6, 24 y 48 h después de la denudación endotelial.

Bloqueo de los receptores de la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria

Se administró a un grupo de 6 ratas abciximab (Reopro, Eli Lilly y Centocor, Leiden Holanda), un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal c7E3 de la quimera humano-ratón, que se une al receptor de la glicoproteína IIb/IIIa de la plaqueta, impidiendo su unión. Administramos el abciximab como un bolo intravenoso (500 mg/kg de peso) inmediatamente antes de la desendotelización, seguida de una infusión continua de 10 mg/kg de peso, durante 60 min después de la intervención. Un grupo de 6 ratas tratado con una IgG no específica administrada de la misma forma y dosis que el abciximab se usó como control. Las carótidas dañadas se recogieron 24 h después de la denudación.

Agregación plaquetaria ex vivo

Se evaluó la agregación plaquetaria en respuesta al ADP para comprobar el grado del bloqueo del receptor GP IIb/IIIa inducido por el tratamiento con abciximab. Para ello, 6 ratas fueron infundidas con abciximab siguiendo la misma pauta que la descrita en el caso de las ratas a las que se denudó de endotelio. Inmediatamente después de administrar el fármaco en una infusión durante 60 min, se recogió la sangre y se obtuvo el plasma rico en plaquetas (PRP) como se describió anteriormente¹⁶. Se realizó en forma paralela en sangre de 6 ratas a las que se administró una IgG no específica. Se ajustó el número de plaquetas de cada rata a 2,5

$\times 10^8$ células/ml. La activación plaquetaria fue medida utilizando un agregómetro (Chronolog, 2 canales). Previamente una muestra pobre en plaquetas se usó como control para establecer el 100% de transmisión de la luz. El PRP (500 μ l) fue incubado a 37 °C en el agregómetro con agitación continua (1.000 rpm) y se estimuló con ADP (10^{-6} mol/l). Para normalizar las medidas, sólo se consideró el valor obtenido a los 3 min de añadir el estímulo, que es cuando se alcanza el máximo de agregación.

Análisis estadístico

Los resultados cuantitativos se expresan como media \pm error estándar de la media ($\bar{X} \pm$ EEM). Cada resultado corresponde a un mínimo de 6 animales, excepto que se especifique otro valor. Para determinar la significación estadística de nuestros resultados, se realizó un análisis de variancia con prueba de Bonferroni para las comparaciones múltiples o el test de la t de Student, de forma apareada o no apareada, según cada caso. En todos los casos, se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas si la p era menor de 0,05. Las pruebas estadísticas se efectuaron mediante el programa Sigma (Horus, Madrid).

RESULTADOS

Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en carótidas desendotelizadas in vivo

Tras realizar la denudación endotelial, observamos una débil expresión de la NOSi a las 6, 24 y 48 h (figs. 1a y b).

La expresión de la NOSi en la carótida desendotelizada con balón fue, sin embargo, más alta que en la carótida contralateral no dañada, ya que en las carótidas con endotelio intacto no se observó expresión de la NOSi (datos no expuestos).

Efecto de las plaquetas en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible después de la denudación in vivo

Hemos examinado el papel de las plaquetas en la limitación de la expresión de la NOSi en las primeras horas después de la denudación endotelial. Para ello, repetimos el experimento de denudación endotelial carotídea en ratas trombocitopénicas y en ratas control tratadas con un anticuerpo no específico. Se observó que las carótidas de las ratas tratadas con el acAP presentaban una elevada expresión de la NOSi tanto a las 6 como a las 24 y a las 48 h, mientras que a estos mismos tiempos las carótidas de las ratas tratadas con la IgG no específica sólo tenían una ligera expresión de la NOSi. Dentro del grupo de ratas tratadas con el anticuerpo acAP, la expresión de la

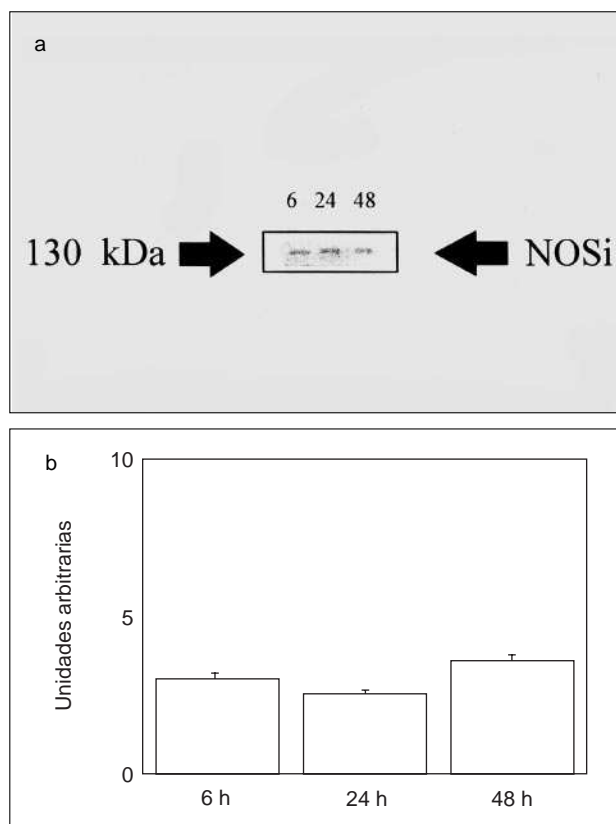


Fig. 1. a: Western blot representativo en el que se observa la expresión de la NOSi en las carótidas desendotelizadas 6, 24 y 48 h después de realizada la angioplastia; b: análisis densitométrico del Western blot. Los resultados se expresan como media \pm EEM de 6 ratas diferentes en cada grupo.

NOSi fue más evidente a las 24 y a las 48 h después de realizada la denudación endotelial que a las 6 h (figs. 2a y b).

Efecto del bloqueo de la glicoproteína IIb/IIIa en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible después de la denudación endotelial

Para determinar cómo las plaquetas producían una disminución en la expresión de la NOSi, recurrimos a bloquear el receptor de la GP IIb/IIIa. El bloqueo del receptor GP IIb/IIIa con el abciximab aumentó la expresión de la NOSi después de producido el daño. El tratamiento con la IgG no específica no modificó significativamente la expresión de la NOSi, 24 h después de realizada la denudación endotelial, al compararla con la expresión observada en ratas no tratadas con el abciximab (figs. 3a y b).

El bloqueo de los receptores GP IIb/IIIa por el abciximab se demostró por agregometría, puesto que el tratamiento con el fármaco bloqueaba completamente la agregación en respuesta al ADP, cosa que no ocurría en las ratas que habían sido tratadas con una IgG no específica (ratas tratadas con IgG 50 ± 2 , ratas tratadas

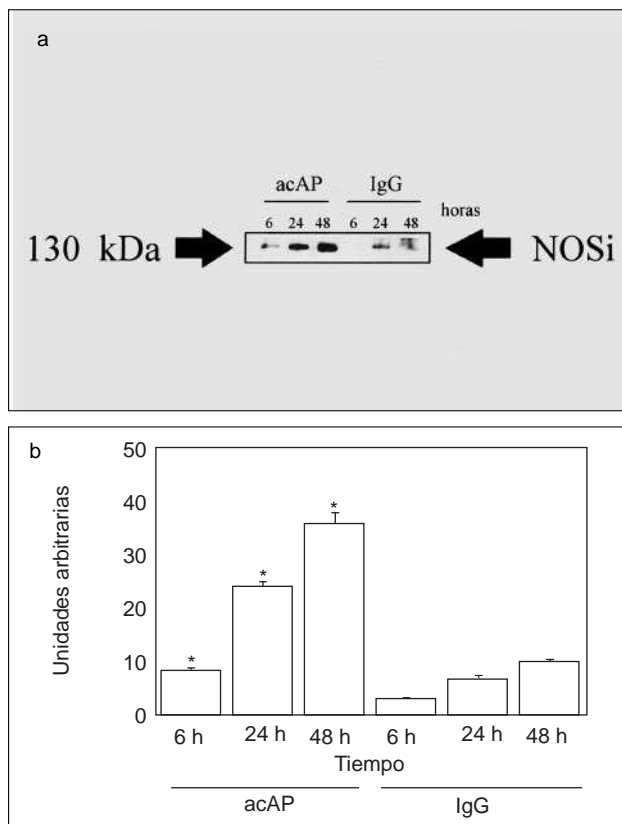


Fig. 2. a: Western blot representativo en el que se observa la expresión de la NOSi 6, 24 y 48 h después de producido el daño endotelial. A las ratas se les inyectó una IgG antiplaquetas (acAP) o una IgG control antes de producir la denudación del endotelio; b: análisis densitométrico del Western blot. Los resultados se representan como media \pm EEM de 6 ratas diferentes en cada grupo experimental; * $p < 0,05$ con respecto a los mismos tiempos de ratas tratadas con una IgG no específica.

con abciximab 7 ± 3 ; $n = 6$; en porcentaje de transmisión de luz, $p < 0,01$).

DISCUSIÓN

Este estudio pone de manifiesto que la proteína NOSi se expresa débilmente en la pared arterial en las primeras horas después de la denudación del endotelio, y que las plaquetas desempeñan un papel fundamental en esta limitada expresión de NOSi tras el daño endotelial.

Nuestros hallazgos difieren de los de Hansson et al quienes, también en carótida de rata, observaron una elevada expresión de NOSi poco tiempo después de producir el daño endotelial¹⁷. Tras la denudación endotelial, las células sanguíneas circulantes se activan y son reclutadas hacia el sitio dañado, donde comienzan a liberar diferentes mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas¹⁸. Por otra parte, las CMLV afectadas pueden ser también fuente de citocinas, por tanto, en el ambiente vascular va a existir una gran concentra-

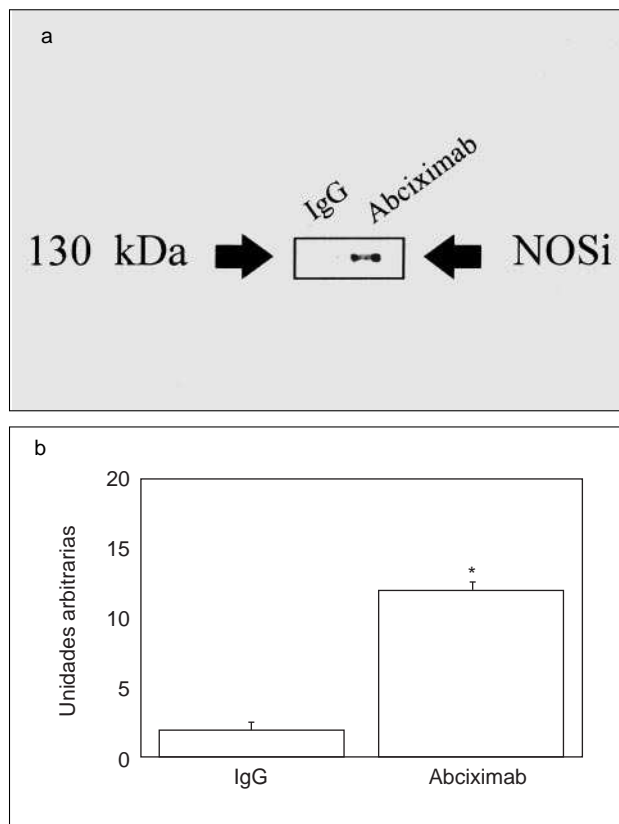


Fig. 3. a: Western blot representativo en el que se observa la expresión de la NOSi en carótidas desendotelizadas de ratas 24 h después de realizada la denudación endotelial que fueron tratadas con abciximab, o en ratas tratadas con una IgG no específica; b: análisis densitométrico del Western blot. Los resultados se representan como media \pm EEM de 6 ratas diferentes en cada grupo experimental; * $p < 0,05$ con respecto a las ratas tratadas con una IgG no específica.

ción de citocinas capaces de estimular la expresión de la NOSi^{19,20}. Por otro lado, el promotor del gen de la NOSi tiene un elemento de respuesta a variaciones del flujo sanguíneo, que podría ser estimulado después de dañar el vaso²¹. Teniendo en cuenta todos estos datos, en los primeros tiempos después de realizada la angioplastia hubiéramos esperado encontrar una alta expresión de la NOSi. Sin embargo, y sorprendentemente, nosotros hemos observado que la expresión de la NOSi durante las primeras 48 h después de la denudación endotelial es muy pequeña.

La aparición de la expresión y de la actividad de la NOSi, tanto in vivo como in vitro, en los estudios previamente publicados por otros autores^{10,17} podría deberse a la presencia de endotoxemia después de la intervención quirúrgica o a endotoxinas contenidas en el medio de incubación, ya que estos autores no mencionan el uso de ningún tratamiento antibacteriano. En nuestro estudio, las ratas recibieron un tratamiento profiláctico con antibióticos y, de esta forma, quedaba descartada la posible presencia de NOSi debida a una cierta endotoxemia.

Existen dos evidencias indirectas que apoyan nuestros resultados. Teniendo en cuenta que el NO es un potente inhibidor de la proliferación de la CMLV, por un lado, Dzau et al han demostrado recientemente que la transfección in vivo del ADNc de la isoforma NOSe, justo después de la denudación endotelial producida por balón, redujo el crecimiento neointimal hasta en un 70%²². Lógicamente, y debido a que la actividad NOSi genera cantidades mucho más elevadas de NO que las generadas por la actividad NOSe, la liberación de NO por parte de la NOSe no sería necesaria para reducir el crecimiento neointimal. Indirectamente los hallazgos de Dzau et al apoyan la débil expresión de la NOSi encontrada en nuestro estudio, tras la angioplastia.

Por otro lado, otros autores como Watkins et al bloqueando la producción de NO endógeno, mediante el uso de un antagonista de la L-arginina inmediatamente después de realizada la denudación endotelial, observaron que no se modificaba el engrosamiento neointimal²³. Esto podría deberse a que al no existir actividad óxido nítrico sintasa inmediatamente después de la desendotelización el bloqueo de la generación de NO no afectará los mecanismos involucrados en el crecimiento neointimal.

Papel de las plaquetas en la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible: importancia de los receptores

La alteración de la integridad endotelial en los vasos sanguíneos produce una rápida activación de las plaquetas. Se ha demostrado que la denudación endotelial producida por balón estimula la adhesión y la agregación plaquetarias en tan sólo unos minutos y que, sin embargo, las plaquetas desaparecen de la superficie arterial unos días después del daño. Por todo esto nos propusimos analizar si las plaquetas activadas podrían estar implicadas en la modesta expresión de la NOSi observada en los primeros momentos tras el daño endotelial, y elegimos tres tiempos (6 h, 24 h y 48 h), para seguir el desarrollo de esta expresión.

Analizamos si las plaquetas regulaban in vivo la expresión de la NOSi, y para esto se realizó la denudación endotelial en ratas a las que se las había hecho deficientes en plaquetas mediante la administración de suero enriquecido en anticuerpo antiplaqueta. Al realizar la denudación endotelial en las ratas trombocitopénicas se observó un aumento en la expresión de la NOSi en los primeros tiempos después de producido el daño.

La estimulación de las plaquetas produce una mayor exposición y una mayor activación de los receptores GP IIb/IIIa de la superficie plaquetaria²⁴. En la última parte de nuestro trabajo nos planteamos estudiar si el bloqueo in vivo de los receptores GP IIb/IIIa de la plaqueta favorecería la expresión de la NOSi en los pri-

meros tiempos después de la denudación endotelial. Observamos que el bloqueo de los receptores GP IIb/IIIa mediante la administración de Reopro, además de inhibir la agregación plaquetaria ex vivo, estimulaba la expresión de la NOSi en las arterias desendotelizadas por balón. Estos resultados apoyan la implicación directa de las plaquetas activadas en la inhibición de la expresión de la NOSi, inmediatamente después de la angioplastia. En este punto cabría señalar que las dosis de abciximab utilizadas en este estudio son mayores que las terapéuticas que se usan en humanos. Se realizarán futuros estudios con dosis menores de abciximab, para dilucidar si con dosis terapéuticas de este fármaco se obtienen los mismos resultados.

Kaida et al utilizando un antagonista del GP IIb/IIIa evaluaron la formación neointimal 2 semanas después de realizar la denudación del endotelio en carótida de hámster. Estos autores observaron que la infusión del antagonista reducía significativamente el engrosamiento neointimal²⁵. Fingerle et al demostraron que la depleción de las plaquetas circulantes reduce el tamaño de la lesión intimal después del daño por balón, sugiriendo que las plaquetas activadas desempeñan un papel relevante en la formación neointimal²⁶.

En la reducción del engrosamiento neointimal encontrado en estos trabajos podría ser importante la mayor capacidad de la pared vascular para generar NO, al inhibir la actividad plaquetaria. En este sentido, hay que recordar una vez más que el NO es un potente inhibidor de la proliferación de las CMLV y de la generación de proteínas de la matriz extracelular. No obstante, serán necesarios experimentos específicos en los que se administre el anticuerpo anti-GP IIb/IIIa y se bloquee la capacidad de la pared vascular de generar NO, mediante el empleo de antagonistas de la L-arginina para poder determinar el papel del NO en los efectos de los inhibidores del GP IIb/IIIa sobre estos mecanismos. En este sentido, cabría recordar que en la activación plaquetaria se liberan diferentes factores de crecimiento que posteriormente podrían estar de alguna manera involucrados en los mecanismos de formación de la neointima.

El efecto beneficioso o perjudicial de la actividad NOSi después de la denudación endotelial deberá también ser estudiado. El NO inhibe la proliferación de la CMLV y la síntesis de matriz extracelular^{5,8}, lo que podría prevenir la formación neointimal. No obstante, el NO es una molécula citotóxica para las células endoteliales²⁷ y también inhibe su crecimiento²⁸. La rápida reendotelización del vaso dañado es un fenómeno crítico para bloquear la formación neointimal²⁹. Sin embargo, la generación continua de NO por la NOSi hace que el sistema del NO en la CE se vea afectado, con lo que se especula que se podría proteger la pared vascular de excesivas cantidades de NO.

En conclusión, se produce una pequeña expresión de la NOSi en las carótidas de las ratas desendoteliza-

das inmediatamente después de la intervención. En los primeros momentos, las plaquetas parecen desempeñar un papel crucial en la modulación negativa de la expresión de la NOSi en la pared vascular dañada. En este sentido, parece tener una implicación directa la activación de los receptores GP IIb/IIIa. Se necesitan más estudios para determinar si los efectos protectores de la terapia antiplaquetaria en los síndromes coronarios agudos son parcialmente debidos a su capacidad para aumentar la expresión de la NOSi en los primeros momentos después de la denudación endotelial.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por Laboratorios Lacer SA. Los Dres. González-Fernández, Rodríguez-Feo y Guerra son becarios de la Fundación Conchita Rábago de la Fundación Jiménez Díaz. La Dra. Sánchez de Miguel es becaria de los laboratorios Bayer. Agradecemos a Eli-Lilly el suministro del abciximab, y a María Begoña Ibarra sus trabajos de secretaría.

BIBLIOGRAFÍA

- Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 819-824.
- Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983; 49: 327-333.
- Liu MW, Roubin GS, King SB. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989; 79: 1.374-1.387.
- Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest* 1975; 32: 339-351.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-141.
- López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M et al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil: role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995; 91: 2.080-2.088.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 587-590.
- Trachtman H, Futterweit S, Singhal P. Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207: 120-125.
- Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994; 31: 131-143.
- Joly GA, Schini VB, Vanhoutte PM. Balloon injury and interleukin-1 β induce nitric oxide synthase activity in rat carotid arteries. *Cir Res* 1992; 71: 331-338.
- Montón M, López-Farré A, Mosquera JR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, Sierra MP et al. Endogenous angiotensin II produced by endothelium regulates interleukin-1 β -stimulated nitric oxide generation in rat isolated vessels. *Hypertension* 1997; 30: 1.191-1.197.
- Durante W, Schini VB, Kroll MH, Catovsky S, Scott-Burden T, White JG et al. Platelets inhibit the induction of nitric oxide synthesis by interleukin-1 β in vascular smooth muscle cells. *Blood* 1994; 83: 1.831-1.838.
- Packham MA. Role of platelets in thrombosis and haemostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 278-284.
- Laemmli NK. Change of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- McGuire PG, Orkin RW. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrates. *Lab Invest* 1987; 57: 94-104.
- Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour JG. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1.185-1.191.
- Hansson GK, Geng YJ, Holm J, Hardhammar P, Wennmalm A, Jennische E. Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *J Exp Med* 1994; 180: 733-738.
- Shirotani M, Yui Y, Kawai C. Restenosis after coronary angioplasty: pathogenesis of neointimal thickening initiated by endothelial loss. *Endothelium* 1993; 1: 5-22.
- Warner SJ, Libby P. Human vascular smooth muscle cells: target for and source of tumor necrosis factor. *J Immunol* 1989; 142: 100-109.
- Schini VB, Junquero DC, Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Interleukin-1 induces the production of an L-arginine derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 114-121.
- Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 802-807.
- Von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1.137-1.141.
- Watkins RW, Pula K, Cook J, Hoos L, McLeod R, Prioli NA et al. NG-nitro-L-arginine methyl ester does not affect balloon catheter-induced intimal hyperplasia in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 304-309.
- Plow EF, Ginsberg MH. The molecular basis of platelet function. En: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, editores. *Haematology. Basis, Principles and Practice*. Nueva York. Churchill Livingstone, 1991; 1.165-1.176.
- Kaida T, Matsuno H, Niwa M, Miyata H, Uematsu T. Antiplatelet effect of FK633, a platelet glycoprotein IIb-IIIa antagonist, on thrombus formation and vascular patency after thrombolysis in the injured hamster carotid artery. *Thromb Haemostasis* 1997; 77: 562-567.
- Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, Majesky MW, Reidy MA. Role of platelets in smooth muscle cells proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8.412-8.416.
- Palmer RM, Bridge L, Foxwell NA, Moncada S. The role of nitric oxide in endothelial damage and its inhibition by glucocorticoids. *J Pharmacol* 1992; 105: 11-12.
- López-Farré A, Sánchez de Miguel L, Caramelo C, Gómez-García J, García R, Mosquera JR et al. Role of nitric oxide in the autocrine control of growth and apoptosis of endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 272: H760-H768.
- Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995; 91: 2.793-2.801.