

# **UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**«Inducción de fenómenos proliferativos,  
angiogénicos, de regresión vascular e  
involutivos en el engrosamiento intimal y su  
entorno arteriovenoso. Estudio experimental»**

**Autor: José Antonio Saavedra Arcas  
Director: Dr. D. Lucio Díaz-Flores Feo  
Dr. D. Ricardo Gutiérrez García**

**Departamento de Anatomía Patológica**

**LUCIO DÍAZ-FLORES FEO**, CATEDRÁTICO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y ACTUAL DECANO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**CERTIFICA QUE:** D. José Antonio Saavedra Arcas, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "INDUCCIÓN DE FENÓMENOS PROLIFERATIVOS, ANGIOGÉNICOS, DE REGRESIÓN VASCULAR E INVOLUTIVOS EN EL ENGROSAMIENTO INTIMAL Y SU ENTORNO ARTERIOVENOSO. ESTUDIO EXPERIMENTAL".

Revisado el presente trabajo y por creer que reúne las condiciones necesarias, estimamos que puede ser presentado como Tesis Doctoral.

La Laguna, Diciembre de 1999

**D. RICARDO GUTIÉRREZ GARCÍA**, PROFESOR TITULAR DE HISTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**CERTIFICA QUE:** D. José Antonio Saavedra Arcas, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "INDUCCIÓN DE FENÓMENOS PROLIFERATIVOS, ANGIOGÉNICOS, DE REGRESIÓN VASCULAR E INVOLUTIVOS EN EL ENGROSAMIENTO INTIMAL Y SU ENTORNO ARTERIOVENOSO. ESTUDIO EXPERIMENTAL".

Revisado el presente trabajo y por creer que reúne las condiciones necesarias, estimamos que puede ser presentado como Tesis Doctoral.

La Laguna, Diciembre de 1999

## AGRADECIMIENTOS

Antes de comenzar con la presentación del presente trabajo de Tesis Doctoral quisiera expresar mi agradecimiento a las personas que de una manera u otra han contribuido en su realización.

En primer lugar al Profesor D. José Antonio Saavedra Martínez-Barona y a Dña. Margarita Arcas Cuenca por su incondicional apoyo y guía. La conducta profesional de mis padres y sus valores humanos siempre han sido un ejemplo a seguir y un estímulo. Mi agradecimiento también al Profesor D. Lucio Díaz-Flores Feo, por su magnífica dirección y por su disponibilidad permanente, incluso en los momentos en que su cargo de Decano de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna más atención requerían. Con constancia y humanidad me ha enseñado la gran dedicación que nuestro trabajo requiere.

Mi relación con el Profesor D. Ricardo Gutiérrez García se prolonga desde la realización de la Tesina de Licenciatura. Todo el tiempo trabajado bajo su codirección, además de su actitud ante las muchas vicisitudes, han fortalecido una amistad y mi admiración hacia su persona.

Quisiera mencionar también mi gratitud hacia el Profesor D. Francisco Valladares Parrilla, por su inestimable ayuda en la realización de la parte técnica y por su grata erudición musical, y hacia Dña. Marta Coloma Escribano por su apoyo y delicadeza en la realización de las ilustraciones.

No podría culminar estos agradecimientos sin mencionar a todo el personal del Departamento de Anatomía Patológica, sin cuyo quehacer diario no habría sido posible este Trabajo de Tesis Doctoral, y a nuestras familias, que con paciencia y cariño han sabido perdonar nuestras constantes faltas de atención. A todos ellos gracias.

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>ENGROSAMIENTO INTIMAL .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	DEFINICIÓN Y APARTADOS.....	1
1.1.2	ÍNTIMA ARTERIAL .....	2
1.1.3	ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS DEL GROSOR INTIMAL: ENGROSAMIENTO INTIMAL EXCÉNTRICO Y DIFUSO .....	3
1.1.4	CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS DEL ENGROSAMIENTO INTIMAL ADAPTATIVO .....	4
1.1.5	CAUSAS HEMODINÁMICAS DEL ENGROSAMIENTO INTIMAL ADAPTATIVO .....	6
1.1.6	RELACIÓN ENTRE ENGROSAMIENTO INTIMAL Y ATEROSCLEROSIS .	7
1.1.7	MODELOS ANIMALES DE ENGROSAMIENTO INTIMAL.....	8
1.1.8	CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y BIOQUÍMICAS DEL ENGROSAMIENTO INTIMAL ARTERIAL .....	11
1.1.8.1	Tipos celulares de la íntima arterial.....	11
1.1.8.2	Matriz de la íntima arterial.....	19
1.1.8.3	Componentes plasmáticos.....	24
1.1.9	CRONOLOGÍA DEL ENGROSAMIENTO INTIMAL. ....	26
1.1.9.1	Mitógenos de la primera fase. ....	26
1.1.9.2	Segunda fase: Factores de migración.....	30
1.1.9.3	Mitógenos de la tercera fase.....	33
1.1.10	ENGROSAMIENTO INTIMAL HIPOTESIS ACERCA DE SU CRECIMIENTO.....	34
<b>1.2</b>	<b>ANGIOGÉNESIS .....</b>	<b>36</b>
1.2.1	ANGIOGÉNESIS. METODOS DE ESTUDIO .....	37
1.2.1.1	Técnicas “in vivo” .....	37
1.2.1.2	Técnicas in vitro.....	39
1.2.2	FENÓMENOS ANGIOGÉNICOS.....	41

1.2.2.1	Regiones del árbol vascular con capacidad angiogénica .....	41
1.2.3	SECUENCIA TEMPORAL DE LA ANGIOGÉNESIS .....	41
1.2.3.1	Angiogénesis. Descripción morfológica .....	42
1.2.3.2	Fenómenos inflamatorios asociados a la angiogénesis .....	43
1.2.3.3	Activación de células endoteliales y pericitarias .....	44
1.2.3.4	Degradación de la membrana basal .....	45
1.2.3.5	Migración endotelial .....	46
1.2.3.6	Proliferación de células endoteliales .....	47
1.2.3.7	Formación de la neoluz capilar .....	48
1.2.3.8	Papel de los pericitos en la angiogénesis .....	49
1.2.3.9	Matriz extracelular y neomembrana basal .....	51
1.2.3.10	Formación de redes capilares .....	52
1.2.3.11	Cambios en los vasos neormados. Persistencia, involución y diferenciación .....	53
1.2.3.12	Formación definitiva de la red microvascular. Modulación de los neovasos	54
1.2.4	CONTROL DE LA ANGIOGÉNESIS .....	55
1.2.5	FACTORES ANGIÓGENICOS .....	56
<b>1.3</b>	<b>PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>58</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>59</b>
2.1.1	ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN. ....	59
2.1.2	INSTRUMENTAL QUIRÚRGICO. ....	59
2.1.3	MICROSCOPIO QUIRÚRGICO. ....	60
2.1.4	ANESTESIA. ....	60
<b>2.2</b>	<b>MÉTODO.....</b>	<b>62</b>
2.2.1	SERIES EXPERIMENTALES.....	62
2.2.2	DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS TÉCNICAS QUIRÚRGICAS EMPLEADAS.....	64

2.2.2.1	Serie I: segmento de arteria femoral entre doble ligadura con conservación o no de la adventicia .....	65
2.2.2.2	Serie II: segmento de arteria femoral con ligadura única distal y conservación o no de la adventicia .....	66
2.2.2.3	Serie III: segmento de arteria femoral con doble ligadura puncionado y conservación o no de la adventicia .....	66
2.2.2.4	Serie IV: segmento de arteria femoral con ligadura única distal puncionado y conservación o no de la adventicia .....	67
<b>2.3</b>	<b>TÉCNICA HISTOLÓGICA.....</b>	<b>68</b>
2.3.1	MICROSCOPIA ÓPTICA .....	68
2.3.1.1	Técnicas histológicas para microscopía óptica convencional .....	68
2.3.1.2	Tinciones histológicas.....	69
2.3.2	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	76
2.3.2.1	Obtención de las muestras.....	76
2.3.2.2	Procesamiento .....	76
2.3.2.3	Inclusión.....	76
2.3.2.4	Postfijación.....	77
2.3.2.5	Deshidratación de los tejidos.....	78
2.3.2.6	Inclusión en resina .....	78
2.3.2.7	Realización de las pirámides .....	79
2.3.2.8	Preparación de los cortes semifinos.....	79
2.3.2.9	Preparación y estudio de los cortes ultrafinos .....	80
2.3.3	INMUNOHISTOQUIMIA.....	81
2.3.3.1	Portas gelatinados .....	81
2.3.3.2	Técnica (complejo avidina-biotina (ABC)).....	82
<b>2.4</b>	<b>ESTUDIOS CUANTITATIVOS .....</b>	<b>83</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>84</b>

<b>3.1</b>	<b>SERIE I: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA .....</b>	<b>84</b>
3.1.1	SUBSERIE I A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA CON CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA.....	84
3.1.1.1	Descripción macroscópica: .....	84
3.1.1.2	Descripción microscópica: .....	85
3.1.2	SUBSERIE I B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA.....	91
<b>3.2</b>	<b>SERIE II: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA .....</b>	<b>92</b>
3.2.1	SERIE II A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA DISTAL ÚNICA Y CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA. ....	92
3.2.1.1	Descripción macroscópica: .....	92
3.2.1.2	Descripción microscópica: .....	93
3.2.2	SUBSERIE II B: SEGMENTO ARTERIAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA. ....	96
<b>3.3</b>	<b>SERIE III: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA PUNCIÓNADO CON Y SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA .....</b>	<b>97</b>
3.3.1	SUBSERIE III A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA PUNCIÓNADO CON CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA .....	97
3.3.1.1	Descripción macroscópica: .....	97
3.3.1.2	Descripción microscópica: .....	98
3.3.2	SUBSERIE III B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA PUNCIÓNADO SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA .....	100
<b>3.4</b>	<b>SERIE IV: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL PUNCIÓNADO Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA .....</b>	<b>101</b>



3.4.1	SUBSERIE IV A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL PUNCIÓNADO Y CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA .....	101
3.4.1.1	Descripción macroscópica: .....	101
3.4.1.2	Descripción microscópica: .....	102
3.4.2	SUBSERIE IV B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA DISTAL ÚNICA PUNCIÓNADO SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA .....	105
<b>4</b>	<b><u>DISCUSIÓN.....</u></b>	<b>106</b>
<b>5</b>	<b><u>CONCLUSIONES.....</u></b>	<b>126</b>
<b>6</b>	<b><u>BIBLIOGRAFÍA.....</u></b>	<b>131</b>

# **1 INTRODUCCIÓN**

## **1.1 ENGROSAMIENTO INTIMAL**

### **1.1.1 DEFINICIÓN Y APARTADOS**

El engrosamiento intimal constituye una lesión extensa, sin una repercusión clínica significativa, que afecta a los vasos arteriales; pero, sin embargo, de gran interés, por ser considerada precursora de la placa aterosclerótica.

Con la finalidad expuesta en los apartados iniciales del presente trabajo, describiremos el engrosamiento intimal, estableciendo su definición, características, tipos, influencia en su génesis de la hemodinámica, relación con la aterosclerosis e histología. En este último aspecto tendremos en cuenta las células endoteliales y musculares lisas, la presencia de otras células y las características de la matriz intersticial.

### **1.1.2 ÍNTIMA ARTERIAL**

La íntima se define como la región de la pared arterial comprendida entre la luz vascular, incluyendo, por tanto, a la superficie endotelial, y la lámina elástica interna, la cual forma el margen luminal de la capa media (STARY Y COLS. 1992).

En algunos segmentos arteriales de transición, como bifurcaciones, ramificaciones y curvaturas, este límite desaparece, siendo, por tanto, difícil reconocer dónde empieza la media o acaba la íntima. En otras palabras, la reorganización estructural normal de la pared arterial puede solaparse o fusionarse con regiones de engrosamiento intimal debido a adaptaciones fisiológicas. Dichas reorganizaciones estructurales incluyen un engrosamiento de la íntima profunda (capa musculoelástica) y de la parte interna de la media adyacente a ésta, dando la impresión de que la íntima y la media forman un bloque continuo. Evidentemente, las capas se diferencian cuando las arterias se estudian utilizando los métodos histoquímicos apropiados.

El grosor de la íntima no es uniforme, por lo que el criterio de espesor normal se basa en un rango expresado cuantitativamente como la razón íntima-media, que varía, por lo general, entre 0.1 y 1.0.

Segmentos engrosados de la íntima aparecen en arterias de sujetos sanos de todas las edades e incluso de otras especies animales. Estos segmentos representan adaptaciones fisiológicas a cambios en el flujo y en la

tensión mural pudiendo adquirir una distribución focal (excéntrica) o más extensa (difusa).

### **1.1.3 ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS DEL GROSOR INTIMAL: ENGROSAMIENTO INTIMAL EXCÉNTRICO Y DIFUSO**

El engrosamiento intimal es considerado como una adaptación fisiológica al estrés de la pared vascular (Zarins et al. 1983), que no llega jamás a ocluir por completo la luz del vaso (Stary et al 1992), aunque sí produce un endurecimiento de la pared arterial, con el fin de mantener la tensión arterial dentro de unos límites normales.

Se han efectuado descripciones del engrosamiento intimal durante diferentes etapas de la vida, incluyendo desde la aorta fetal humana (Thoma 1883, 1920), pasando por las observaciones en arterias coronarias humanas, (Velican y Velican 1977; Stary 1987a) y la aorta humana adulta (Wilens, 1951; Movat et al., 1958).

#### **1.1.4 CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS DEL ENGROSAMIENTO INTIMAL ADAPTATIVO**

En el momento del nacimiento, la íntima de las arterias humanas consiste únicamente en una capa de células endoteliales, la cual descansa directamente sobre la lámina elástica interna. Sin embargo, en las etapas tempranas de la vida, las C.M.L. aparecen entre las células endoteliales y la lámina elástica interna, en gran número de arterias de gran calibre. Incluso, en el origen de la coronaria izquierda o del ductus arterioso, están presentes desde el momento del nacimiento, orientándose perpendicularmente a las localizadas en la media, con fibras de colágeno y elastina rodeándolas..

En función de su disposición en la pared arterial se reconocen dos grandes tipos: excéntrico o focal y concéntrico o difuso, que, en ocasiones, aparecen contiguos o incluso solapados en el mismo segmento arterial.

El engrosamiento intimal excéntrico, descrito en las arterias coronarias, carótidas, cerebrales, renales y uterinas fundamentalmente, aparece como un aumento focal del espesor de la íntima, en relación con ramificaciones y orificios. Puede representar hasta el 50% del diámetro externo de las arterias secundarias en algunas bifurcaciones, extendiéndose tanto proximal como distalmente al lugar donde el flujo se divide. Histológicamente aparece como un crecimiento intimal estratificado.

En la literatura el engrosamiento intimal excéntrico ha recibido diversos nombres, tales como almohadillado intimal (Robertson 1960; Pflieger y Goertler 1970), almohadillado de células fusiformes (Stehbens 1960), almohadilla intimal (Stehbens 1960), placa musculoelástica (en babuinos)

(McGill et al. 1960), placa fibrosa localizada (Moon 1957), placa fibromuscular mucoide (McMillan 1965), masa de células intimales normales (en cisnes) (Kim et al. 1984; Imai et al. 1985), e hiperplasia focal intimal (Glagov y Zarins 1989).

El engrosamiento difuso presenta un patrón de adaptación diseminado y con frecuencia circunferencial, no guardando relación exacta con la morfología y distribución geográfica de las arterias. Por ello, su descripción sólo puede realizarse con el estudio de regiones completas de los vasos arteriales.

Al microscopio óptico se distinguen fácilmente en él dos capas, dependiendo de la proporción de las C.M.L. y de las características del componente intercelular.

La porción subluminal muestra tejido conectivo reticular no fibroso rico en proteoglicanos (Wight y Ross 1975; Richardson et al. 1988). Entre las escasas fibras, las C.M.L. pertenecen tanto al fenotipo rico en RER (fenotipo sintético) como al rico en miofilamentos (fenotipo contráctil). La porción más interna de esta capa contiene también macrófagos de forma aislada. La capa más alejada de la luz, denominada musculoelástica, presenta abundantes C.M.L. de fenotipo contráctil, dispuestas en forma compacta y entre fibras elásticas.

El patrón de engrosamiento intimal difuso ha recibido también el nombre de fibrosis difusa intimal (Moon 1957). Otros autores, por el contrario, no hacen distinción entre el engrosamiento intimal difuso y el excéntrico.

### **1.1.5 CAUSAS HEMODINÁMICAS DEL ENGROSAMIENTO INTIMAL ADAPTATIVO**

El engrosamiento adaptativo intimal puede entenderse, como ya señalamos, como una reacción frente a una serie de estímulos fisiológicos, constituyendo un intento, por parte de la arteria, para mantener dentro de valores normales el flujo, la tensión arterial o ambos. Este hecho nos ayuda a contemplar a la íntima como a un tejido vivo y reactivo, capaz de aumentar su espesor como respuesta a cambios en el pulso, la presión arterial, la geometría del vaso, el flujo y las resistencias vasculares periféricas.

Los lugares donde la arteria presenta un engrosamiento excéntrico o difuso corresponden, por lo general, a regiones alteradas por algún tipo de estrés mecánico (Zarins et al. 1983; Caro et al. 1985), como disminución del esfuerzo de cizalladura de la pared, un aumento de la tensión arterial o de ambos fenómenos a la vez. Estos hallazgos indican, por tanto, que la íntima responde ante un disminuido esfuerzo de cizalladura, reduciendo el calibre de la luz y así, elevar la velocidad del flujo sanguíneo y, por lo tanto, restaurar los valores normales de dicho esfuerzo (Glagov y Zarins 1989). Por otra parte, para contrarrestar el incremento del esfuerzo tensional, la pared arterial engruesa su íntima, endureciendo la pared, con lo que consigue mantener dicho esfuerzo dentro de los niveles adecuados.

Teniendo en cuenta lo expuesto, es comprensible que los estímulos estarán uniformemente distribuidos en arterias con trayecto recto, originando una respuesta uniforme o engrosamiento intimal difuso, mientras que la

presencia de ramificaciones y bifurcaciones, donde las fuerzas mecánicas no se distribuyen uniformemente, la adaptación será fundamentalmente de tipo excéntrico.

### **1.1.6 RELACIÓN ENTRE ENGROSAMIENTO INTIMAL Y ATEROSCLEROSIS**

Algunos autores han definido como fenómenos ateroscleróticos, acúmulos aislados de C.M.L. de fenotipo sintético pertenecientes a un engrosamiento intimal adaptativo. Probablemente porque histológicamente tales acúmulos ofrecen la apariencia errónea de estenosis u oclusiones arteriales, sobre todo si se estudian vasos modificados por el estado postmortem (Strasser 1980; Velican y Velican 1980). Por ello, si bien se considera al engrosamiento intimal como lesión precursora de la arteriosclerosis hay que diferenciarlo claramente de ésta.

En animales de laboratorio se han realizado diferentes modelos, incluida la desendotelización (Björkerud y Bjonders 1973; Stemerman y Ross 1973), produciendo la acumulación secundaria de C.M.L. en la íntima arterial. No obstante, las lesiones generadas no concuerdan exactamente con la estructura histológica del engrosamiento intimal adaptativo. Asimismo no existen evidencias que los mecanismos desencadenados por tales modelos se producen en los seres humanos.



A pesar de estas consideraciones, existe una relación evidente, mediada por las concentraciones de lípidos en sangre, entre la aterosclerosis y el engrosamiento intimal adaptativo. Así, cuando la lipoproteinemia sobrepasa ciertos niveles, las lipoproteínas se acumulan preferentemente en las áreas con engrosamiento intimal adaptativo. Eventualmente, las reacciones celulares intimaes inducidas por un aumento de lípidos pueden modificar el proceso de los engrosamientos adaptativos, de tal manera que de forma específica tiendan a acumular mayor cantidad de lípidos que otros. Debido a que estos segmentos arteriales son los que primero evolucionan hacia lesiones más avanzadas, se les ha aplicado denominación de "engrosamiento intimal de progresión predispuesta". En otras palabras, coinciden en ellos modificaciones ante estímulos hemodinámicos y altas concentraciones tisulares de lípidos.

### **1.1.7 MODELOS ANIMALES DE ENGROSAMIENTO INTIMAL**

Las especies animales de pequeño tamaño nunca desarrollan de forma espontánea engrosamiento intimal en sus dos variantes, o sólo lo hacen lentamente conforme el animal envejece (Schwartz y cols. 1992). No obstante, es posible producirlo en todas sus arterias como respuesta a una gran variedad de estímulos. Los diferentes modelos de engrosamiento intimal revisados en este trabajo de Tesis Doctoral se pueden dividir en tres categorías, combinados o no con dieta hiperlipémica:

A) aquellos en los que una arteria normal, intacta, es dañada con técnicas como la denudación de células endoteliales mediante el paso de un catéter - balón de embolectomía, la distensión arterial mediante un balón de angioplastia, la implantación de mallas empleadas tras realizar PTCA, , la introducción de un alambre rotatorio (Fingerle y cols. 1990), la estimulación eléctrica (Betz y Schlotte 1979), la compresión (Banai S y cols. 1991), la perfusión intraluminal de aire seco (Richardson y cols. 1990), o mediante la colocación de un anillo perivascular (Booth y cols. 1989, De Meyer y cols. 1991, Kockx y cols 1992, Soma y cols. 1993, Arthur y Dusting 1992). A su vez estos modelos pueden ser subdivididos en dos categorías: (a) aquellos que incluyen una técnica intravascular y (b) aquellos otros basados en un método perivascular.

Aunque en ambos casos la respuesta desde un punto de vista microscópico es similar, los autores que la desarrollan en respuesta a estímulos intravasculares, como anillos rígidos de polietileno y estimulación eléctrica, la denominan "neoíntima", mientras que cuando no existe un daño directo de la íntima original, como el caso del anillo de silicona, la citan como "engrosamiento intimal".

B) aquellos donde se practica una segunda lesión (angioplastia con balón) sobre una lesión primaria. Para estos vasos se reserva el término de reestenosis.

C) aquellos que inducen la lesión al aislar de la circulación un segmento arterial (Díaz-Flores y Domínguez, 1985). En ellos se habla de tejido de granulación intraarterial con posterior diferenciación hacia engrosamiento intimal.

En cualquier caso hay que señalar que no todos ellos generan en realidad un engrosamiento intimal. Así, por ejemplo, el modelo de denudación de la arteria carótida en rata, con pérdida focal de células endoteliales, per se, no es suficiente para inducir su formación. Para justificar esto Kockx y colaboradores (1993) proponen que aparte de la denudación deben coexistir otros hechos, tales como:

- (1) pérdida de inervación perivascular (Soma y cols. 1993);
- (2) hipoxia resultante ante la oclusión de la vasa vasorum (Booth y cols. 1989);
- (3) cambios en la velocidad y dirección del flujo (Yong y cols.1992);
- (4) inducción de turbulencia (Yong y cols.1992);
- (5) cambios en las células endoteliales (Kockx y cols. 1993);
- (6) actividad de los leucocitos (Siegfried y cols. 1992).

## **1.1.8 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y BIOQUÍMICAS DEL ENGROSAMIENTO INTIMAL ARTERIAL**

### ***1.1.8.1 Tipos celulares de la íntima arterial***

#### **1.1.8.1.1 Comentarios generales**

Los principales componentes de la íntima arterial son las células endoteliales y las células musculares lisas, pudiéndose encontrar también macrófagos de forma aislada.

Algunos autores han descrito la presencia de mastocitos en la íntima de arterias humanas normales (Robinson et al. 1978; Kamio et al. 1979; Stry 1990), pero dicho hallazgo es poco frecuente e inconstante en nuestra especie. A pesar de todo, hay que admitir que los mastocitos no son fáciles de identificar con microscopía óptica cuando son de pequeño tamaño o cuando están degranulados (Stry 1990). Por ello, es de suponer que la presencia de células cebadas en la íntima debe ser mayor a la que reflejan los estudios.

En la íntima arterial aterosclerótica se han hallado linfocitos, pero no se sabe con certeza si este fenómeno también ocurre en la íntima de vasos normales. Jonasson y colaboradores (1986) intentaron sin éxito la búsqueda de linfocitos T en íntimas normales de aortas humanas y arterias uterinas mediante estudios inmunohistoquímicos. Sin embargo, sí se localizaron

algunos linfocitos T en íntimas ateroscleróticas adyacentes a lesiones ateromatosas de carótidas. En los últimos años se ha revisado el posible papel de los linfocitos en la aterogénesis (Libby y Hansson 1991).

#### **1.1.8.1.2 Células endoteliales**

La mayoría de los datos sobre las células endoteliales han sido extraídos de modelos experimentales realizados in vivo o in vitro. Los estudios de células endoteliales en arterias humanas intactas son de difícil ejecución debido al largo intervalo de tiempo que transcurre entre la muerte del sujeto y el estudio de los tejidos recogidos en la autopsia. Las células endoteliales de arterias musculares y elásticas normales forman una capa continua de células poligonales aplanadas y elongadas. A excepción de los lugares donde el flujo es turbulento o el esfuerzo de cizalladura está disminuido, el eje mayor de dichas células se orienta de forma paralela al flujo (Flaherty et al. 1972; Thorgeirsson y Robertson 1978; Levesque y Nerem 1985).

En la superficie luminal, las células endoteliales se encuentran revestidas por un glicocálix, consistente fundamentalmente en polisacáridos libres y glicosaminoglicanos, con cadenas laterales de glicoproteínas y glicolípidos que surgen de la membrana plasmática (Luft 1976). Por lo tanto, la célula endotelial sintetiza y secreta los componentes de la matriz

extracelular, tales como la fibronectina, el colágeno tipo IV y V, laminina y proteoglicanos (Sage et al. 1981; Jaffe 1987).

La superficie luminal de la membrana plasmática de las células endoteliales contiene un mosaico de microdominios, cargados en parte por la distribución de proteínas aniónicas (Simionescu et al. 1981). A su vez, existen glicoproteínas asociadas a membrana que fijan específicamente tanto lecitinas como proteoglicanos del tipo heparansulfato; sustancias encargadas probablemente de unir la lipoproteinlipasa a la superficie endotelial (DiCorleto y Zilversmit 1975; Wang-Iverson y Brown 1982).

Además, las células endoteliales poseen receptores de proteínas plasmáticas para LDL (Fogelman et al. 1988) propias y modificadas, insulina (Bar 1982) e histamina (Simionescu et al. 1981).

Las células endoteliales contienen una dotación normal de organelas, gran número de vesículas citoplasmáticas, y un extenso citoesqueleto de microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios. Característico de estas células son los cuerpos de Weibel-Palade, inclusiones citoplasmáticas en forma de bastoncillo que contienen el antígeno asociado al factor VIII de la coagulación y el factor de von Willenbrand (Weibel y Palade 1964; Wagner y Marder 1984).

Las células endoteliales se unen entre sí por medio de un sistema complejo que incluye uniones tipo ocludens, comunicantes o tipo gap (Schwartz y Benditt 1972).

A través de soluciones de continuidad en la lámina elástica interna, las células endoteliales llegan a contactar con las musculares lisas estableciendo uniones tipo comunicante (Davies 1985).

El endotelio arterial es permeable a todas las proteínas plasmáticas. La concentración final de dichas proteínas en la íntima depende aparentemente del grado de retención (trapping) y de los índices de degradación y del flujo (Smith 1974).

La transcitosis y el paso a través de uniones intercelulares son dos mecanismos probables de transporte de macromoléculas a través del endotelio (Palade 1987). Los índices de transporte de lipoproteínas y otras macromoléculas a través del endotelio parecen depender de la concentración plasmática y del tamaño y carga eléctrica de las partículas o proteínas (Stender y Zilvermit 1981), así como de la localización dentro del árbol arterial y la edad, presión arterial y tono vascular del individuo.

#### **1.1.8.1.3 Células Musculares Lisas**

Las C.M.L. son como componentes normales de la íntima en humanos y en otras especies, aunque algunos segmentos de la íntima arterial pueden carecer de este tipo celular. En razón de esto, la mera presencia de C.M.L. en la íntima no define en absoluto a este tejido como aterosclerótico.

Mediante microscopía electrónica e inmunohistoquímica se distinguen dos tipos de células musculares lisas, contráctil y sintético. Son las C.M.L. de fenotipo rico en miofilamentos, fenotipo contráctil (Campbell y Chamley-Campbell 1981; Manderson et al. 1989) o adulto (Dilley et al. 1987), las que predominan en la íntima. Estas células ocupan principalmente la íntima

musculoelástica y se asemejan bastante a las C.M.L. de la media arterial. Las C.M.L. ricas en RER, fenotipo sintético (Campbell y Chamley-Campbell 1981; Manderson et al. 1989), inmaduro (Dilley et al. 1987) o rico en ergastoplasma (Imai et al. 1985), aparecen en la porción superior de la íntima, rica en proteoglicanos. Las C.M.L. de fenotipo sintético contienen escasos miofilamentos, no son siempre visibles. A pesar del predominio del RER sobre los miofilamentos, éste no llega nunca a ocupar por completo el citoplasma, por lo que gran parte aparece al microscopio electrónico como una matriz de aspecto no definido. En cultivos celulares, las fibras musculares lisas ricas en RER pueden sintetizar una amplia variedad de componentes de la matriz intercelular (Burke y Ross 1979).

Cuando se estudian mediante inmunohistoquímica, se pueden diferenciar varios subtipos según las proteínas fibrosas contenidas en el citoplasma (Kocher y Gabbiani 1986). El papel sintético de las C.M.L. ricas en RER se ponen de manifiesto en experimentos con cultivos celulares provenientes de C.M.L. arteriales sometidas a estiramientos cíclicos. En dichas células, la síntesis de colágeno se encuentra incrementada de manera importante en comparación con células no estiradas (Leung et al. 1976), como si las C.M.L. hubieran alterado su morfología de un citoplasma rico en miofilamentos a uno con abundante RER (Sottiurai 1983).

En la íntima de humanos sanos (Stary 1987), primates (Stary y Malinow 1982), cerdos (Imai et al. 1985) y conejos (Stehbens y Ludatscher 1973), la proporción de C.M.L. del fenotipo sintético es máxima en la porción subendotelial de la íntima rica en proteoglicanos. En ratas, las C.M.L. pertenecientes a engrosamientos intinales excéntricos localizados en las



bifurcaciones arteriales, eran idénticas a las C.M.L. del resto de la pared arterial (Reale y Luciano 1966).

Un incremento en el número de C.M.L. por mitosis en la íntima en desarrollo puede ser la respuesta a factores de crecimiento. Hasta la fecha, no existe información, tanto en humanos como en otras especies, sobre la expresión de factores de crecimiento o de sus receptores correspondientes en C.M.L. intimales normales. Sin embargo, sí hay evidencia de la expresión del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, de los receptores de dicho factor, y del factor de crecimiento insulina-like-1 por parte de la célula muscular lisa de aorta normal de rata (Sjölund et al. 1988). Las C.M.L. pueden eliminar depósitos de lipoproteínas con la expresión de receptores para las lipoproteínas de baja densidad (LDL), por fagocitosis o por ambos mecanismos (Bierman y Albers 1975; Weinstein et al. 1976).

La presencia de autofagosomas en algunas C.M.L. y de pequeña cantidad de detritus celulares en la matriz extracelular de la íntima arterial e incluso de la media ha sido descrito en monos rhesus aparentemente sanos (Stary 1977), conejos (Stehbens y Ludatscher 1973) y ratas (Gerrity y Cliff 1972; Joris y Majno 1974). En la especie humana no existe evidencia de daño celular o muerte de C.M.L. en la íntima de arterias sanas aunque, basándonos en la experiencia con animales, podemos asumir que esto ocurra.

Las principales propiedades funcionales de las C.M.L. consisten en la modulación del contenido de proteínas contráctiles, la capacidad de respuesta ante mediadores del tono vascular, la síntesis y secreción de tejido conectivo, la capacidad de proliferación mediante la expresión de receptores

para factores de crecimiento y la síntesis de dichos factores, la capacidad migratoria, la eliminación de depósitos de lipoproteínas, etc.

#### **1.1.8.1.4 Los macrófagos**

Los macrófagos aparecen en la íntima arterial normal como células aisladas, separadas por intervalos regulares y distantes. Estas células se han observado en íntimas sanas de ratas (Still y O'Neal 1962; Gerrity y Cliff 1972; French 1966)), conejos (Duff et al. 1957), cerdos (Lee et al. 1970) y humanos (Stary 1987; Geer 1965). Algunos autores han descrito a estas células como leucocitos monocitoides, monocito-like o mononucleares.

Las arterias coronarias humanas normales contienen macrófagos aislados en la porción de la íntima adyacente al endotelio desde la primera semana de vida (Stary 1987). El número de macrófagos aumenta con la edad, hasta que se estabiliza en los adultos jóvenes, tras haber multiplicado dos veces y media la cantidad de macrófagos existentes en el recién nacido ((Stary 1990). Los engrosamientos intimales excéntricos contienen tres veces más macrófagos que la pared opuesta de la arteria libre de dicho engrosamiento.

La presencia de macrófagos en la íntima arterial coincide con la presencia en otros tejidos normales (Lasser 1983). Las funciones de dichos macrófagos dependen de la naturaleza de su medio ambiente (Lasser 1983; Werb 1983; Adams y Hamilton 1984).

Se ha especulado bastante sobre el papel que representan los macrófagos en la íntima arterial normal. Datos obtenidos de estudios realizados en animales e in vitro, indican que los macrófagos pueden sintetizar colagenasas (Werb y Gordon 1975; Mainardi et al 1980), elastasas (Werb y Gordon 1975; Banda y Werb 1981), factores de crecimiento para células musculares lisas, células endoteliales (Martin et al. 1981; Assoian et al. 1987; Madtes et al. 1988), factores quimiotácticos y factores angiogénicos (Knighton et al. 1983). Estas células pueden actuar activamente en el metabolismo lipídico (Goldstein et al. 1979; Werb y Chin 1983 Khoo et al. 1981) y en la fagocitosis (Werb 1983).

Otras funciones de los macrófagos son la fagocitosis directa y citólisis de bacterias y células tumorales, la citólisis mediada por anticuerpos, la activación de la respuesta inmune, la captación mediada por receptores de lipoproteínas nativas y modificadas, la secreción de apoproteína E, la secreción de lipoproteinlipasa, la fagocitosis de células muertas e inmunocomplejos, la fibrinólisis y otros depósitos proteicos plasmáticos, etc.

### **1.1.8.2 Matriz de la íntima arterial**

#### **1.1.8.2.1 Comentarios generales**

La matriz extracelular es un componente principal de la íntima arterial normal, particularmente en regiones de engrosamiento intimal. Ésta constituye hasta el 60% del volumen de la íntima. La matriz adquiere su importancia al actuar como medio de transporte a través del cual se hacen llegar los nutrientes esenciales de la íntima, como lugar de almacenamiento de los productos elaborados por las diferentes células intimales, como depósito de detritus celulares y como vía para la migración de las células que entran y atraviesan la íntima.

Debido a que la íntima puede contener una cantidad variable de C.M.L. frente a un número siempre estable de células endoteliales, su matriz extracelular puede diferir en la proporción de productos secretados por ambos tipos celulares.

#### **1.1.8.2.2 Proteoglicanos**

Las moléculas de proteoglicanos, debido a su gran tamaño, a su concentración y a sus propiedades iónicas, juegan un papel fundamental en la permeabilidad vascular, en la filtración, en el intercambio iónico, en el

transporte y almacenaje de materiales plasmáticos y en la regulación del metabolismo celular.

La naturaleza, identidad y precisa localización de los diferentes tipos de proteoglicanos en la íntima humana normal no ha sido resuelta por completo todavía. Aortas de cerdo teñidas con rojo rutenio presentan un alto contenido de condroitinsulfato de gran tamaño en el espacio subendotelial que puede ser o no similar a los condroitinsulfatos de la media (Richardson et al. 1988; Richardson et al. 1982). Existe un aumento en la concentración de proteoglicanos en la íntima de arterias humanas normales con abundante cantidad de C.M.L. (engrosamiento intimal). En arterias coronarias humanas, el contenido de dermatansulfato y condroitinsulfato aumenta con la edad (Ylä-Herttuala et al. 1986). Gran parte de la información actual sobre proteoglicanos ha sido extrapolada de observaciones realizadas en cultivos celulares. Cierta número de estudios ha demostrado que las células endoteliales en cultivo producen primariamente proteoglicanos similares al heparansulfato y una cantidad inferior de proteoglicanos del tipo dermatansulfato (Kinsella y Wight 1988). Se ha identificado tres tipos de proteoglicanos del tipo heparansulfato en células endoteliales de aorta bovina cultivadas (Wight 1989), uno de los cuales se asociaba con la membrana basal. Tomando como referencia los estudios de la síntesis de proteoglicanos en C.M.L. cultivadas (Wight y Hascall 1983; Edwards Y Wagner 1988), sería de esperar que el dermatansulfato fuera uno de los componentes principales de la matriz en torno a las C.M.L. intimales. Sin embargo, no existen estudios completos que demuestren este hecho específicamente. Por último, preparaciones de media e íntima humanas usadas para aislar proteoglicanos químicamente, han demostrado dos tipos

de moléculas de dermatansulfato (Register y Wagner 1990). Völker y colaboradores (1987), basándose en la distribución topográfica de los proteoglicanos en la media de aorta humana normal. Así mismo, describieron la asociación de moléculas de dermatansulfato con fibras elásticas y superficies de C.M.L. y la presencia de moléculas de condroitinsulfato en el espacio intercelular.

#### **1.1.8.2.3 Colágeno**

El colágeno juega un papel fundamental en la adherencia de las células endoteliales a la matriz subendotelial, contribuyendo de esta manera a la integridad de la célula endotelial. La familia de las moléculas de colágeno está compuesta por dos o más tipos de proteínas genéticamente distintas. Estudios actuales cifran en 18 los genes responsables de la codificación de las cadenas alfa (Bornstein y Sage 1980; Miller y Gay 1982; Burgeson 1982; Cheah et al 1985). En la pared arterial, los tipos de colágeno predominantes son el colágeno tipo I y el tipo III.

Estudios inmunológicos, como el de Gay y colaboradores (1975) demostraron la presencia de colágeno tipo III en el espacio subendotelial de la íntima en ausencia de colágeno tipo I. Este hecho, añadido a la demostración de la síntesis de colágeno tipo III por parte de células endoteliales bovinas cultivadas, hace suponer que sean estas células las

encargadas de producir esta variedad de colágeno (Sage et al. 1979; Sankey et al. 1981).

Con la edad aparece un cambio en la proporción intimal de colágeno tipo I y tipo III a favor del primero. Un incremento de esta variedad de colágeno sería el reflejo de la actividad metabólica por parte de un número elevado de C.M.L. en la íntima. Las C.M.L. en cultivo producen ambos tipos de colágeno (Morton y Barnes 1982). Estudios en la media e íntima de aorta humana, incluyendo arco aórtico, aorta torácica y abdominal, y de arterias carótidas han revelado de manera consistente, que el colágeno tipo I es la variedad predominante (Morton y Barnes 1982; Ooshima 1981; Hanson y Bentley 1983; Murata et al. 1986). También ha sido descrita la existencia de otros tipos de colágeno en una proporción bastante inferior a la de los tipos nombrados con anterioridad y que en ningún caso sobrepasan el 1% del colágeno arterial total.

#### **1.1.8.2.4 Elastina**

Con microscopía electrónica (Fahrenbach et al. 1966; Greenlee et al. 1966; Karre 1960), las fibras elásticas de la media incluyen dos componentes diferenciados: uno amorfo, la elastina, que no posee ninguna estructura regular repetitiva o patrón en bandas, y otro microfibrilar. En la capa musculoelástica de la íntima, particularmente en engrosamientos intimales excéntricos, las fibras elásticas son prominentes y se asemejan a sus

homólogas de la media. Con la edad, se produce una disminución del contenido de elastina en comparación con el del colágeno en todo el grosor de la aorta humana normal (Hosoda et al. 1984).

El precursor de la elastina es la tropoelastina, la cual es secretada por parte de las células como una proteína de 72 kDa (Rucker y Tincker 1977; Foster 1982; Sandberg 1976; Davidson y Crystal 1982; Saunders y Grant 1985) de peso molecular. Tanto la C.M.L. (Burke y Ross 1979; Snider et al. 1981; Toselli et al. 1981), como las células endoteliales (Cantor et al. 1980; Carnes et al. 1979) han sido descritas como productoras de elastina.

#### **1.1.8.2.5 Fibronectina y laminina**

En la matriz extracelular de la íntima arterial normal también aparecen otros componentes, como son la fibronectina y la laminina (Shekhonin et al. 1987). La primera es una glicoproteína de alto peso molecular, multifuncional, ubicua y adhesiva que se encuentra en superficies celulares, en matrices extracelulares y en la sangre. La molécula interviene tanto en la adherencia entre células como en la unión célula sustrato, así como en la motilidad celular y en la unión específica de ciertas sustancias a través de dominios en su molécula. Los dominios son los encargados de la unión al colágeno, a la heparina y a la membrana celular, a través del cual tienen lugar las reacciones célula matriz extracelular. La laminina, glicoproteína no colágena fundamental, junto con el heparansulfato y el colágeno tipo IV, es



un componente principal de la membrana basal subyacente al endotelio. En estudios in vitro se ha demostrado que la laminina acelera la adhesión de células endoteliales al colágeno tipo IV de manera específica.

### **1.1.8.3 Componentes plasmáticos**

Extractos salinos de íntima aórtica humana muestran por lo general un contenido proteico (patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida) muy similar al de las proteínas plasmáticas (Stastny et al. 1986). Extractos de proteínas solubles obtenidos de íntima aórtica humana en bruto con un tampón salino neutro, contienen inmunoglobulina A, inmunoglobulina G, vestigios de inmunoglobulina M, fracción C<sub>3</sub> del complemento,  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 2-macroglobulina, fibrinógeno, albúmina, LDL, HDL,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida,  $\beta$ 2-glicoproteína, transferrina y ceruloplasmina (Hollander et al. 1979). En estudios centrados en la obtención de proteínas solubles de íntimas de aortas torácicas humanas sin signos evidentes de aterosclerosis usando detergentes no aniónicos, las principales proteínas identificadas fueron la actina, las proteínas tropomiosina-like y glicoproteínas con peso molecular entre 35 y 30 kDa, cada una de ellas compuestas por más de un componente con diferente carga relativa (Stastny et al. 1986). Se identificaron algunas proteínas de aparente origen plasmático, incluyendo la albúmina, la inmunoglobulina G, la  $\alpha$ 1-antitripsina, la transferrina, la cadena  $\beta$  de la haptoglobina, el  $\alpha$ 2-heparansulfato y la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina.

Se han medido las concentraciones de proteínas plasmáticas en la íntima humana normal mediante electroforesis, directamente sobre el tejido, en geles portadores de anticuerpos (Hollander et al. 1979; Smith y Slater 1972). En algunos casos las concentraciones de LDL fueron similares o superiores a las plasmáticas, mientras que las concentraciones de albúmina fueron significativamente inferiores. La concentración de LDL en íntimas libres de alteraciones ha sido relacionada positivamente con un nivel plasmático individual elevado de dichas lipoproteínas. Aparentemente la concentración de todas las proteínas plasmáticas en la íntima arterial está directamente relacionada con el peso molecular de dichas proteínas y de su concentración plasmática (Smith y Staples 1980; Smith y Staples 1982). En la arteria normal, las LDL se localizan en la íntima, siendo normalmente indetectables en la parte interna de la media subyacente (Smith y Staples 1982). Las lipoproteínas se hallan incrementadas, como ya comentábamos antes, en los segmentos con engrosamiento intimal excéntrico, en comparación con regiones adyacentes normales en la aorta abdominal humana (Spring y Hoff 1989).

La íntima normal contiene fibrinógeno soluble, así como productos de degradación del fibrinógeno, lo que sugiere que, junto con el flujo de fibrinógeno, en la íntima de la arteria normal existe también una continua conversión de éste en fibrina, así como fenómenos de lisis de ésta última (Smith et al. 1976). El fibrinógeno/fibrina-1 se detectó mediante un anticuerpo específico monoclonal en dos especímenes de 12 aortas humanas normales (Bini et al. 1989).

### **1.1.9 CRONOLOGÍA DEL ENGROSAMIENTO INTIMAL.**

Los factores que aumentan la proliferación y/o migración de las C.M.L. han sido revisados por varios autores (Schwartz y cols. 1992; Casscells y cols. 1994; Nikkari y Clowes 1994). En una revisión sobre la formación neointimal y el engrosamiento intimal, ya se apuntaba que el daño de la célula muscular lisa es un hecho constante. Dicho daño podría escapar a la resolución de la microscopía óptica, pero se ilustra por el aumento intenso y brusco de la proliferación de las células musculares lisas, primer requisito para el engrosamiento intimal.

#### ***1.1.9.1 Mitógenos de la primera fase.***

La primera fase de replicación se deben a la liberación del factor de crecimiento fibroblástico básico (b FGF) por parte de C.M.L. durante el proceso de muerte celular (Lindner y Reidy 1991; Olson y cols. 1992). La angiotensina II, la endotelina, c-myc, y la pérdida de inhibidores del crecimiento pueden jugar también un papel en el control de replicación de la capa media.

#### **1.1.9.1.1 Factor de crecimiento fibroblástico básico (b FGF).**

El factor de crecimiento fibroblástico básico (b FGF) parece estar implicado en el desarrollo de la proliferación de C.M.L. inducida por elongación. Este factor es sintetizado tanto por las células endoteliales como por las C.M.L. y parece ser liberado por éstas secundariamente al daño vascular (Gadjusek y Carbon 1989). El bFGF ha sido catalogado como un potente estímulo del crecimiento de las células musculares lisas, especialmente en la ausencia de un endotelio intacto (Lindner y cols. 1991).

#### **1.1.9.1.2 Angiotensina II.**

El inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) cilazapril, reduce la formación neointimal tras la desendotelización producida en la arteria carótida de rata mediante un catéter balón. Éste tiene un efecto antiproliferativo sobre las C.M.L. de la capa media e inhibe la migración de estas células hacia la íntima arterial, pero sólo retrasa el depósito de matriz extracelular intimal. Por ello, la disminución en la proliferación de las C.M.L. y su consiguiente migración parecen ser las principales razones para la reducción de la formación neointimal (Fingerle y cols. 1995). El efecto del inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) sobre la

formación neointimal tras su denudación con un balón-catéter está asociada a una reducción en los procesos celulares tempranos, tales como la expresión de proto-oncogenes c-fos y c-jun.

Esto sugiere que es necesaria una potente inhibición de la ECA en el momento de la agresión sobre el endotelio vascular con la finalidad de prevenir o limitar la respuesta hiperplásica de la pared vascular (van Belle y cols. 1995).

De forma similar, el bloqueo del receptor de la angiotensina II tipo 1 (AT1) inhibe la inducción de los genes (c-fos; c-jun; junB; junD; Egr-1) y de la fibronectina en la denudación endotelial con balón en rata.

El FGF básico, induce la secreción de ECA, la cual a su vez facilita la formación de angiotensina II. Este último enzima estimula el crecimiento de C.M.L. conjuntamente con el FGF (Fishel y cols. 1995).

Algunos de los efectos del inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina puede ser debido a la inhibición de la degradación de las bradicininas.

#### **1.1.9.1.3 Pérdida de inhibidores de crecimiento.**

El engrosamiento intimal parece estar también ocasionado por la pérdida de inhibidores de crecimiento del tipo heparina/heparansulfato, TGF- $\beta$  u óxido nítrico (Scott-Burden Y Vanhoutte 1994). De hecho, la regeneración

endotelial repetida tiene como resultado una disminución en la producción y/o liberación de óxido nítrico (Niimi y cols. 1994). Este no sólo inhibe la proliferación de C.M.L. (Garg y Hassid 1994Schini y cols. 1994), sino que también inhibe de forma reversible la migración de C.M.L. independientemente de la proliferación y citotoxicidad (Dubey y cols. 1995, Sarkar y cols. 1996). Por tanto, el óxido nítrico tiene un papel dual: por un lado, estimula a las células endoteliales y por otro inhibe a las células musculares lisas.

Esto está asociado con una disminución de la formación neointimal tras agresión sobre la arteria carótida de rata y una aceleración de la recuperación de las células endoteliales tanto morfológica como funcionalmente (Guo y cols. 1995).

Como mencionábamos anteriormente, la inhibición del engrosamiento intimal mediante inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina en arterias de rata puede ser el resultado de un aumento de las bradicininas (De Meyer y Bult 1997).

Basado en experimentos con antagonistas de la bradicinina en combinación con inhibidores de la NO-sintetasa (INOS), se ha sugerido que, en realidad, el efecto protector de los IECA se debe tanto al bloqueo de la formación de angiotensina II como de la degradación de las quininas, y que el óxido nítrico juega un papel principal en el efecto inhibitor de los IECA (Fahry y cols. 1993).

La bradicinina es un potente estimulador de la NO-sintetasa en las células endoteliales y es degradado por la enzima convertidora de la angiotensina. Un problema en esta explicación es la ausencia de células

endoteliales en el segmento denudado.

La transferencia in vivo del gen de la NO-sintetasa endotelial (eNOS) en la pared del arteria carótida del conejo tras denudación con balón, ha provisto más evidencias sobre la inhibición de la acumulación de C.M.L. debida al óxido nítrico (von der Leyen y cols. 1995). La transfección de este gen no sólo restituye la producción de óxido nítrico y la relajación de la arteria denudada, sino que también inhibe el engrosamiento intimal en un 70% tras la agresión con balón. Este experimento provee una evidencia directa de que el óxido nítrico es un inhibidor endógeno de la hiperplasia intimal in vivo y propone a la eNOS como una aproximación terapéutica potencial para tratar la reestenosis tras angioplastia con balón.

Estudios in vitro, sin embargo, sugieren que en presencia de FGF básico, el óxido nítrico puede estimular la síntesis de DNA en C.M.L. en cultivo provenientes de aorta de rata, mientras que el óxido nítrico induce la inhibición de síntesis de DNA en C.M.L. emigradas (Hassid y cols. 1994). Así pues, el papel del óxido nítrico, como inhibidor endógeno de las C.M.L. no está del todo claro.

#### ***1.1.9.2 Segunda fase: Factores de migración.***

En la segunda fase diversos factores contribuyen a la migración de las células musculares lisas, como por ejemplo, los leucocitos, PDGF, TGF- $\beta$ , bFGF, la angiotensina II y el factor de von Willebrand. La contribución de

todos estos factores no está del todo definida (revisión Schwartz y cols. 1992).

#### **1.1.9.2.1 Migración inducida por leucocitos.**

La migración inducida por leucocitos tras implantar un hilo empapado en endotoxina ha sido asociada con una importante proliferación intimal. El tratamiento con dexametasona, por ejemplo, inhibe la llegada de leucocitos y previene el engrosamiento intimal (Prescott y cols. 1989), al igual que en otros modelos experimentales (van Put y cols. 1995).

Recientemente se ha demostrado, utilizando anticuerpos monoclonales frente a moléculas de adhesión, que los mononucleares (Kling y cols. 1995) y no los neutrófilos (Tracey y Peach 1992, Jackson y cols. 1993) promueven el engrosamiento intimal estimulando la migración de células musculares lisas.

#### **1.1.9.2.2 PDGF.**

En contraste con los estudios in vitro, el principal efecto del PDGF en el modelo de denudación de arteria carótida en rata es sobre la migración de las C.M.L. y no sobre su proliferación (Jackson 1994, Jawien y cols. 1992,



Jackson y cols 1993).

Estudios basados en la observación del papel de los receptores del PDGF (PDGFR-alfa y beta) sugieren que ambos deben jugar un papel diferente pero coordinado dentro de los mecanismos reguladores de la formación neointimal (Koyama y cols. 1994).

La expresión abundante del PDGFR- $\beta$  por parte de las C.M.L. intimaes sugieren que el PDGF- $\beta$  sintetizado por estas células debe estar involucrado en la formación neointimal a través de un mecanismo paracrino o autocrino (Lindner y cols. 1995).

El PDGF debe actuar predominantemente como un mitógeno en especies que no son la rata. La expresión del gen de PDGF- $\beta$  en arterias de cerdo induce la neoformación intimal tanto por proliferación como migración de C.M.L. seguidas de la síntesis de matriz extracelular (Pompili y cols. 1995).

#### **1.1.9.2.3 Factor de von Willebrand.**

La acumulación de factor de von Willebrand en la región subendotelial debe jugar también un papel en la migración de las células musculares lisas. Esta hipótesis está basada en el hallazgo de que el factor de von Willebrand se acumula en la íntima tras la colocación de un anillo no oclusivo de silicona alrededor del arteria carótida del conejo (Kockx y cols. 1993) en los estadios precoces del engrosamiento intimal.

También se observado la acumulación de dicho factor bajo las células endoteliales durante la formación de engrosamiento intimal en el ductus arterioso (Slomp y cols. 1992).

El factor de von Willebrand debe estar implicado por lo tanto en la migración de las C.M.L. desde la media hacia la íntima. Es más, durante su procesamiento se secreta un pro-polipéptido que es quimiotáctico, al menos para neutrófilos y macrófagos (Tijburg y cols. 1992).

#### **1.1.9.2.4 Metaloproteínas de la matriz.**

Antes de que las C.M.L. puedan migrar de la media a la íntima, la matriz extracelular ha de haber sido degradada parcialmente por enzimas proteolíticas. Las metaloproteínas de la matriz han sido implicadas como mediadores clave en la liberación de las C.M.L. de su andamiaje de matriz extracelular (Bendeck y cols. 1994 y 1996, Zempo y cols. 1996, Dollery y cols. 1995).

#### **1.1.9.3 Mitógenos de la tercera fase.**

En la tercera fase, las C.M.L. proliferan en la íntima. Aún no ha sido identificada ninguna molécula como mitógena en esta fase, aunque se ha

observado que cadenas de PDGF-alfa, TGF- $\beta$ , y AT1 están sobre expresados en la neointima de la rata (Majesky y cols. 1991, Viswanathan y cols. 1992). En estos modelos la infusión de PDGF  $\beta$  no estimuló la replicación (Jackson y cols 1993) mientras que IGF-1 sólo está sobreexpresado en la media (Cercek y cols. 1990).

#### **1.1.10 ENGROSAMIENTO INTIMAL HIPOTESIS ACERCA DE SU CRECIMIENTO**

Aún no se ha determinado la edad precisa a la que aparecen las C.M.L. en la íntima arterial, pero, como ya comentamos, Thoma (1883) las describió en la íntima aórtica de dos fetos en las semanas 30 y 33 de gestación. Langhans (1886) por su lado, describió C.M.L. en la íntima aórtica de un recién nacido fallecido 4 días después del parto, sólo como células de aspecto fusiforme. Wolkoff (1923), quien estudió las arterias coronarias de 9 sujetos de edades comprendidas entre los 9 meses y los 50 años, reconoció igualmente a las células localizadas en los engrosamientos intimales como células musculares lisas, mientras que Stary (1987) constató que dichas células estaban presentes en la íntima de las arterias coronarias de cada uno de los 63 niños y recién nacidos de edades inferiores a los 5 años que él estudió.

Se ha descrito un incremento progresivo en el grado de engrosamiento intimal en el período postnatal (Wolkoff 1923; Ehrlich et al

1931; Schornagel 1956; Langhans 1866), aunque se desconoce si el fenómeno se produce por división intramural de las células o por migración de las C.M.L. desde la media hacia la íntima. Estudios radiográficos con timidina tritiada, realizados de forma primaria en conejos (Stary y McMillan 1970; Stary 1974), sugieren que el incremento en el número de células ocurre por mitosis de C.M.L. existentes en la íntima. Por otro lado, la hipótesis migratoria se sustenta en la observación de C.M.L. en los "gaps" de la lámina elástica interna (Wissler 1967), aunque hasta la fecha no se ha comprobado que dicho fenómeno sea el responsable absoluto del incremento de C.M.L. en la íntima, no obstante, es perfectamente posible en ciertas condiciones (Grotendorst et al. 1981).

La invasión de la pared arterial por microvasos ha sido demostrada en patología humana (Barger et al., 1984; Eisenstein, 1991; Zhang et al., 1993) y experimental (Díaz-Flores et al., 1990a). La neovascularización de la pared arterial puede jugar un importante papel en la patogenia del engrosamiento intimal y aterosclerosis al: a) aportar componentes del plasma (albumina y fibrinógeno entre otros) y así nutrir la pared engrosada durante el crecimiento de la placa (Groszek y Grundy, 1980; Zhang et al., 1993); b) al generar microhemorragias por rotura de los vasos (Paterson, 1938; Barger y Beeuwkes, 1990); y c) al aportar al engrosamiento intimal nuevos elementos celulares, que contribuyan a su crecimiento (Díaz-Flores y Domínguez, 1985; Díaz-Flores et al., 1990a, 1991b).

## 1.2 ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis o formación de nuevos vasos a partir de la microcirculación preexistente, es un proceso indispensable en el desarrollo embrionario y fetal, así como en un gran número de situaciones normales y patológicas durante la vida postnatal (Warren, 1979a,b; Schor y Schor, 1983; Folkman, 1985; D'Amore y Thompson, 1987; Madri y Pratt, 1988; Paweletz y Knierim, 1989). Teniendo en cuenta los objetivos de la presente Tesis Doctoral, centraremos nuestra atención en la que se produce en la etapa postnatal.

Durante esta etapa permanece quiescente, salvo por ejemplo, en los ciclos experimentados en el aparato reproductor femenino (Findlay, 1986). Aparte de este ejemplo, la angiogénesis es un hecho fundamental en la inflamación crónica, la reparación tisular, la curación de las heridas, la organización de los trombos, y algunos cuadros denominados "enfermedades angiogénicas" (Folkman, 1989), como hemangiomas, psoriasis (Majewski et al., 1987), esclerodermia (Kaminski et al., 1984), artritis reumatoide, retinopatía diabética (Davis, 1988) y glaucoma neovascular.

A todos estos cuadros hay que añadir las neoplasias, ya que en ellas la angiogénesis desempeña un gran papel en su crecimiento y diseminación (Folkman, 1972, Schor y Schor, 1983; Folkman, 1985a,b,c; Folkman, 1975, D'Amore y Thompson, 1987; Folkman y Klagsbrun, 1987; Zetter, 1988; Paweletz y Knierim, 1989; Blood y Zetter, 1990).

## **1.2.1 ANGIOGÉNESIS. METODOS DE ESTUDIO**

### **1.2.1.1 Técnicas “in vivo”**

Desde los estudios clásicos acerca de los vasos neoformados (Szalay y Pappas, 1970; Yamagami, 1970; Haar y Ackerman, 1971; Warren et al., 1972; McKinney y Panner, 1972; Cavallo et al., 1973), se han diseñado numerosos modelos “in vivo”, con el objetivo de conocer la angiogénesis (Auerbach et al., 1991; Passaniti et al., 1992).

Los animales empleados han sido, entre otros, conejos (Gimbrone et al., 1974; Brem y Folkman, 1975), ratas (Fournier et al., 1981) y ratones (Muthukkaruppan y Auerbach, 1979). En cuanto a los territorios elegidos figuran los que permiten una fácil observación de los procesos angiogénicos por sus características estructurales o por sus propiedades inmunológicas y los que posibilitan estudiar el crecimiento vascular en amplias zonas.

Dentro del primer grupo se encuentra la córnea, por su carencia de vasos y por ser un tejido transparente, lo que ha permitido diferenciar los neovasos de los vasos pericorneales originales (Ausprunk y Folkman, 1977; Henkind, 1978, Polverini et al., 1977a; Greenburg y Hunt, 1978) y valorar morfológica y morfométricamente el crecimiento lineal de las yemas vasculares neoformadas en busca del estímulo angiogénico (Proia et al., 1988; Haynes et al., 1989; Culton et al., 1990).

Por sus características inmunes se han utilizado otros territorios como la membrana corioalantoidea (Sorgente et al., 1975; Auerbach, 1981; Folkman, 1982; Shing et al., 1985; Fett et al., 1985; Olivo et al., 1992) y el saco vitelino del pollo (Taylor y Folkman, 1982; Shing et al., 1985; Rosenbruch, 1989; Takigawa et al., 1990a,b), ya que, al carecer de un sistema inmune maduro, permiten la supervivencia y crecimiento de xenoinjertos, ensayar inhibidores o activadores de la angiogénesis y elegir cual de ellos puede ser usado en la córnea (Folkman, 1985a,b,c). Su principal problema es la frecuencia de falsos positivos causados por el propio acto quirúrgico, inconveniente que puede ser minimizado mediante el cultivo de los embriones de pollo en discos de Petri (Auerbach et al., 1974).

Otras estructuras utilizadas, por mostrar también una menor respuesta inmunológica (Folkman et al., 1989; Weidner et al., 1991), son los reservorios para el alimento en pómulo de los hamsters (Schreiber et al., 1986) y la cámara anterior del ojo (**Greene, 1943**).

En aquellos casos en los que se ha pretendido seguir la angiogénesis en amplios territorios se han generado "bolsillos" repletos de aire en el tejido subcutáneo del dorso de ratas (**Selye, 1953**) o implantado cámaras de observación en "sandwich" en la oreja del conejo o en el mesenterio (Norrby et al., 1986; Williams et al., 1989; Norrby et al., 1990a,b).

Por último, cuando se ha pretendido estudiar conjuntamente angiogénesis e inflamación se han realizado implantes subcutáneos de cilindros de esponja de poliuretano (Bishop et al., 1989, 1990), provistos o no de polímeros angiogénicos de lenta liberación (Fajardo et al., 1988), estudiándose así la penetración de células y la respuesta angiogénica en los

espacios libres existentes entre la malla de la esponja. Junto a este sistema han aparecido otros, entre los que cabe destacar implantes de fibrina o gelatina, que actuarían como iniciadores de la angiogénesis, facilitando el estudio de la acción de distintas sustancias (Dvorak et al., 1987), e inyecciones de células o fármacos suspendidos en alginato (Plunkett y Hailey, 1990; Robertson et al., 1991).

No obstante, esta relación de métodos sería incompleta si no señaláramos que uno de los modelos que más ha aportado en este campo ha sido el empleo de bombas de perfusión inertes, biocompatibles y que permiten la liberación programada de factores angiogénicos o antiangiogénicos (Folkman et al., 1971, Langer y Folkman, 1976, Rhine et al., 1980; Hsieh et al., 1981; Murray et al., 1983).

#### **1.2.1.2 Técnicas *in vitro***

Las técnicas "in vitro" han sido también empleadas por diversos autores (Madri y Stenn, 1982; Furcht, 1986; Ingber et al., 1986; Dvorak et al., 1988; Heimark y Schwartz, 1988; Ingber y Folkman, 1988), sobre todo después de la introducción del cultivo de células endoteliales (Jaffe et al., 1972; Gimbrone et al., 1973) obtenidas de vena umbilical humana (Maciag et al., 1982), aorta bovina (Feder et al., 1983), capilares bovinos (Folkman y Haudenschild, 1980; Montesano et al., 1983) y capilares de rata (Madri et al., 1983; Sato et al., 1987). Estas células han demostrado ser capaces de



formar redes celulares tubulizadas, similares a redes capilares, en sustratos que reúnen determinadas condiciones (Folkman y Haudenschild, 1980; Maciag et al., 1982; Kubota et al., 1982; Montesano y Orci, 1985; Pepper et al., 1990; Nguyen et al., 1992). Este procedimiento se ha complementado con el cultivo conjunto de estas células con elementos pericitarios, permitiendo conocer nuevos datos (D'Amore y Thompson, 1987; Auerbach et al., 1991).

En resumen, mediante estas técnicas se ha podido conocer: 1) que la velocidad de recubrimiento de una superficie por parte de una monocapa de células endoteliales es similar a velocidad de la migración endotelial durante la angiogénesis (Pepper et al., 1987, 1989, 1990). 2) la quimioquinesis y la quimiotáxis (Auerbach et al., 1974, 1991; Obeso y Auerbach, 1984; Stokes et al., 1990; Taraboletti et al., 1990), 3) el grado de proliferación de las células endoteliales en cultivo (Watt y Auerbach, 1986; Folkman y Ingber, 1987; Folkman y Klagsbrun, 1987; Ryan, 1988; Simionescu y Simionescu 1988, 1991) 4) los cambios en la función de las células endoteliales durante la angiogénesis, tales como modulación en la producción de citoquinas (Shepro, 1988), liberación de proteasas y actividad fibrinolítica (Sueishi et al., 1989), síntesis de la membrana basal, 5) la formación de tubos endoteliales en relación con el sustrato (Maciag et al., 1982; Maciag, 1984; Madri y Pratt, 1986; Nicosia y Ottinetti, 1990) y, 6) el papel de los pericitos durante la angiogénesis (Orlidge y D'Amore, 1987, 1988).

Evidentemente todas estas posibilidades para el estudio de las funciones endoteliales se han visto incrementadas con la incorporación de la técnica de cultivo en 3 dimensiones (Madri et al., 1988; Goto et al., 1993; Williams, 1993).

## **1.2.2 FENÓMENOS ANGIOGÉNICOS**

### ***1.2.2.1 Regiones del árbol vascular con capacidad angiogénica***

La mayoría de los autores admite que la vertiente arterial del árbol vascular no participa en la formación de nuevos vasos, mientras que capilares, pequeñas vénulas y vénulas postcapilares, sí (Mc Cracken et al., 1979; Tano et al., 1981; Sholley et al., 1984; Ausprunk y Folkman, 1977). No obstante, se ha demostrado que vasos venosos del calibre de la vena femoral de la rata, tras ser estimulado su entorno con soluciones de acilgliceroles y prostaglandinas E1 y E2, son capaces de generar yemas angiogénicas (Díaz-Flores et al., 1994).

## **1.2.3 SECUENCIA TEMPORAL DE LA ANGIOGÉNESIS**

Se ha podido establecer la secuencia temporal de la angiogénesis por diferentes procedimientos (Burger et al., 1983; Garbett y Gibbins, 1987;

Forsman y McCormack, 1992). Así, se acepta que en las primeras horas, mientras que capilares y, fundamentalmente, vénulas postcapilares, se dilatan, se produce la marginación leucocitaria y comienzan a surgir las yemas angiogénicas a partir de las 27 horas (Burger et al., 1983). Transcurridas 48-72 horas su número se incrementa notablemente originándose finalmente un plexo. En etapas posteriores gran parte de esos vasos involucionarán (Forsman y McCormack, 1992).

### ***1.2.3.1 Angiogénesis. Descripción morfológica***

Numerosos autores han centrado su atención en el estudio de las modificaciones morfológicas que experimentan los vasos durante la angiogénesis (Yamagami, 1970; Bar y Wolff, 1972; Cavallo et al., 1973; Ausprunk y Folkman, 1977; Warren, 1979; Sholley et al., 1984; Dvorak et al., 1987; Wakui et al., 1988; Paku y Paweletz, 1991; Brenk, 1955; Cliff, 1963; Crocker et al., 1970; Yamagami, 1970; Inomata et al., 1971; Ausprunk y Folkman, 1977; Schor y Schor, 1983, Sholley et al., 1984; Folkman, 1985a.b.c; Freemont y Ford, 1985; Furcht, 1986; D'Amore y Thompson, 1987; Madri y Pratt, 1988; Paweletz y Knierim, 1989; Paku y Paveletz, 1991; Díaz-Flores et al., 1992). Tales aspectos serán desglosados en los apartados siguientes.

### **1.2.3.2 Fenómenos inflamatorios asociados a la angiogénesis**

Como ya señalamos previamente, el inicio de la angiogénesis se coordina con fenómenos inflamatorios (Jennings y Florey, 1970; Auerbach, 1981; Peacock, 1984). En otras palabras, la respuesta inflamatoria con vasodilatación, consiguiente incremento de la permeabilidad y diapedesis leucocitaria, precede y acompaña a los fenómenos angiogénicos (Jennings y Florey, 1970; Ross et al., 1970, Ryan y Spector, 1970 Mc Cracken et al., 1979).

Con respecto a la vasodilatación, ésta ocurre a partir de la primera hora después de recibirse el estímulo, como se ha comprobado en la córnea lesionada con nitrato de plata (Mc Cracken et al., 1979). Tal respuesta, determina la aparición de edema en el tejido conectivo circundante (Ausprunk y Folkman, 1977; Dvorak et al., 1988; Paku y Paweletz, 1991), con depósito de fibrina extravascular y dilatación de vasos linfáticos. Tales depósitos de fibrina, tienen una gran importancia, ya que como se ha observado en experiencias "in vitro", inducen a las células endoteliales a formar estructuras tubulares similares los neovasos (Nicosia et al., 1982) y, además, a sintetizar fibronectina (Jaffe y Mosher, 1978; Birdwell et al., 1978), como se ha visto en estudios "in vivo" (Clark, 1982a,b). Este compuesto parece favorecer la adhesión de las células endoteliales en su crecimiento (Clark, 1985) y ejercer sobre ellas una acción quimiotáctica (Bowersox y Sorgente, 1982).

Establecida ya la dilatación vascular, al cabo de pocas horas se acumulan intravascularmente plaquetas y PMN, migrando estos últimos, dentro de las primeras seis horas hacia el intersticio, donde predominan durante un corto periodo de tiempo, antes de ser sustituidos por células macrofágicas, con presencia de linfocitos T, eosinófilos o mastocitos.

A pesar de todo lo anteriormente expuesto, los leucocitos, aunque estimulan y amplifican la angiogénesis no parecen ser esenciales para su iniciación y establecimiento (Fromer y Klintworth, 1975a,b, 1976; Polverini, 1977a,b; Sholley et al., 1978). De hecho, se ha inducido la angiogénesis en ausencia de leucocitos en ratas y conejos (Sholley et al., 1978).

En cualquier caso, es precisamente después de iniciarse la diapedesis leucocitaria cuando comienzan a producirse los fenómenos angiogénicos propiamente dichos, en un intersticio con presencia de depósitos de fibrina, eritrocitos, macrófagos y fibroblastos.

### ***1.2.3.3 Activación de células endoteliales y pericitarias***

Establecidos los fenómenos inflamatorios, el endotelio de la microcirculación comienza a hipertrofiarse y a aumentar el número de proyecciones en la superficie luminal (Yamagami, 1970; Ausprunk y Folkman 1977; McCracken et al., 1979; Burger y Klintworth, 1981; D'Amore y Thompson, 1987). El núcleo se hace prominente, así como el nucleolo, signo del aumento de la síntesis de DNA, (Bürger y Klintworth, 1981; Burger et al.,

1983). Por su parte, el citoplasma muestra incremento del tamaño de las distintas organelas y se enriquece en ribosomas libres, índice de la secreción incrementada de metaloproteasas y activadores del plasminógeno (Pepper et al., 1990).

Los pericitos, a su vez, cambian sus características morfológicas y relaciones topográficas (Díaz-Flores et al., 1992). En concreto, acortan la longitud de sus prolongaciones y presentan mayor número de ribosomas libres (McCracken et al., 1979).

#### ***1.2.3.4 Degradación de la membrana basal***

Los componentes habituales de la membrana basal, laminina, fibronectina, entactina, heparan sulfato, colágenos IV y V, así como algunas fibrillas de colágeno tipo I y III (Nicosia y Madri, 1987; Kanwar y Farquhar, 1979; Foidart et al., 1980; Bender et al., 1981; Pepper y Montesano, 1990) se modifican al inicio de la migración endotelial, al igual que los propios del medio extracelular, colágenos tipo I y III (Nicosia y Madri, 1987).

Estos cambios se deben a la liberación por parte de las células endoteliales activadas de enzimas proteolíticas por ellas sintetizadas, tales como activador del plasminógeno y colagenasa (Folkman, 1982; Rifkin et al., 1982; Kalebic et al., 1983; Madri et al., 1983; Montesano et al., 1986; Moscatelli y Rifkin, 1988).

### **1.2.3.5 Migración endotelial**

Ya desde los estudios de **His, en 1868**, se considera que los neovasos se forman por migración de las células endoteliales, siendo ésta, por tanto, un paso fundamental en la angiogénesis (Ausprunk y Folkman, 1977). Estas células muestran, en esta fase, modificaciones en la morfología celular, desorganización del citoesqueleto y desestructuración de los microtúbulos (Liaw y Schwartz, 1993)

Una vez degradada la membrana basal las células endoteliales protrusionan hacia el intersticio en busca del estímulo angiogénico, generándose microsoluciones de continuidad entre ellas, lo que permite pequeñas hemorragias. Para algunos autores, tales hemorragias se producen al hacerse más laxas las uniones interendoteliales, facilitando la migración celular, sin pérdida de la polaridad (Ausprunk y Folkman, 1977).

Se han descrito dos patrones de crecimiento para las células endoteliales (Paku y Paweletz, 1991): a) bicelular, de configuración bipolar o de telescopaje (Burger et al., 1983; Sholley et al., 1984; Folkman, 1984; Wakul, 1988) y b) lineal (Folkman, 1986).

En el primer patrón, dos o más células endoteliales migran simultáneamente en paralelo (Sholley et al., 1984; Wakui, 1988). En el segundo o lineal, una sola célula endotelial surge de la pared vascular preexistente en dirección hacia el estímulo angiogénico (Ausprunk y Folkman, 1977; Folkman et al., 1979; Furusato et al., 1984, 1985; Folkman,

1984, 1986). Al igual que en primer tipo, la luz vascular o no existe, o casi podría ser considerada intracelular. Evidentemente la progresiva elongación hará crecer en longitud a la yema vascular (Paku y Paweletz, 1991).

La migración de las células endoteliales, en respuesta a un estímulo quimiotáctico, y facilitada por la degradación de la membrana basal (Moscatelli et al., 1981), se debe a la presencia en su superficie celular de receptores celulares de adhesión del tipo de las integrinas (Leavesley, 1993). En concreto, de las integrinas alfa 2B-1 y alfa B-3 (Leavesley, 1993). A medida que las células endoteliales avanzan en el intersticio, otras, por detrás de ellas, las siguen, para así constituir cordones endoteliales compactos.

La mayoría de los autores coinciden en señalar que la migración endotelial precede a su proliferación y que ambos hechos son sucesivos e independientes entre sí (Sholley et al., 1977a,b; Wall et al., 1978; Matsuhashi, 1961, 1962; Sugiura y Matsuda, 1969; Yamagami, 1970; McCracken et al., 1979; Folkman, 1982).

#### **1.2.3.6 Proliferación de células endoteliales**

Las células endoteliales, en condiciones normales, muestran una renovación celular baja, que se sitúa en torno a los 2 meses o más (Folkman y Cotran, 1976). Mediante técnicas histoautorradiográficas se ha comprobado que en vasos de pequeño calibre de diversos territorios es inferior al 1%



(Tannock y Hayashi, 1972; Cavallo et al., 1972, 1973; Polverini et al., 1977b), sin embargo, puede activarse rápidamente 6–8 horas después de haberse producido el estímulo angiogénico, incrementándose su síntesis de DNA (Cavallo et al., 1973). En vasos del estroma tumoral se alcanza un índice de replicación del 9% (Denekamp y Hobson, 1982).

Para algunos autores, las mitosis endoteliales se producen simultáneamente con el nacimiento de las yemas vasculares (Sholley et al., 1984), mientras que para la mayoría, es un hecho posterior al inicio de la migración celular y no imprescindible en la angiogénesis, pues ésta puede ocurrir en ausencia de la primera (Sholley et al., 1984). En cualquier caso hay que señalar que las mitosis, por lo general, en el punto de nacimiento de las yemas, aparecen tanto en las células endoteliales de los vasos preexistentes como en las yemas angiogénicas (1965; Ausprunk y Folkman, 1977; Folkman, 1982, 1986; Clark, 1985).

### ***1.2.3.7 Formación de la neoluz capilar***

Formados los cordones de células endoteliales, éstos adquieren una luz para transportar sangre circulante. Se han descrito dos formas para conseguir este objetivo. En la primera, se propugna la vacuolización intracelular y posterior fusión de dichas vacuolas (Folkman y Haudenschild, 1980; Furusato et al., 1984, 1985) y, en la segunda, la canalización entre elementos endoteliales adyacentes (Wakui, 1988). En general, es más

aceptada la segunda hipótesis, en la que se conserva la polaridad celular (Wakui, 1988).

En lo que respecta al momento en que la luz de los neovasos contacta con la del vaso original, no hay unanimidad entre los autores, ya que para unos se produce desde el inicio, siendo pues una elongación de la luz del vaso preexistente (Wakui, 1988), mientras que para otros la neoluz aparece primero en la yema y posteriormente se conecta con el vaso (Yamagami, 1970; Bar y Wolff, 1972; Cavallo et al., 1973; Dvorak et al., 1988; Wakui, 1988; Paku y Paweletz, 1991; Ausprunk y Folkman, 1977; Folkman, 1984, Nicosia et al., 1982).

#### ***1.2.3.8 Papel de los pericitos en la angiogénesis***

En relación con este papel hay que considerar el comportamiento de los pericitos de la microcirculación preexistente; su relación con las distintas fases de la angiogénesis, incluyendo su incorporación a los neovasos y su relación con ellos, y, finalmente, su función en el proceso regulador de la proliferación endotelial.

La información existente acerca de estos aspectos no es amplia (Cavallo et al, 1973; McCracken et al., 1979; Burger y Klintworth, 1981; Díaz-Flores et al., 1992). No obstante, se conoce que durante las fases iniciales de la angiogénesis los pericitos acortan sus prolongaciones celulares, aumentan sensiblemente su actividad mitótica y funcional, haciéndose hipertróficos, de

nucleolo prominente y ricos en ribosomas libres. Así mismo, su membrana basal se rompe, contactando directamente con el medio extravascular (Díaz-Flores et al., 1992), migrando hacia él. En otras palabras, los datos sugieren que los pericitos activados, aparte de originar nuevos pericitos, contribuyen al origen de nuevas células productoras de fibras (Díaz-Flores y Domínguez, 1985; Díaz-Flores et al., 1988, 1989, 1990a,b, 1991 a, b, 1992). De hecho, el número total de pericitos se incrementa de forma considerable cuando se produce proliferación vascular (Schlingemann et al., 1990; Díaz-Flores et al. 1992) y, solo algunos de ellos, se disponen finalmente alrededor de las yemas neoformadas.

Con respecto a la relación entre pericitos y las distintas fases de la angiogénesis, también se conocen aspectos puntuales y, en muchos casos, contrapuestos. Así, para un grupo de autores, el reclutamiento de pericitos por parte de las yemas en crecimiento es precoz (Crocker et al., 1970; Inomata et al., 1971; Verhoeven y Buysens, 1988; Schlingemann et al., 1991; Nehls et al., 1992). Otro grupo de autores indica que este hecho se produce cuando éstas organizan su luz (Folkman y Haudenschild, 1980; Folkman y Klagsbrun, 1987; D'Amore y Thompson, 1987; Paweletz y Knierim, 1989; Blood y Zetter, 1990). Un tercer grupo opina que la captación de pericitos empieza cuando las células endoteliales empiezan a migrar o a emitir prolongaciones (Yamagami, 1970; Crocker et al., 1970; Inomata et al., 1971; Wakui, 1988). No faltan autores que consideran que solo mientras que no haya pericitos es posible el desarrollo de la luz capilar.

En cuanto a la relación entre pericitos y yemas en crecimiento se conoce que es intensa en el punto de angiogénesis activa (Crocker et al., 1970; Inomata et al., 1971), observándose procesos citoplásmicos engarzados

procedentes de ambos tipos celulares (Wakui, 1988; Furusato et al., 1990). A estos "puentes" se les ha asignado la función de actuar como "guías" de crecimiento de las yemas vasculares endoteliales (Nehls et al., 1992). En cualquier caso, lo aceptado es que el nacimiento de capilares conlleva el crecimiento coordinado de células endoteliales y pericitos (Nehls et al., 1992).

Desde un punto funcional y, teniendo en cuenta, que los pericitos están ausentes en los extremos de crecimiento de las yemas angiogénicas y presentes, en cambio, en vasos que caminan hacia la maduración, se postula que en cierta manera modulan o inhiben el crecimiento de las yemas vasculares (Ordlidge y D'Amore, 1987; Sato y Rifkin, 1989; Crocker et al., 1970).

#### **1.2.3.9 Matriz extracelular y neomembrana basal**

A medida que crecen las yemas angiogénicas en las áreas periendotheliales disminuyen los depósitos de fibronectina y aumentan los de laminina y colágeno tipo IV hasta formarse un fieltro subendotelial. En la fase final se incrementan considerablemente en el medio extracelular las cantidades de colágeno tipo I y III.

En algunos casos, es posible distinguir membranas basales engrosadas o formando múltiples láminas o capas en vasos neoformados y maduros (Szalay y Pappas 1970; Smelser y Ozanics, 1972). Posiblemente este

fenómeno se deba a intermitentes episodios de muerte endotelial seguidos de nuevo crecimiento (Vracko y Benditt, 1970).

### **1.2.3.10 Formación de redes capilares**

A corta distancia de los vasos originales, las yemas en crecimiento comienzan a dividirse y ramificarse para formar lazos o bucles capilares, originando un plexo vascular.

Aún en la actualidad se desconoce que estímulo o estímulos condicionan que los vasos se ramifiquen o tiendan a confluir. En este sentido, se ha sugerido que son las prolongaciones pericitarias que saltan de yema a yema neoformada, las responsables de la coalescencia de los vasos neoformados (Nehls et al., 1992).

El territorio donde se ha estudiado más exhaustivamente la formación de estas ramificaciones vasculares ha sido la cornea, donde los vasos neoformados surgen del ángulo iridocorneal y se introducen en un estroma transparente (Muthukkaruppan y Auerbach, 1979; Muthukkaruppan et al., 1982).

### **1.2.3.11 Cambios en los vasos neormados. Persistencia, involución y diferenciación**

Establecida la angiogénesis, y según cesa el estímulo inductor, un número importante de vasos neoformados involuciona (Szalay y Pappas, 1970; Ausprunk et al., 1978; Latker y Kuwabara, 1981; Azmi y O'Shea, 1984; Latker et al., 1986; Spanel-Borowski y Mayerhofer, 1987).

La secuencia de hechos que acontecen en este proceso es amplia (Ausprunk et al., 1978; Azmi y O'Shea, 1984; Spanel-Borowski y Mayerhofer, 1987) y se ha esquematizado en dos grandes tipos (Ausprunk et al., 1978; Azmi y O'Shea, 1984). En el primero (Ausprunk et al., 1978) se produce éstasis de hematíes y plaquetas. Estos acúmulos plaquetarios actúan como verdaderos órganos paracrinos, al mismo tiempo que las células endoteliales que se hacen cada vez más finas, vacuolizan su citoplasma, experimentan roturas en su membrana celular, y por último, se lisan.

En el segundo tipo de regresión vascular (Azmi y O'Shea, 1984), prevalece la destrucción endotelial sobre los tapones plaquetarios. Se consideran en ella diferentes pasos o fases: a) protrusión de algunas células endoteliales hacia la luz; b) formación de adherencias entre la célula protruida y la células endoteliales adyacentes; c) condensación nuclear y citoplásmica; d) lobulación celular y nuclear con posterior fragmentación; e) destrucción de las organelas, pérdida de la integridad celular y finalmente englobamiento de los fragmentos celulares por las células endoteliales todavía viables.

En definitiva, probablemente el cese del estímulo angiogénico, sumado al menor flujo sanguíneo en los vasos neoformados sean los motores de la involución vascular (Auerbach et al., 1991), y ello justifique que los fenómenos involutivos acontezcan primero en los vasos de menor calibre situados más distalmente (Ausprunk et al., 1978).

El comportamiento involutivo de los vasos depende del tipo de tejido y de la especie animal. Por ejemplo, en la córnea de algunos animales los vasos neoformados desaparecen cuando el estímulo angiogénico cesa (Zauberman et al., 1969; Ausprunk et al., 1978), mientras que en los vasos en la córnea humana ocurre el fenómeno contrario (Cogan, 1949).

Con respecto a la diferenciación los nuevos vasos hay que señalar que pueden diferenciarse de acuerdo con la especificidad tisular. Así, en las metástasis tumorales sus vasos adoptan, en ocasiones, las características morfológicas de los vasos del tumor primario.

#### **1.2.3.12 *Formación definitiva de la red microvascular.***

##### ***Modulación de los neovasos***

Los mecanismos por los cuales una red angiogénica se transforma en un entramado vascular funcionalmente eficaz son difíciles de explicar (Phillips et al., 1991). Se han propuesto dos vías diferentes, ambas probablemente asociadas (Burger et al., 1983; Philips et al., 1991; Díaz-Flores et al., 1994): 1) remodelación de los capilares neoformados y de los vasos de los cuales

surgen y/o 2) anastomosis de los neovasos con vasos venosos y arteriales preexistentes de gran calibre.

La primera posibilidad está basada en el desarrollo de arterias y venas a partir de vasos neoformados, lo que requiere, junto a ellos, la presencia de células perivasculares, tales como pericitos o células musculares lisas.

En cuanto a la segunda posibilidad, esto es, la anastomosis de los vasos angiogénicos con vasos preexistentes de gran calibre, venosos o arteriales, recientes observaciones han confirmado esta posibilidad en los vasos venosos (Díaz-Flores et al., 1994). No ocurre lo mismo en la vertiente arterial, ya que no se ha observado nacimiento de vasos a partir de arteriolas o arterias. Sin embargo, el proceso contrario sí ha sido descrito. Esto es, la penetración de las paredes arteriales por parte de microvasos adventiciales en algunas condiciones experimentales (Díaz-Flores y Domínguez, 1985; Díaz-Flores et al., 1990a).

#### **1.2.4 CONTROL DE LA ANGIOGÉNESIS**

La formación de neovasos depende de estímulos angiogénicos que inician o estimulan la proliferación y migración de células endoteliales en el tejido conectivo (Folkman, 1982, 1985a,b,c-, Furcht, 1986).

Los factores más importantes en el control de la angiogénesis parecen ser los: a) los capaces de estimular la migración y/o proliferación de las células endoteliales, b) los inhibidores angiogénicos; c) los que inducen



modificaciones en la matriz extracelular; y d) otros de naturaleza física o de contacto, por ejemplo, el efecto del lado libre en ausencia de células endoteliales vecinas (Schwartz et al., 1982).

### **1.2.5 FACTORES ANGIÓGENICOS**

La angiogénesis es iniciada por la acción de factores angiogénicos, bien por activación local de los genes que los codifican o bien por liberación desde su almacén. En la pasada década algunas moléculas se han mostrado inductoras de la angiogénesis por vía directa o indirecta, incluyendo a los factores de crecimiento (Folkman y Klagsbrun, 1987; Klagsbrun y D'Amore, 1991; Folkman y Shing, 1992).

Un factor es denominado angiogénico directo cuando es capaz de inducir la proliferación y/o migración de las células endoteliales "in vivo" y estimularlas "in vitro". Cuando la acción "in vitro" falla o es inhibida se le considera entonces indirecto, considerándose que moviliza a otros factores o células "in vivo". De esta manera los factores angiogénicos pueden actuar principal o específicamente sobre las células endoteliales o por el contrario pueden ser pleiotrópicos, actuando sobre otras células como fibroblastos, células musculares lisas, etc.

Teniendo en cuenta lo previamente expuesto, los factores angiogénicos pueden ser quimiotácticos y mitogénicos de forma simultánea o que simplemente favorezcan la angiogénesis de forma indirecta (Klagsbrun y

Folkman, 1991). Entre los directos figuran el factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (bFGF) (Folkman y Klagsbrun, 1987; Gospodarowicz et al., 1987; Klagsbrun y Vlodavsky, 1988; Folkman y Haudenschild, 1980), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Connolly et al., 1989; Keck et al., 1989; Leung et al., 1989) y el derivado de plaquetas y endotelio (PD-EGF) (Thomas et al., 1985; Gospodarowicz et al., 1987; Miyazono et al., 1987; Ishikawa et al., 1989; Ferrara et al., 1989; Leung et al., 1989).

Los factores angiogénicos indirectos cubren un amplio abanico de sustancias, tales como factor transformante del crecimiento alfa (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Schreiber et al., 1986), factor transformante del crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) (Roberts et al., 1986), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (FraterSchröder et al., 1987), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Sato et al., 1993), prostaglandinas de la serie E (Ziche et al., 1982), angiogeninas (Fett et al., 1985; Hallahan et al., 1991), monobutiril (Dobson et al., 1990), nicotinamida (Kull et al., 1987), adenosina, ácido ocadoico (Oikawa et al., 1992), ácido hidroxieicosatrienoico (Masferrer et al., 1991), algunos complejos cúpricos (Ziche et al., 1982; Raju et al., 1984; Folkman y Klagsbrun, 1987; Brem et al., 1990), productos de degradación del ácido hialurónico y productos finales en la glicosilación, relacionados con la edad (Cozzolino et al., 1990).

Algunas moléculas angiogénicas están presentes en determinados tejidos del adulto donde precisamente la angiogénesis no se produce (Gullino, 1981); haciendo esto posible que la respuesta angiogénica dependa de la activación local o inactivación de esas moléculas (Ziche et al., 1992).

En ocasiones los factores se potencian, así por ejemplo, se ha demostrado que el VEGF y el FGF actúan sinérgicamente en la inducción de la angiogénesis in vitro (Goto y cols. 1993; Pepper y cols. 1992a), hecho que ha sido confirmado in vivo en modelos realizados en conejo (Asahara y cols. 1995) y en modelo de implantes de esponja en rata (Hu y Fan 1995).

### **1.3 PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS**

En el presente trabajo de Tesis Doctoral nos proponemos investigar la acción de los posibles factores que se producen durante la formación del engrosamiento intimal sobre los fenómenos angiogénicos que acontecen en el entorno arterial. Con esta intención combinaremos hechos desarrollados y demostrados por nuestro grupo de trabajo con diferentes tipos de modelos experimentales. Por medio de dichos modelos intentaremos inducir la formación de hiperplasia intimal en segmentos arteriales, conectados o no con la circulación proximal. A su vez diseñaremos modelos experimentales en los que facilitaremos la extravasación de los posibles factores o sustancias hacia los territorios angiogénicos periarteriales con la finalidad de valorar su influencia en los mismos. Por último también estudiaremos el papel que juega la adventicia arterial en estos fenómenos, comparando modelos en los que retiraremos dicha capa con otros en los que dicha capa no sea retirada.

## **2 MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **2.1 MATERIAL.**

#### **2.1.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.**

El animal de experimentación empleado en ese trabajo de Tesis Doctoral ha sido la rata albina Sprague-Dawley. Los animales, por lo general, eran adultos jóvenes de un peso aproximado entre 250 y 300 gramos. Durante el tiempo que transcurrió entre las diferentes experiencias las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales y tanto la comida como el agua les fueron ofrecidas ad libitum.

#### **2.1.2 INSTRUMENTAL QUIRÚRGICO.**

El material quirúrgico empleado consistió en tijeras tipo Graziol, rectas del número 2, curvas tipo Lexer y de punta fina tipo Metzbaum, pinzas con dientes y sin dientes tipo Adson, portaagujas y pinzas hemostáticas, junto a diverso material de sutura como sedas de 3/0 y de 5/0, así como Ethicon 10/0.

Junto a todo este material se utilizó instrumental microquirúrgico específico para el tipo de intervenciones que se deseaba realizar; en particular, tijeras curvas tipo Reill, pinzas rectas tipo Düscherksen y portaagujas tipo Castroviejo.

### **2.1.3 MICROSCOPIO QUIRÚRGICO.**

Las intervenciones fueron realizadas y fotografiadas con la ayuda de un microscopio microquirúrgico ZEISS® (Opmi 1) dotado de visor auxiliar, cámara fotográfica, y cámara de televisión, lo que permitió realizar una secuencia gráfica de dichas intervenciones, posibilitando la comparación en el tiempo las modificaciones macroscópicas producidas.

### **2.1.4 ANESTESIA.**

El procedimiento anestésico seguido en ese trabajo consistió en la administración, por vía intraperitoneal, de ketamina (KETOLAR® , Parke-Davis; 50 mg/ml), a una dosis 15 mg/kg de peso. En todos los casos, se procuró no inyectar el producto anestésico en áreas próximas al hígado. Con las dosis antes mencionadas se alcanzó un nivel de anestesia adecuado a los 4-6 minutos, permaneciendo el animal en dicho estado un tiempo

aproximado de 45-90 minutos. En aquellas intervenciones que se prolongaron más allá de este límite de tiempo, se administró una nueva dosis (5 mg/kg de peso) de anestésico.

## **2.2 MÉTODO**

### **2.2.1 SERIES EXPERIMENTALES**

SERIE I: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA CON CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA

SUBSERIE I A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA CON CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA

SUBSERIE I B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA

SERIE II: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA

SUBSERIE II A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL Y CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA

SUBSERIE II B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL Y SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA

SERIE III: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL PUNCIÓNADO CON DOBLE LIGADURA Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA

SUBSERIE III A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL PUNCIÓNADO CON DOBLE LIGADURA Y CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA

SUBSERIE III B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL PUNCIÓNADO CON DOBLE LIGADURA Y SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA

SERIE IV: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL PUNCIÓNADO CON LIGADURA ÚNICA DISTAL Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA

SUBSERIE IV A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL PUNCIÓNADO CON LIGADURA ÚNICA DISTAL Y CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA

SUBSERIE IV B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL PUNCIÓNADO CON LIGADURA ÚNICA DISTAL Y SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA



## 2.2.2 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS TÉCNICAS QUIRÚRGICAS EMPLEADAS.

El animal de experimentación fue colocado en decúbito supino, con las extremidades hiperextendidas y en abducción completa. Tras desinfectar la cara anterior del muslo con povidona yodada, se realizó una incisión de 2 cm de longitud en dirección oblícuca desde el ligamento inguinal hasta una zona próxima a la cara interna de la rodilla, siguiendo el trayecto de los vasos femorales, los cuales fueron alcanzados en profundidad, después de separar piel y tejido celular subcutáneo. Una vez localizado el paquete vascular-nervioso femoral (**MA1**), se aisló cuidadosamente la arteria de las estructuras vecinas (vena femoral y ramas del nervio crural) (**MA2**). Finalizada la intervención diseñada para cada serie, se procedió a cerrar con puntos discontinuos de seda 3/0 que incluyeron todos los planos.

Transcurrido el tiempo de evolución previsto para cada uno de los animales, se procedió a la obtención de las muestras tras anestesia. Se alcanzó el territorio intervenido, realizando macro y microfotografías del mismo. Mediante pinzas y tijeras de microcirugía se liberó y se resecó el segmento arterial y los tejidos vecinos. Para conseguir una adecuada orientación de las piezas, éstas se dispusieron longitudinalmente sobre un soporte, fijándolas con formol o glutaraldehído, según las muestras fueran destinadas para microscopía óptica o electrónica respectivamente.

A continuación pasamos a describir las diferentes series realizadas en este trabajo de Tesis Doctoral, divididas en 4 grupos, según el número de

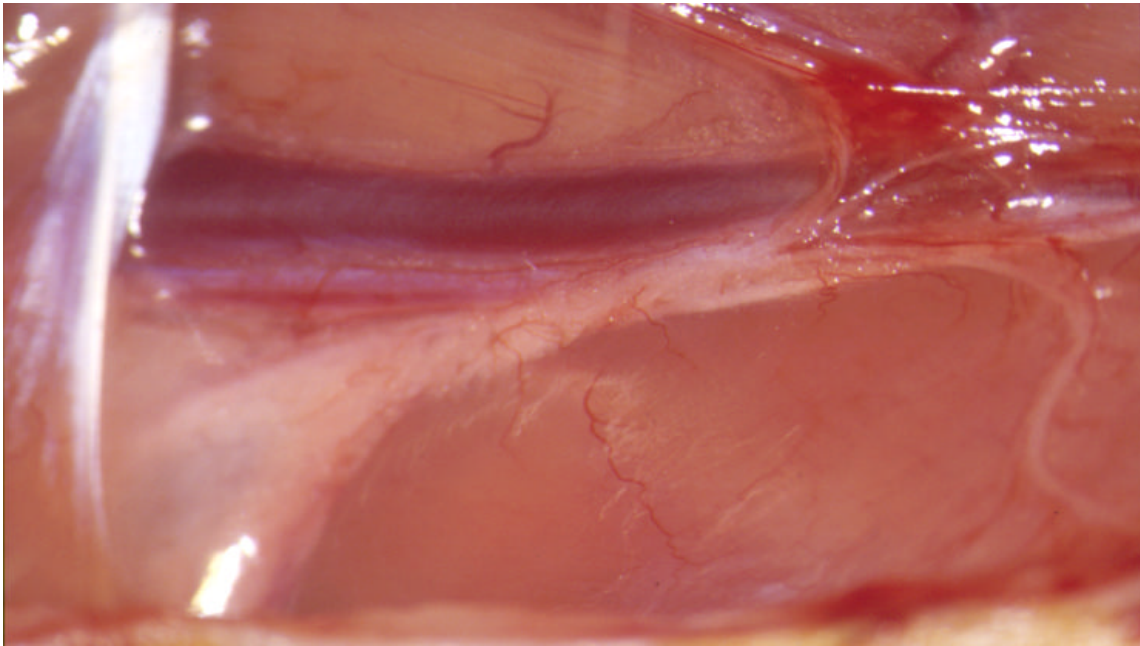
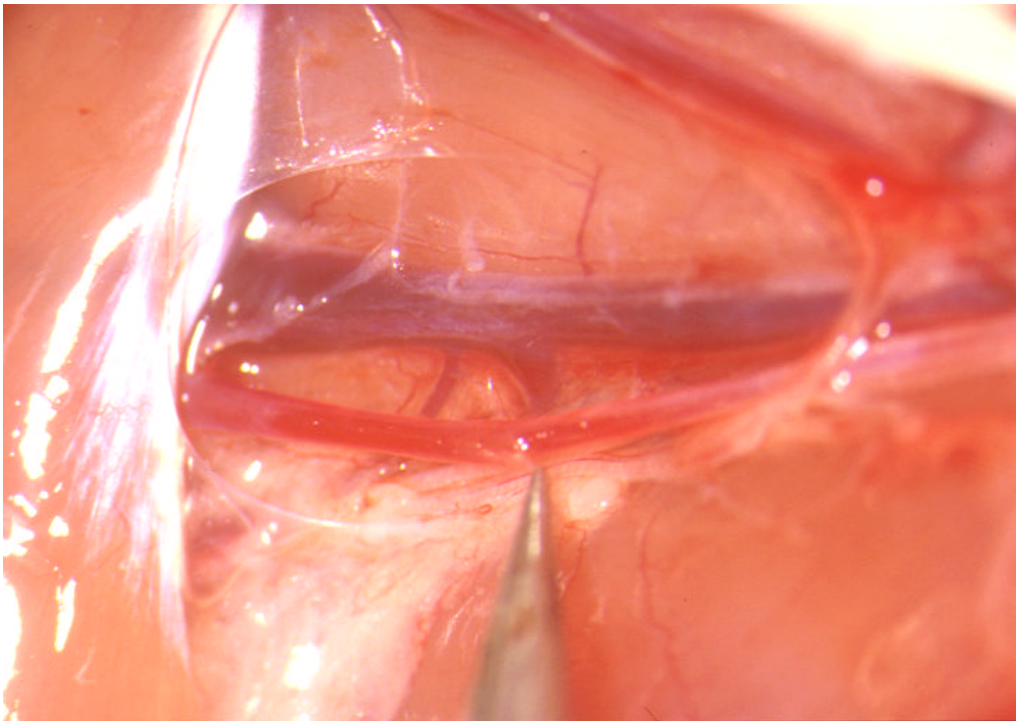


Figura macroscópico 1 (MA1): Se observa el paquete vasculonervioso femoral, expuesto después de separar la piel y el tejido celular subcutáneo.

Figura macroscópico 2 (MA2): Imagen macroscópica del momento en que se aísla cuidadosamente la arteria de las estructuras vecinas (vena femoral y ramas del nervio crural)



ligaduras y la punción o no de la arteria. Estos cuatro grupos se subdividen a su vez, según se haya conservado o no la adventicia arterial, hasta hacer un total de 8 series (véase tablas 1-8).

### ***2.2.2.1 Serie I: segmento de arteria femoral entre doble ligadura con conservación o no de la adventicia***

En la subserie I A, una vez separada la arteria femoral de los elementos circundantes, se le practicaron dos ligaduras con seda de 10/0; una inmediatamente por debajo del ligamento inguinal y la otra a 1,0 centímetro de distancia de la primera en sentido cefalocaudal, ligando todas aquellas colaterales que se originaron en dicho segmento.

Con el fin de estudiar los cambios producidos en la arteria femoral, los animales fueron sacrificados cronológicamente por parejas en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 21, 30 tras la ligadura de dicho vaso. A la hora de obtener las muestras se extrajo todo el paquete vasculonervioso en bloque, es decir arteria y vena femorales, así como las ramas del nervio crural.

En la subserie I B, después de efectuar las ligaduras del segmento arterial se llevó a cabo la retirada cuidadosa de la adventicia arterial mediante pinzas de microcirugía (**MA3**). El resto de los procedimientos fue similar para ambas subseries.

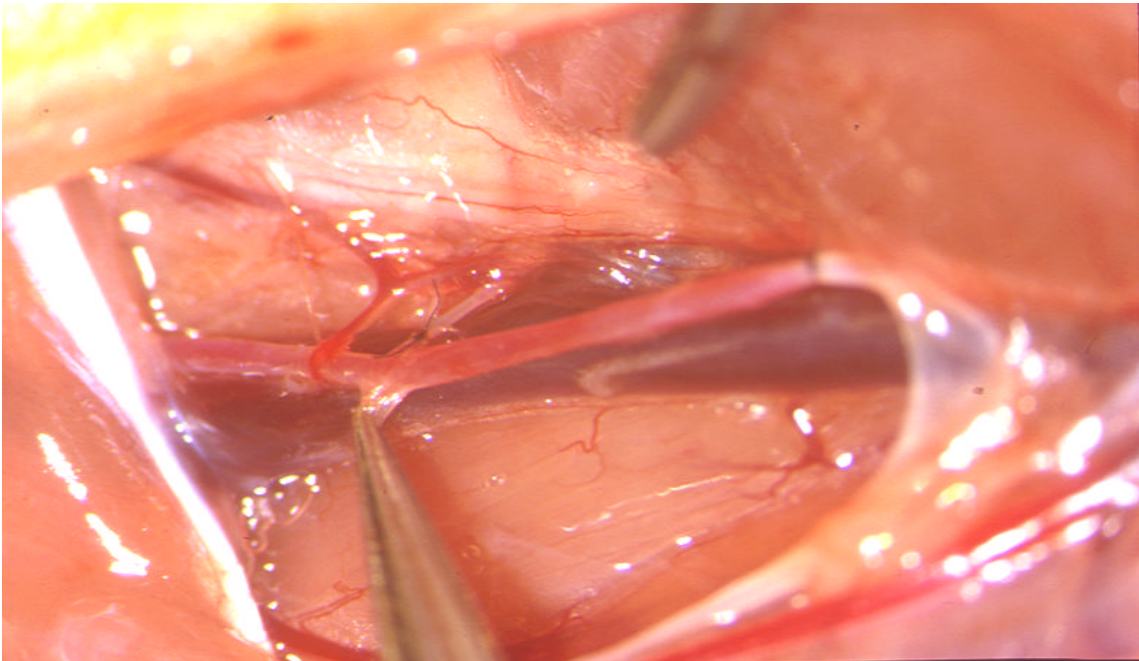
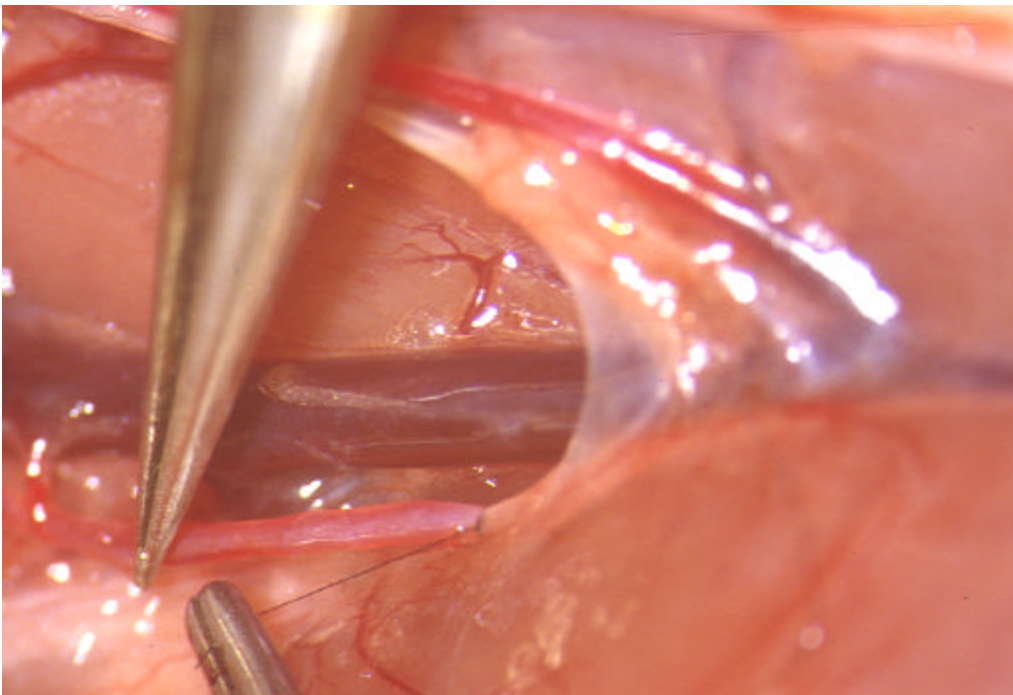


Figura macroscópico 3 (MA3): Obsérvese la retirada cuidadosa de la adventicia arterial mediante pinzas de microcirugía en la subserie IB.

Figura macroscópico 4 (MA4): Momento en el que se practica la ligadura distal de la arteria femoral.



### ***2.2.2.2 Serie II: segmento de arteria femoral con ligadura única distal y conservación o no de la adventicia***

En la subserie II A se practicó la ligadura del segmento distal de la arteria femoral **(MA4)** junto con la colateral más proximal a dicha ligadura, con el mismo tipo de hilo que en la experiencia anterior, creando una columna sanguínea. El procedimiento seguido en la obtención del material de estudio fue similar al descrito para la serie previa. A lo largo de esta experiencia, también se fueron sacrificando los animales siguiendo los mismos intervalos de la serie anterior en número de dos por sesión.

En la subserie II B se realizó igual procedimiento, al que se añadió la retirada de la adventicia arterial por cuidadosa disección de la misma.

### ***2.2.2.3 Serie III: segmento de arteria femoral con doble ligadura puncionado y conservación o no de la adventicia***

En la subserie III A se efectuó el mismo procedimiento que en la I A y, a continuación, después de detenido el flujo arterial, se procedió a practicar 15 micropunciones, con aguja de punta redonda en su mitad distal, en el segmento arterial ocluido **(MA5)**.

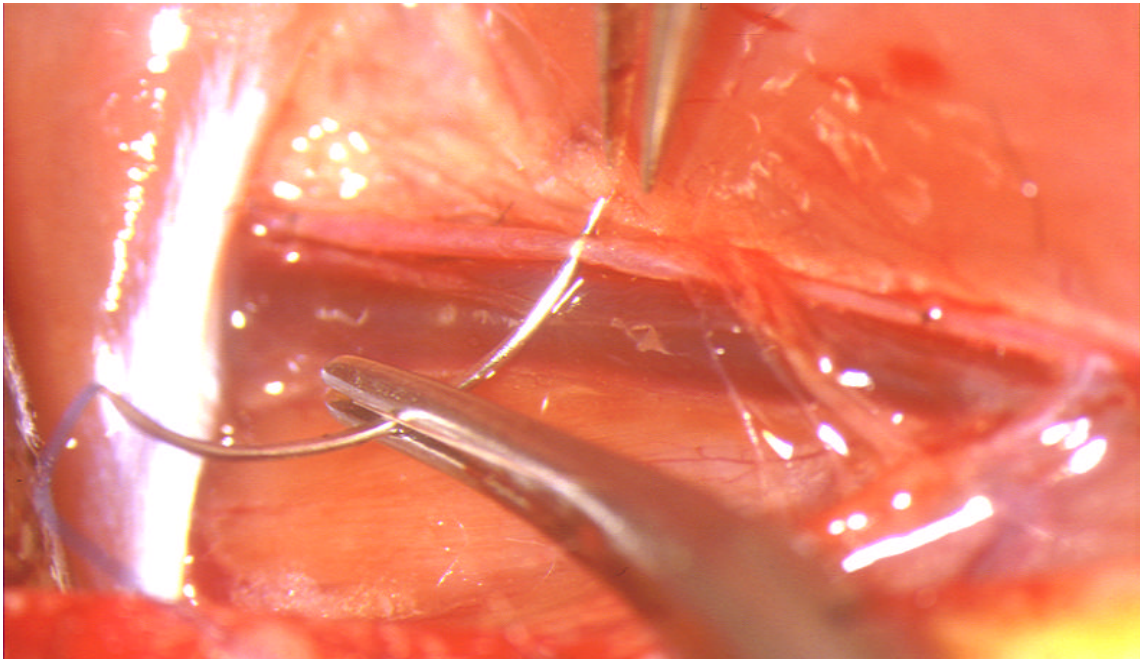
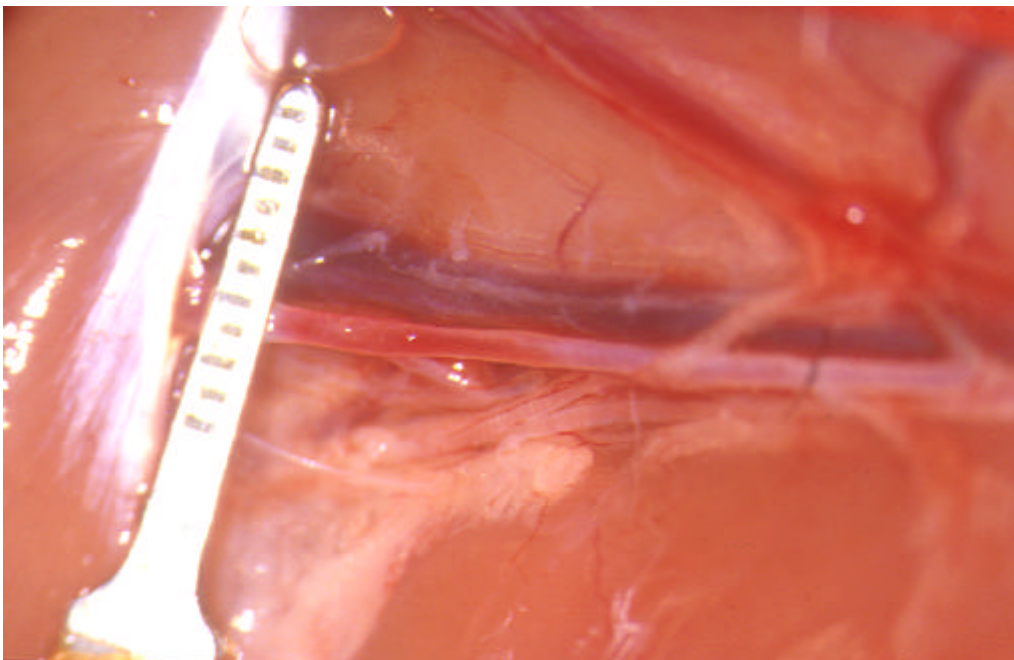


Figura macroscópico 5 (MA5): Se pone de manifiesto el momento de efectuar una micropunción en el segmento de la arteria femoral entre doble ligadura (subserie IIA)

Figura macroscópico 6 (MA6): Arteria femoral con ligadura única distal. Se pone de manifiesto la colocación de un clamp proximal.



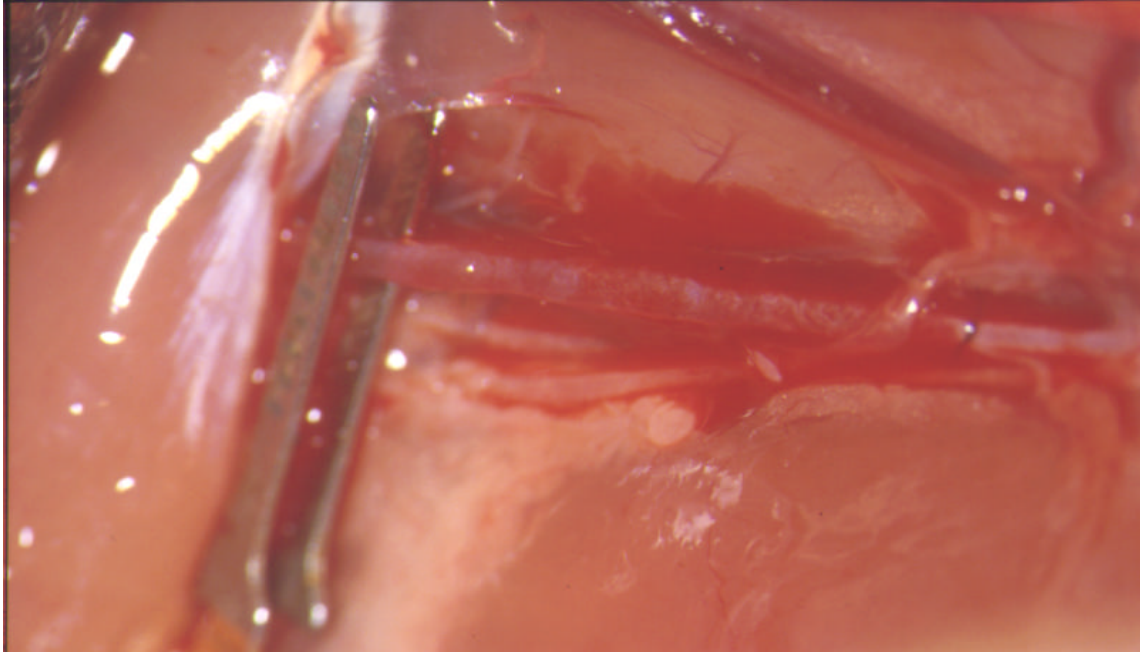


Figura macroscópico 7 (MA7): Después de efectuar 15 micropunciones en el segmento de arteria femoral con sólo ligadura distal y de la colateral, se procede a retirar el clamp de forma paulatina e intermitente, permitiendo la coagulación sanguínea en los espacios de punción.

En la subserie III B, se retiró la adventicia arterial previamente a las ligaduras y, una vez realizadas éstas, se procedió a efectuar 15 micropunciones en el segmento ocluido con igual tipo de aguja que el descrito previamente.

#### ***2.2.2.4 Serie IV: segmento de arteria femoral con ligadura única distal puncionado y conservación o no de la adventicia***

En la subserie IV A, al igual que en la II A, se practicó ligadura única distal de la arteria femoral, lográndose la formación de la columna sanguínea. A continuación se colocó un clamp **(MA6)**, se ligó la colateral y se efectuaron 15 micropunciones, del mismo modo que en la serie III, en el segmento más proximal a la ligadura. En este caso, el clamp fue retirado muy lentamente para permitir la coagulación progresiva de las zonas de punción, evitando con ella una extravasación sanguínea intensa. Para esto se abrió discretamente el clamp, de forma intermitente, con lo que sale cantidad de sangre, permitiendo la coagulación en los espacios de punción **(MA7)**.

En la subserie IV B se realizó igual procedimiento que en la IV A, pero se le retiró previamente la adventicia al segmento arterial de estudio.

Al igual que en series anteriores, en la subserie se retiró previamente la adventicia.



## **2.3 TÉCNICA HISTOLÓGICA**

### **2.3.1 MICROSCOPIA ÓPTICA**

#### ***2.3.1.1 Técnicas histológicas para microscopía óptica convencional***

En este trabajo de Tesis Doctoral se llevaron a cabo técnicas convencionales tanto para microscopía óptica como electrónica, las que incluyen gran variedad de tinciones y trabajos de inmunohistoquímica. Para el primer tipo de estudio las arterias femorales junto con el resto del paquete vasculonervioso, fueron fijadas, una vez extraídas, en una solución acuosa de formaldehído al 10% y talladas. Las muestras fueron procesadas en un Autotechnicon 2-A (Autotechnicon S.A.) para completar la fijación y realizar la deshidratación en inclusión en parafina. A continuación, con un dispensador de parafina Tissue-Tek II (Ames), se conformaron los bloques tisulares de parafina, para luego ser seccionados en cortes de 7  $\mu\text{m}$  de espesor en un microtomo Biocut 1130 (Reichert-Jung).

### **2.3.1.2 Tinciones histológicas**

En nuestro trabajo, y con el fin de estudiar los diferentes componentes de los fenómenos neoangiogénicos y del engrosamiento intimal, se realizaron las siguientes tinciones:

#### **2.3.1.2.1 Hematoxilina-eosina**

Fijación: Formol 10%

Cortes: Parafina 5

#### **SOLUCIONES DE TRABAJO:**

Hematoxilina de Harris

Solución "A"

Hematoxilina en polvo .....5 g

Alcohol Etílico 100%.....50 cc.

Solución "B"

Alumbre Potásico Cristalizado .....100 g

Agua Destilada.....800 c.c.

ii EL ALUMBRE SE DISUELVE EN CALIENTE !!

A las 24 horas se mezclan las soluciones "A" y "B" y se añaden 2,5 gr de óxido de mercurio rojo. Se hierve esta solución 30 minutos y se coloca en un matraz destapado que se introduce en agua fría.

Eosina	
Eosina.....	2 g
Agua Destilada.....	160 c.c.
Etanol 96% .....	640 c.c.
Acido Acético Glacial .....	9 gotas

#### TÉCNICA:

1. Desparafinar e Hidratar
2. Hematoxilina de Harris (1´-2´)
3. Lavar en Agua Corriente
4. Teñir con Eosina (1´-2´)
5. Deshidratar a partir de Etanol 90%, 96% y 100%
6. Carbolxilol, Xilol y montaje corriente en Eukitt

La Hematoxilina es un producto obtenido de la savia oxidada de una árbol de Méjico y cultivado intensamente en Jamaica : "Haematoxylon campechianum" (árbol del campeche)

#### **2.3.1.2.2 Van Gieson (fibras colagenas)**

Fijación: Formol 10%                      Cortes: Parafina, 5

#### SOLUCIONES DE TRABAJO

Hematoxilina de Weigert

SOLUCIÓN "A"

Hematoxilina.....1 gramo

Alcohol Etílico 96%.....100 c.c.

#### SOLUCIÓN "B"

Cloruro Férrico 25%.....4 c.c.

Acido Clorhídrico Comercial.....1 c.c.

Agua Destilada.....95 c.c.

#### Solución de Picrofucsina

Ácido Pícrico a saturación.....95 c.c.

Fucsina Ácida 1%.....3-5 c.c.

#### TÉCNICA

1. Desparafinar e hidratar
2. Hematoxilina de Weigert (A :B, a partes iguales, 10´)
3. Lavar en Agua Destilada
4. Contrastar con Pirofucsina (5´)
5. Deshidratar a partir de etanol 90%, 96% y 100%
6. Carbolxilol, Xilol y montaje corriente en Eukitt

FONDO Y NUCLEOS: AMARILLO-VERDOSO

FIBRAS COLAGENAS: ROSADAS-ROJAS

### 2.3.1.2.3 Tricrómico de Masson-Goldner (fibras colagenas)

Fijación: Formol 10% Cortes: Parafina 5, gelatinados

#### SOLUCIONES DE TRABAJO

##### SOLUCIÓN BOUIN

Acido Pítrico a Saturación.....750 c.c.  
Formol Comercial.....250 c.c.  
Acido Acético Glacial.....50 c.c.

##### SOLUCIÓN DE HEMATOXILINA DE WEIGERT

(Ver Técnica de Van Gieson)

##### SOLUCIÓN BIEBRICH ESCARLATA-FUCSINA ACIDA

Biebrich Escarlata 1%.....90 c.c.  
Fucsina Acida 1%.....10 c.c.  
Acido Acético Glacial.....1 c.c.

##### SOLUCIÓN ACIDO FOSFOTUNGSTICO-ACIDO FOSFOMOLIBDICO

Ácido Fosfotúngstico.....5 gramos  
Acido Fosfomolibdico.....5 gramos  
Agua Destilada.....200 c.c.

##### SOLUCIÓN DE AZUL DE ANILINA

Azul de Anilina.....2,5 gramos  
Agua Destilada.....100 c.c.

Acido Acético Glacial.....2 c.c.

#### SOLUCIÓN DE VERDE LUZ

Verde Luz.....2 gramos

Agua Destilada.....99 c.c.

Acido Acético Glacial.....1 c.c.

#### SOLUCIÓN DE ACIDO ACETICO 1%

Acido Acético Glacial.....1 c.c.

Agua Destilada.....99 c.c.

#### TÉCNICA

1. Desparafinar e Hidratar hasta Agua Destilada
2. Solución Bouin (toda la noche)
3. Agua Corriente (hasta decolorar)
4. Lavar en Agua Destilada
5. Teñir con Hematoxilina de Weigert (10´)
6. Lavar con Agua Corriente y a continuación con Agua Destilada
7. Solución de Biebrich Escarlata-Fucsina Acida (2´)
8. Solución de Acido Fosfotúngstico-Acido Fosfomolibdico (2´)
9. Solución de Azul de Anilina (5´) o Verde Luz (15´)
10. Lavar en Agua Destilada
11. Solución de Acido Acético (4´)
12. Deshidratar a partir de Etanol de 90%, 96% y 100%
13. Carbolxilol y Xilol
14. Montaje corriente en Eukitt

## RESULTADOS

Fibras Colágenas: Si se empleó el Azul de Anilina, toman una coloración AZUL. Si se usa la alternativa del Verde Luz, el color es VERDE

Núcleos: Negro

Citoplasma, Queratina y Células Musculares Lisas : Rojo

### **2.3.1.2.4 Orceína (fibras elasticas)**

Fijación: Formol 10%

Cortes: Parafina 5□

## SOLUCIONES DE TRABAJO

### Solución de orceina

Orceína.....0,5 gr

Acido Clorhídrico Comercial.....0,5 c.c.

Alcohol Etílico Absoluto.....50 c.c.

### Solución de alcohol rectificado

Alcohol Etílico Absoluto.....99 c.c.

Acido Clorhídrico Comercial.....1 c.c.

## TÉCNICA:

1. Desparafinar e Hidratar hasta Agua destilada
2. Solución de Orceína (1 hora)
3. Lavar en Agua Corriente
4. Solución de Alcohol Rectificado (Hasta Decolorar la muestra)
5. Lavar en Agua Corriente
6. Teñir con Hematoxilina de Harris (1 ´)
7. Lavar en Agua Corriente
8. Deshidratar a partir de Etanol 90%, 96% y Absoluto
9. Carbolxilol y Xilol
10. Montaje corriente en Eukitt

## RESULTADOS

Fibras elásticas : rojo

Núcleos y fondo : violeta pálido



## **2.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

### ***2.3.2.1 Obtención de las muestras***

### ***2.3.2.2 Procesamiento***

El fijador empleado en la fase experimental de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido el glutaraldehído diluido al 2,5% en tampón Milloning (10 ml de glutaraldehído comercial al 25% en 90 ml de tampón).

La elaboración de dicho tampón se consiguió al mezclar fosfato monosódico al 2,26%, hidróxido sódico al 2,52%, glucosa al 5,4% y cloruro cálcico al 1%, para lograr al final de la mezcla un pH comprendido entre 7,2 y 7,4.

### ***2.3.2.3 Inclusión***

Nuestro grupo de trabajo utilizó como material de inclusión para microscopía electrónica la resina tipo EPON. Para ello, en primer lugar se lavaron las muestras procedentes del glutaraldehído en una solución

tamponada de cacodilato sódico durante treinta minutos en dos pases de 15 minutos.

Este tipo de tampón en forma de solución se consiguió al mezclar 2,14 g de cacodilato sódico en 500 cc de agua destilada, añadiéndose posteriormente 3,45 cc de ácido clorhídrico comercial en agua destilada hasta alcanzar 25 cc.

Para lavar los tejidos la solución empleada se obtuvo mezclando al 50% la solución stock de cacodilato sódico con agua destilada.

#### **2.3.2.4 Postfijación**

Posteriormente, los tejidos se introdujeron en tetróxido de osmio durante un tiempo comprendido entre 1 y 20 horas a una temperatura que osciló entre 4 y 6 grados centígrados.

El tetróxido de osmio se logró disolviendo una ampolla de 50 mg en 5 cc de tampón cacodilato sódico (0,1 molar). Dada la alta toxicidad del osmio, la cápsula de vidrio de su envase tuvo que romperse en el interior del frasco donde posteriormente se introdujo el tampón.

### **2.3.2.5 Deshidratación de los tejidos**

Pases de 15 minutos por alcoholes de graduación creciente, comenzando por alcohol al 50%, 75%, 95% y, finalmente, en dos ocasiones, por alcohol absoluto, consiguieron la deshidratación de los tejidos.

### **2.3.2.6 Inclusión en resina**

#### **I) PRIMERA FASE**

Para facilitar la imbibición de las muestras por la resina, se introdujeron éstas primeramente durante 15 minutos en óxido de propileno.

#### **II) SEGUNDA FASE**

En esta etapa se mezcló Resina propiamente dicha, Acelerador y Endurecedor. Para ello se combinaron 30 g de EPIKOTE (Epon 812 Substitute) con 27 cc de DDSA (Endurecedor). Tras conseguir una mezcla homogénea, se añadieron 3 cc de MNA (Endurecedor) y 1,2 cc de BDMA (Acelerador), mezclándose de nuevo.

Con posterioridad, conseguida una solución homogénea, se disolvió, a una proporción 1:1, resina y óxido de propileno. La mezcla resultante se mantuvo durante un tiempo que osciló de 30 a 45 minutos, en cámara de vacío a una atmósfera de presión. La finalidad de este procedimiento fue la

de extraer el aire que pudiera quedar albergado en la mezcla, dada su alta viscosidad.

### III) TERCERA FASE

Antes de la realización de los bloques, se sumergieron las piezas en resina, empleando recipientes al vacío, durante una hora.

#### ***2.3.2.7 Realización de las pirámides***

Seguidamente las piezas fueron orientadas según el eje deseado, empleando moldes de silicona para realizar las pirámides. La polimerización de la resina se obtuvo en estufa a 65 °C durante 12 horas.

#### ***2.3.2.8 Preparación de los cortes semifinos***

Una vez enfriados los bloques o pirámides, éstos fueron tallados en el piramidótomo (LKB<sup>®</sup> modelo de 11800) hasta alcanzar el tejido. Seguidamente fueron colocados en el Ultramicrotomo (LKB<sup>®</sup>, modelo Ultratome III 8800), y con la orientación precisa se realizaron cortes de una micra de espesor (cortes semifinos).

Tras extender los cortes, se procedió a su tinción con AZUL DE TOLUIDINA (1 g de Azul de Toluidina y 1 g de Bórax en 100 cc de agua destilada).

### **2.3.2.9 Preparación y estudio de los cortes ultrafinos**

Estudiados los cortes, y fotografiados los detalles más importantes, empleando un microscopio NIKON® OPTIPHOT, se escogieron las zonas más adecuadas de los mismos para estudiarlas ultraestructuralmente. Se retallaron las pirámides y se realizaron cortes de un espesor de 600 Å (cortes ultrafinos).

Posteriormente los tejidos fueron recogidos en rejillas de cobre electrolítico y tratados con acetato de uranilo y citrato de plomo.

El primero es el producto de disolver 7,5 g de acetato de uranilo en 10 cc de alcohol etílico al 50%, y el segundo se elaboró con una mezcla a partes iguales (2g) de varias sales de plomo (Nitrato, Acetato y Citrato), disueltas en 170 cc de agua destilada y añadiendo a la mezcla 4 g de citrato de sodio. Una vez conseguido esto, se añadieron 40 cc de hidróxido sódico, adquiriendo la mezcla final un aspecto transparente. Antes de usarla, requiere ser filtrada. Hay que destacar que ésta puede conservarse a temperatura ambiente durante más de un año.

El procedimiento seguido para contrastar los tejidos, consistió en sumergir las rejillas de acetato de Uranilo durante 15 segundos, lavar con

agua destilada y volver a sumergir en citrato de plomo durante el mismo período de tiempo.

En ambos casos, se utilizó un horno microondas de 1000 W a una potencia del 50%. Por último, y antes de su observación en un microscopio electrónico marca JEOL 1000 B, se lavaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro en una placa de Petri.

## **2.3.3 INMUNOHISTOQUIMIA**

### ***2.3.3.1 Portas gelatinados***

Se disuelven 0,3 g de gelatina en polvo en 100 cc de agua destilada a 70-80 °C. A continuación se bañan los portas en la solución obtenida y se secan rápidamente en un horno microondas durante 2' a una potencia del 100%.

### **2.3.3.2 Técnica (complejo avidina-biotina (ABC))**

1. Cortes en portas gelatinados y dejar en estufa 12 h a 37 °C
2. Desparafinar y luego pretratamiento con tripsina 1' para vimentina (BIOGENEX – Palo Alto, California) y en olla exprés con citrato 2' en el caso de la actina (DAKOPATTS – Copenhague, Dinamarca) y la desmina (ZYMED – Palo Alto, California)
3. Lavar con PBS
4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más metanol (bloqueo de la peroxidasa endógena) 10'
5. Lavar en PBS
6. Anticuerpo primario 45PBS 5' Estufa a 37°C
7. Avidina durante 30' Estufa a 37°C
8. PBS 5'
9. Estreptoavidina-Biotina 30' Estufa a 37°C
10. PBS 5'
11. Cromógeno (Diaminobencidina) 10'
12. Lavar en agua corriente
13. Hematoxilina 30"
14. Hidratar y montar

## 2.4 ESTUDIOS CUANTITATIVOS

Para calcular la capacidad angiogénica a partir de la vena femoral, se eligió un método simple y reproducible. En cada muestra se cortaron cinco secciones de 1,5 mm de espesor, orientando los vasos longitudinalmente, con un intervalo aproximado de 20 mm. Se consideraron los 5 mm de longitud proximales y distales por separado en cada sección. Es decir, dos medidas en cada caso, con una longitud total de 25 mm en cada medida. El número de capilares neoformados que aparecían surgiendo desde la íntima de la pared venosa seccionada, en los 25 mm, fue definido como la densidad neocapilar (DNC). El valor medio y la desviación estándar fueron calculados a continuación. El estudio estadístico fue hecho con el análisis de la varianza (ANOVA), seguido por comparaciones t-test. El análisis fue hecho usando el programa estadístico SPSS. La significación estadística fue definida como  $p < 0,05$ .



**Tabla 1 : SERIE IA**

<b>Nº de experiencia</b>	<b>Día de experiencia</b>	<b>Días transcurridos</b>	<b>Día de extracción</b>
1.	18.06.98	1	19.06.98
2.	18.06.98	1	19.06.98
3.	24.06.98	2	26.06.98
4.	24.06.98	2	26.06.98
5.	24.06.98	30	24.07.98
6.	26.06.98	21	17.07.98
7.	30.06.98	3	03.07.98
8.	30.06.98	3	03.07.98
9.	06.07.98	4	10.07.98
10.	06.07.98	4	10.07.98
11.	10.07.98	10	20.07.98
12.	14.07.98	5	19.07.98
13.	14.07.98	5	19.07.98
14.	17.07.98	7	24.07.98
15.	17.07.98	7	24.07.98
16.	20.07.98	6	26.07.98
17.	20.07.98	6	26.07.98

**Tabla 2 : SERIE IB**

<b>Nº de experiencia</b>	<b>Día de experiencia</b>	<b>Días transcurridos</b>	<b>Día de extracción</b>
18.	02.09.98	30	02.10.98
19.	03.09.98	1	04.09.98
20.	03.09.98	1	04.09.98
21.	09.09.98	2	11.09.98
22.	09.09.98	2	11.09.98
23.	15.09.98	3	18.09.98
24.	15.09.98	3	18.09.98
25.	21.09.98	4	25.09.98
26.	21.09.98	4	25.09.98
27.	29.09.98	5	04.10.98
28.	29.09.98	5	04.10.98
29.	02.10.98	21	23.10.98
30.	05.10.98	6	11.10.98
31.	05.10.98	6	11.10.98
32.	06.10.98	10	16.10.98
33.	16.10.98	7	23.10.98
34.	16.10.98	7	23.10.98

**Tabla 3 : SERIE IIA**

<b>Nº de experiencia</b>	<b>Día de experiencia</b>	<b>Días transcurridos</b>	<b>Día de extracción</b>
35.	28.10.98	1	29.10.98
36.	28.10.98	1	29.10.98
37.	04.11.98	2	06.11.98
38.	04.11.98	2	06.11.98
39.	10.11.98	3	13.11.98
40.	10.11.98	3	13.11.98
41.	16.11.98	4	20.11.98
42.	16.11.98	4	20.11.98
43.	20.11.98	30	20.12.98
44.	24.11.98	5	29.11.98
45.	24.11.98	5	29.11.98
46.	24.11.98	10	04.12.98
47.	29.11.98	21	20.12.98
48.	04.12.98	6	10.12.98
49.	04.12.98	6	10.12.98
50.	11.12.98	7	18.12.98
51.	11.12.98	7	18.12.98

**Tabla 4 : SERIE IIB**

<b>Nº de experiencia</b>	<b>Día de experiencia</b>	<b>Días transcurridos</b>	<b>Día de extracción</b>
52.	08.01.99	2	10.01.99
53.	08.01.99	2	10.01.99
54.	14.01.99	1	15.01.99
55.	14.01.99	1	15.01.99
56.	19.01.99	3	22.01.99
57.	19.01.99	3	22.01.99
58.	25.01.99	4	29.01.99
59.	25.01.99	4	29.01.99
60.	29.01.99	30	28.02.99
61.	04.02.99	10	14.02.99
62.	05.02.99	5	10.02.99
63.	05.02.99	5	10.02.99
64.	05.02.99	21	26.02.99
65.	19.02.99	7	26.02.99
66.	19.02.99	7	26.02.99
67.	22.02.99	6	28.02.99
68.	22.02.99	6	28.02.99

**Tabla 5 : SERIE IIIA**

<b>Nº de experiencia</b>	<b>Día de experiencia</b>	<b>Días transcurridos</b>	<b>Día de extracción</b>
69.	04.03.99	1	05.03.99
70.	04.03.99	1	05.03.99
71.	05.03.99	30	04.04.99
72.	10.03.99	2	12.03.99
73.	10.03.99	2	12.03.99
74.	15.03.99	3	18.03.99
75.	15.03.99	3	18.03.99
76.	16.03.99	10	26.03.99
77.	18.03.99	21	08.04.99
78.	22.03.99	4	26.04.99
79.	22.03.99	4	26.04.99
80.	30.03.99	5	04.04.99
81.	05.04.99	6	11.04.99
82.	05.04.99	6	11.04.99
83.	05.04.99	6	11.04.99
84.	09.04.99	7	16.04.99
85.	09.04.99	7	16.04.99

**Tabla 6 : SERIE IIIB**

<b>Nº de experiencia</b>	<b>Día de experiencia</b>	<b>Días transcurridos</b>	<b>Día de extracción</b>
86.	22.04.99	1	23.04.99
87.	22.04.99	1	23.04.99
88.	23.04.99	30	23.05.99
89.	28.04.99	2	30.04.99
90.	28.04.99	2	30.04.99
91.	04.05.99	3	07.05.99
92.	04.05.99	3	07.05.99
93.	04.05.99	21	05.05.99
94.	07.05.99	10	17.05.99
95.	10.05.99	4	14.05.99
96.	10.05.99	4	14.05.99
97.	17.05.99	6	23.05.99
98.	17.05.99	6	23.05.99
99.	25.05.99	5	30.05.99
100.	25.05.99	5	30.05.99
101.	28.05.99	7	04.06.99
102.	28.05.99	7	04.06.99

**Tabla 7 : SERIE IVA**

<b>Nº de experiencia</b>	<b>Día de experiencia</b>	<b>Días transcurridos</b>	<b>Día de extracción</b>
103.	10.06.99	1	11.06.99
104.	10.06.99	1	11.06.99
105.	16.06.99	2	18.06.99
106.	16.06.99	2	18.06.99
107.	18.06.99	10	28.06.99
108.	22.06.99	3	25.06.99
109.	22.06.99	3	25.06.99
110.	25.06.99	30	25.07.99
111.	28.06.99	4	02.07.99
112.	28.06.99	4	02.07.99
113.	02.07.99	21	23.07.99
114.	06.07.99	5	11.07.99
115.	06.07.99	5	11.07.99
116.	12.07.99	6	18.07.99
117.	12.07.99	6	18.07.99
118.	16.07.99	7	23.07.99
119.	16.07.99	7	23.07.99

**Tabla 8 :SERIE IVB**

<b>Nº de experiencia</b>	<b>Día de experiencia</b>	<b>Días transcurridos</b>	<b>Día de extracción</b>
120.	02.09.99	1	03.09.99
121.	02.09.99	1	03.09.99
122.	05.09.99	30	05.10.99
123.	08.09.99	2	10.09.99
124.	08.09.99	2	10.09.99
125.	14.09.99	3	17.09.99
126.	14.09.99	3	17.09.99
127.	14.09.99	21	05.10.99
128.	20.09.99	4	24.09.99
129.	20.09.99	4	24.09.99
130.	24.09.99	10	04.10.99
131.	28.09.99	5	03.10.99
132.	28.09.99	5	03.10.99
133.	28.09.99	7	07.10.99
134.	03.10.99	7	10.10.99
135.	04.10.99	6	10.10.99
136.	04.10.99	6	10.10.99

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 SERIE I: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA**

#### **3.1.1 SUBSERIE I A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA CON CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA**

##### ***3.1.1.1 Descripción macroscópica:***

En las primeras 24-48 horas, las arterias intervenidas presentaban, tras retirar las cubiertas conectivas neoformadas en su entorno, una coloración rojo-oscura, mostrándose turgentes. En algunas de ellas se observaron pequeñas áreas con coloración negruzca. Al perforar la pared arterial se puso de manifiesto material hemático. La superficie interna de los segmentos arteriales fue lisa y de coloración blanquecina.

En días posteriores, la arteria siguió presentando color rojo-oscuro que, desde el día 7 en adelante fue adquiriendo un aspecto sonrosado. Hacia el día 7-8 se demostró, a la apertura de la arteria, neotejido intraluminal

altamente vascularizado, cuyas características recordaban al tejido de granulación y que ocupa la práctica totalidad de la primitiva luz arterial. Desde el día 9 en adelante se pone de manifiesto mediante microscopio estereoscópico un engrosamiento de la íntima arterial, con formación de una neoluz que reproduce la primitiva luz arterial. En estas fases se demostró una circulación preferencial intraarterial, conectada con los vasos periarteriales. La zona de las ligaduras siguió siendo estanca. En las fases avanzadas del experimento (días 15-30) el segmento arterial conservaba un aspecto circulante, aunque su diámetro aparecía ligeramente disminuido.

### ***3.1.1.2 Descripción microscópica:***

Pared venosa:

Durante todas las etapas de la experiencia, la pared venosa muestra escasas modificaciones morfológicas. Cuando se realizan cortes seriados pueden observarse en estadios iniciales (días 2 y 3) activación focal de las células endoteliales, las cuales aparecen incrementadas de volumen, haciendo prominencia hacia la luz de la vena. Entre los días 3 y 5 se observan ocasionales células endoteliales que atraviesan la pared venosa, con formación de yemas vasculares en número escaso (**fig. 1**) (**tabla 9**). Hacia el día 7 de iniciado el experimento y en adelante es excepcional la observación de algún microvaso conectado con la luz venosa a través de la pared de la vena. En la tabla 9 se ponen de manifiesto los hechos

cuantitativos referentes a la microvascularización originada desde la pared venosa.

Espacio arteriovenoso:

En el espacio arteriovenoso se forma una red microvascular similar a la existente en todo el perímetro de la adventicia arterial. Entre los días 3 y 6, la red microvascular adquiere su máximo desarrollo y luego involuciona, persistiendo solamente algunas áreas focales, con vasos incrementados en número con respecto a las condiciones de normalidad.

Pared y luz arterial:

El estudio histológico de la pared arterial, en las primeras 24-48 horas revela un discreto infiltrado de polinucleares neutrófilos, así como dilatación y congestión en los vasos localizados en la adventicia. En algunos cortes es posible observar polinucleares neutrófilos migrando hacia el intersticio entre las células endoteliales de capilares y vénulas postcapilares. En cortes ultrafinos se distinguen modificaciones alterativas en las células musculares lisas de la capa media (**fig.2**), consistentes en acúmulos de material contráctil, y en la cubierta endotelial, con vacuolización mitocondrial y citoplásmica.

Los frotis realizados a partir del material hemático intraluminal evidencian hematíes, escaso número de plaquetas, polimorfonucleares neutrófilos, así como células elongadas, aisladas o en grupos, de núcleo ovoide o alargado, que se corresponden con células endoteliales descamadas. Entre las 48 y 72 horas, la luz vascular, prácticamente sin límite

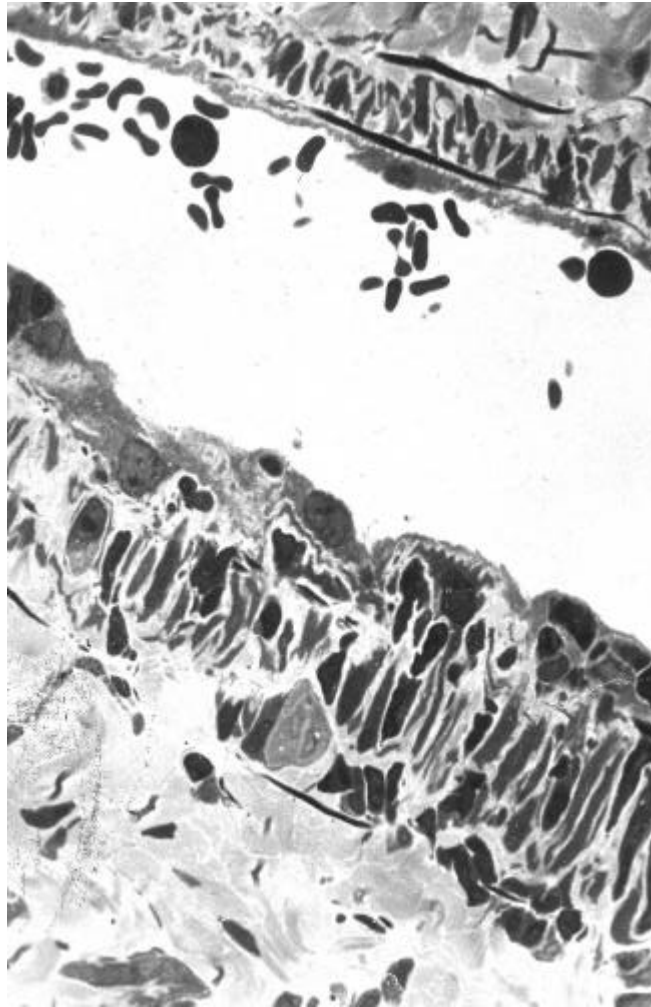


Fig. 1: Pared de la vena femoral vecina a un segmento arterial aislado entre doble ligadura. Se distinguen células endoteliales prominentes y la emisión de ocasionales yemas vasculares hacia la capa media. Obsérvese una yema de luz virtual, limitada por una célula con elevada apetencia tintorial, en vecindad a la lámina elástica discontinua.

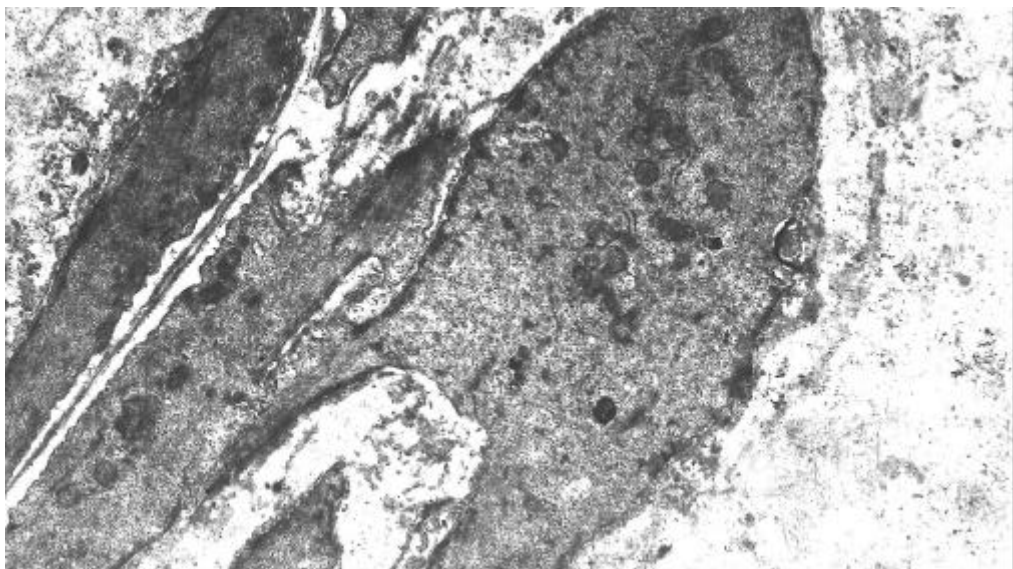


Fig. 2: Imagen ultraestructural en la que se distinguen células musculares lisas alteradas pertenecientes a la capa media de segmentos arteriales entre doble ligadura.



endotelial, se encuentra ocupada por cristales espiculares de hematina, hematíes desestructurados, células endoteliales descamadas y macrófagos de aspecto multivacuolar y con signos de eritrofagocitosis **(fig.3)**.

Alcanzadas las 72 horas de iniciada la experiencia, los vasos capilares y las vénulas postcapilares preexistentes, localizados en la capa adventicial, presentan signos de activación angiogénica. Efectivamente observa incremento del volumen de las células endoteliales, presencia de figuras de mitosis en las mismas y emisión de proyecciones endoteliales que se insinúan hacia el espacio intersticial. Gran número de estas proyecciones muestra, como se aprecia en cortes ultrafinos, luz de escasas dimensiones difícil de distinguir incluso a nivel ultraestructural. Los pericitos, propios de estos vasos, experimentan incremento de su volumen celular **(fig. 4)**, presencia de figuras de mitosis, acortamiento de sus procesos celulares, descenso de la superficie de contacto con las células endoteliales y rotura de la membrana basal que les limita. De forma brusca e intensa, estas células perivasculares migran hacia el intersticio, adquiriendo aspecto indiferenciado.

Muchas de las yemas vasculares neoformadas reemplazan los vasos adventiciales lesionados durante la ejecución de la intervención quirúrgica, pero una gran parte de ellas discurren entre el tejido conectivo periarterial y se dirigen hacia la capa media de la arteria **(fig. 5)**.

Mientras se están produciendo estos hechos, se incrementan los cambios degenerativos en las células musculares lisas de la capa media presentando múltiples áreas de condensación intracelular y pérdida de miofilamentos. Incluso, ocasionalmente, se puede distinguir células necróticas y macrófagos cargados con restos celulares. Estos últimos

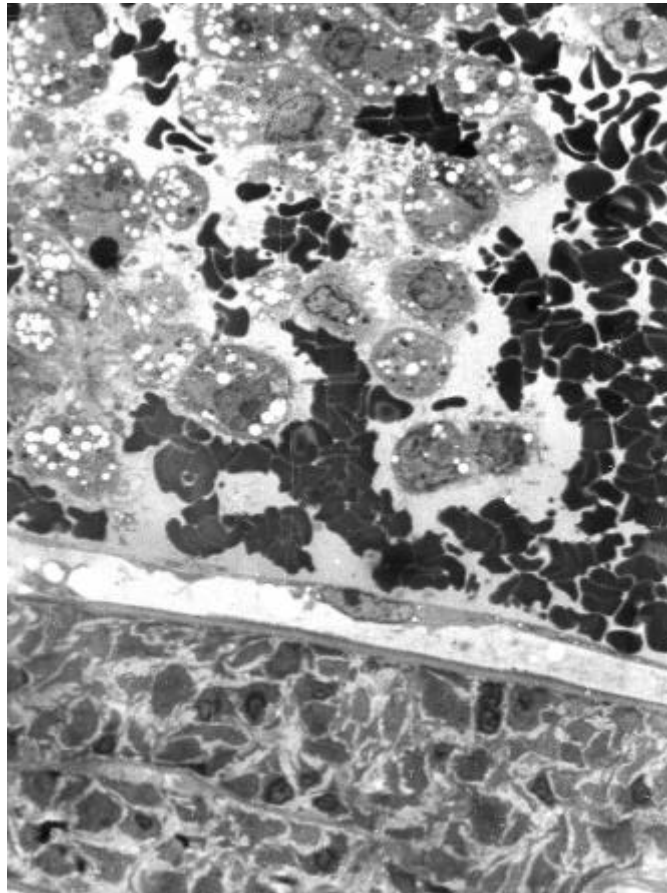


Fig. 3: Imagen en corte semifino, que comprende parte de la luz de un segmento arterial entre doble ligadura, 48 horas después de iniciada la experiencia. Se aprecian numerosos macrófagos de aspecto multivesicular, y con signos de eritrofagocitosis.

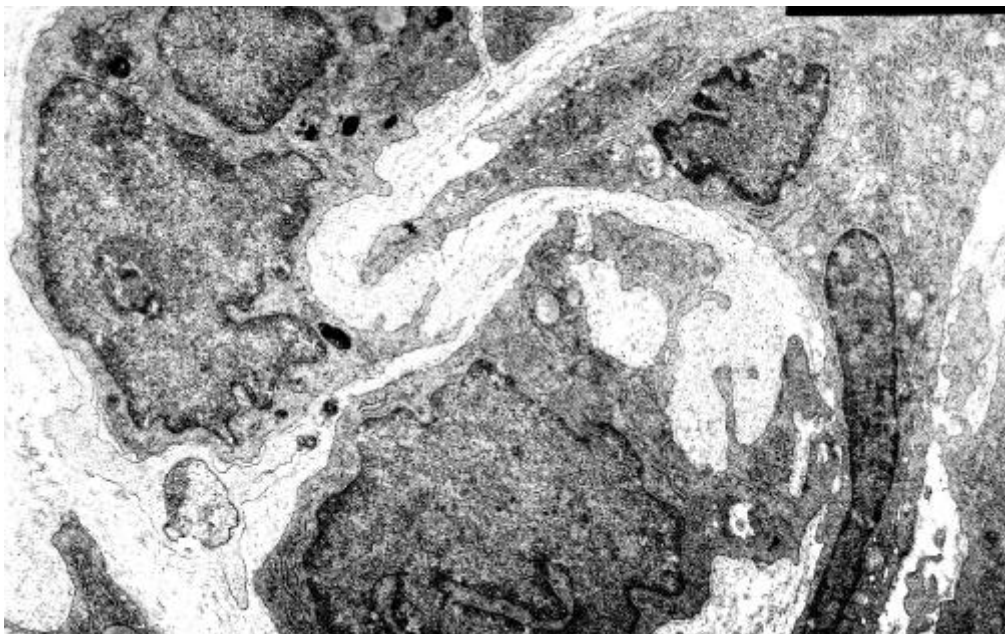


Fig. 4: Detalle ultraestructural de un capilar sanguíneo localizado en la adventicia de un segmento arterial entre doble ligadura. Destaca su luz virtual, y los elementos pericitarios voluminosos con núcleo prominente

fácilmente identificables en los cortes semifinos y ultrafinos por sus numerosas proyecciones digitiformes superficiales, diferentes partículas en los lisosomas y condensación de la cromatina nuclear.

En lo que respecta la luz arterial, entre las 72 y 96 horas de ligado el vaso femoral, aparecen coágulos sanguíneos, con hematíes y plaquetas, así como polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos, dispuestos entre redes de fibrina y adheridos a la lámina elástica interna persistente. En la superficie libre de estos coágulos se observan células elongadas (**fig.6**), con escasa apetencia tintorial, junto a otras más teñidas. Ambos tipos celulares presentaban núcleos elongados, con algunas escotaduras y nucleolos llamativos. Según se incrementa el tiempo de evolución, el número de vasos en la adventicia aumenta e, incluso, sobre todo en cortes histológicos en resina, longitudinalmente orientados, pueden evidenciarse vasos con características angiogénicas, de luces ocupadas por hematíes y/o plaquetas, atravesando la lámina elástica externa (**fig.7**), junto a otros de luz casi virtual, revestidos por células endoteliales y pericitos prominentes, asentados a diferentes alturas en la túnica media.

Gracias a los cortes longitudinales, se ha podido constatar algunos microvasos atravesando la lámina elástica interna (**figs. 8 y 9**), de tal modo que la mayoría queda detenida por dicha lámina. Los vasos que logran atravesarla, lo hacen bien utilizando pequeños defectos de la misma o bien zonas de rotura. Aunque las imágenes de penetración microvascular se producen a todo lo largo de los segmentos arteriales ocluidos, éstas son más numerosas en áreas próximas al nacimiento de la colateral, que está habitualmente comprendida en los mismos.

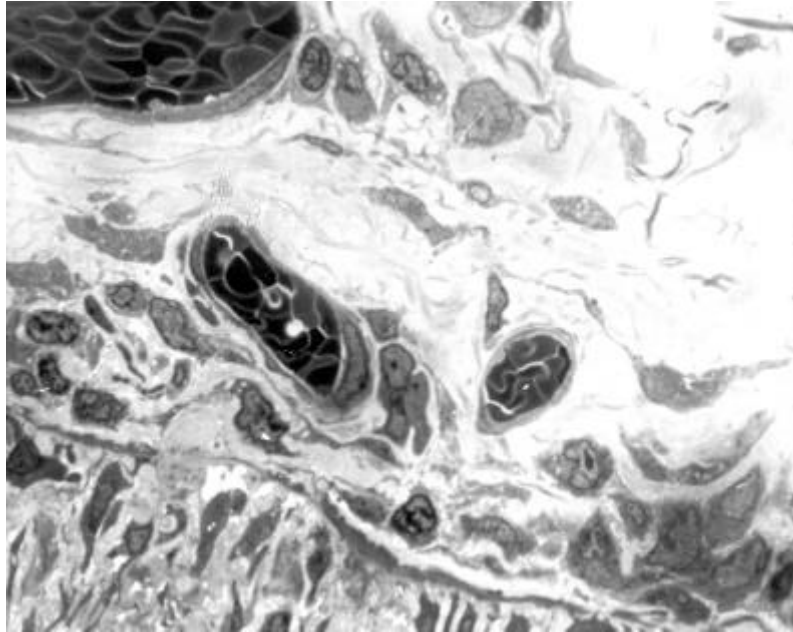


Fig. 5: Territorio adventicial, próximo a la capa media arterial, en el que destacan varios vasos sanguíneos venulares y capilares con luces ocupadas por hematíes.

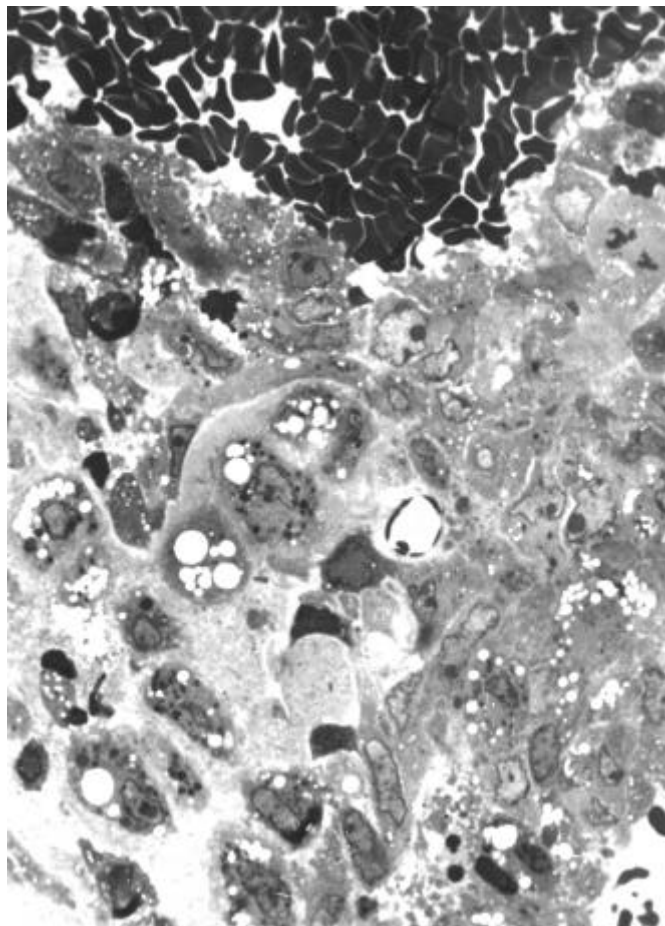


Fig. 6: Acúmulo celular presente en la luz de un segmento arterial ocluido, 4 días después de iniciada la experiencia. Se aprecian junto a macrófagos multivacuolados y polinucleares desestructurados, elementos celulares elongados, de citoplasmas con escasa apetencia tintorial, adyacentes a otros más intensamente teñidos.

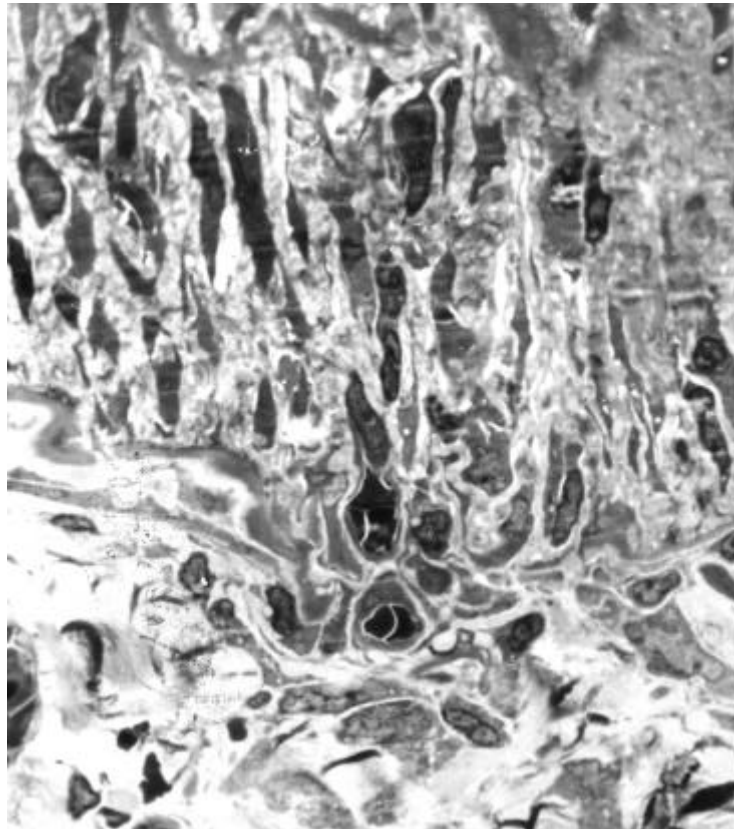


Fig. 7: Detalle del área limítrofe entre la adventicia y la capa media arterial en la que se distinguen vasos con características angiogénicas, ocupados por hematíes, atravesando la lámina elástica externa en dirección hacia la capa media arterial

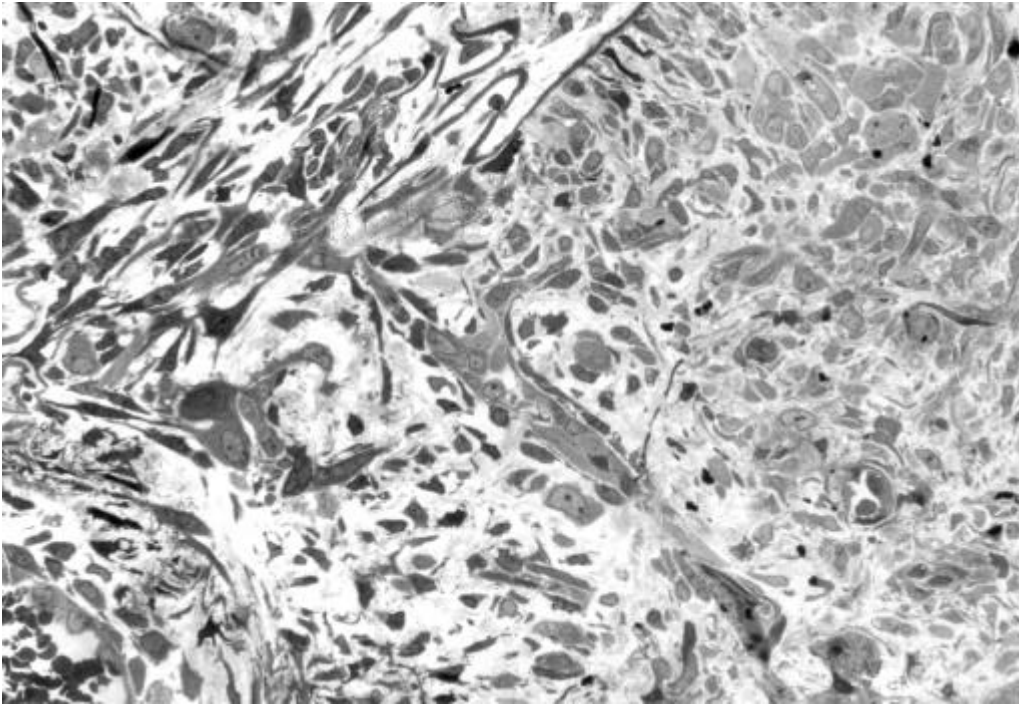
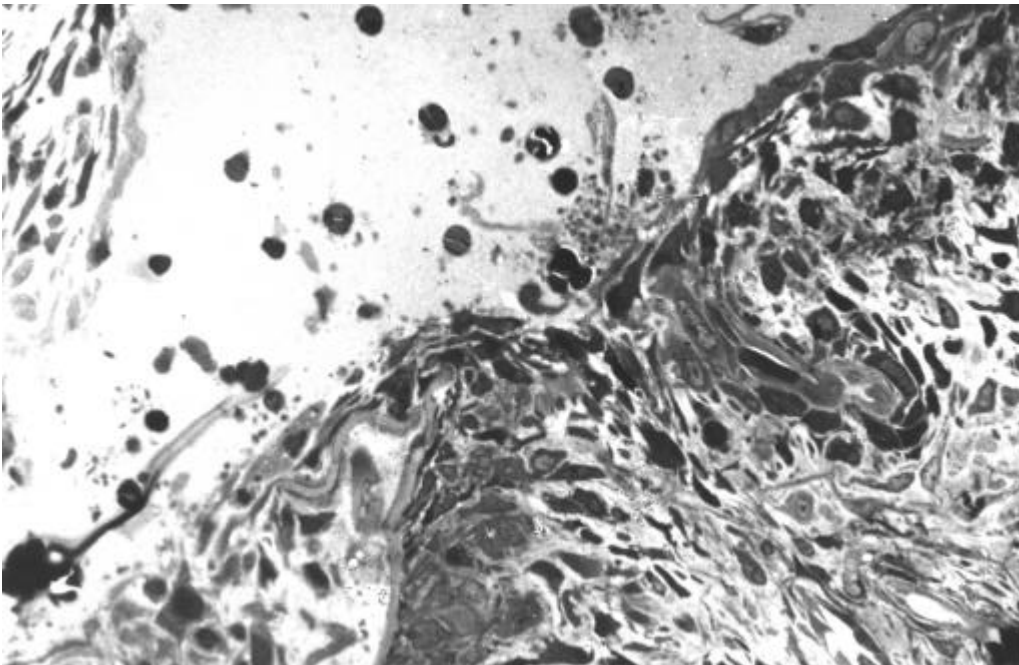


Fig. 8 y 9: Imágenes, en cortes semifinos, en la que se distinguen vasos neoformados que, tras atravesar la lámina elástica externa, se dirigen hacia la luz del segmento arterial ocluido, incorporando a éste sus células endoteliales y perivasculares. Destaca en la desembocadura (Fig. 9) un acúmulo plaquetario.



En las imágenes se hace evidente la conexión de las células endoteliales de los citados neovasos que penetran la lámina elástica interna con las células hipocromáticas inmersas en los coágulos intraluminales, mientras que las células más teñidas de disposición perivascular son similares a las hipercromáticas presentes en dichos coágulos.

Progresivamente, la luz arterial es ocupada por un neot Tejido similar al de granulación (**fig. 10**), rico en neovasos, dispuestos a modo de plexo. Sus endotelios son muy prominentes, con amplio desarrollo de sus organelas, y los pericitos vecinos muestran una elevada electrodensidad, riqueza en ribosomas, polirribosomas y cisternas del RER (**fig. 11**). Son pues fenotípicamente similares a aquellas células aisladas dispersas, asentadas en el intersticio y separadas de las paredes vasculares.

Entre los días 7<sup>o</sup> y 8<sup>o</sup> de evolución, las células intraluminales, de disposición neointimal, y cuyo número también aumenta en el tiempo, se disponen siguiendo el eje longitudinal del vaso (**fig. 12**). Esto es, de forma perpendicular a las localizadas en la túnica media. Ultraestructuralmente, exhiben características fenotípicas intermedias entre pericitos, miofibroblastos y células musculares lisas (**figs. 13 y 14**). En efecto, están dotadas de abundantes vesículas de micropinocitosis en su superficie y de elevada proporción de organelas de síntesis y material contráctil en su citoplasma. Este último está representado por miofilamentos dispuestos en fascículos con zonas de refuerzo. El núcleo celular es fusiforme y discretamente escotado. Por fuera de estas células aparece una membrana basal discontinua, que tiende a hacerse progresivamente continua. El intersticio que las rodea muestra fibras de colágeno de escaso calibre y algunas de naturaleza elástica.

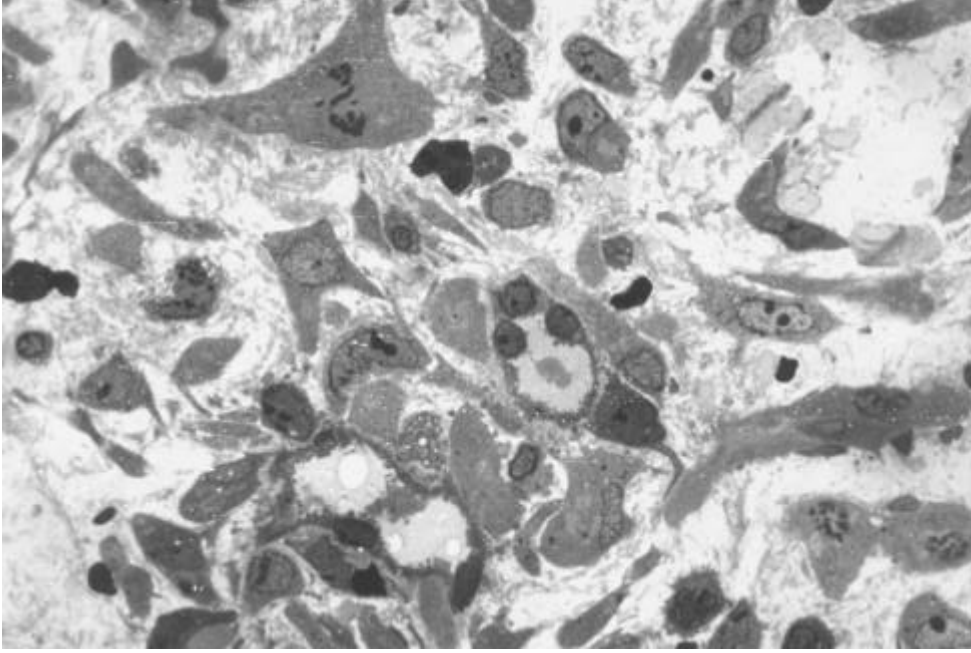


Fig. 10: Aspecto parcial, en corte semifino, del tejido neoformado, presente en la luz de un segmento arterial ocluido entre doble ligadura, a los 5 – 6 días de iniciada la experiencia. Nótese las características de un típico tejido de granulación, con vasos neoformados, células fusiformes, algunas en mitosis, y escasos elementos macrofágicos.

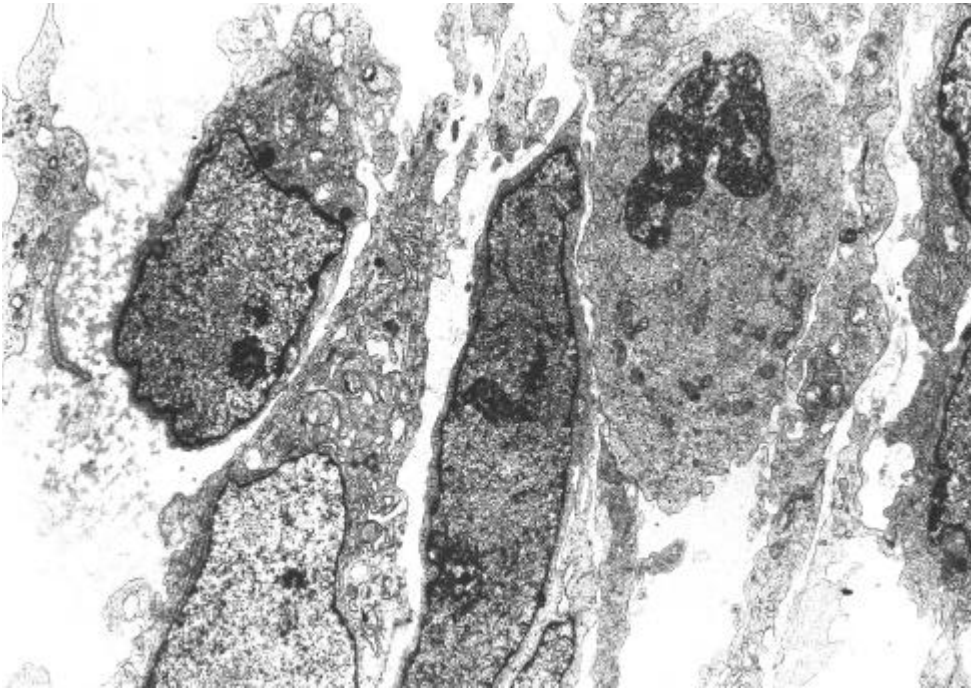


Fig. 11: Imagen ultraestructural de un vaso propio del tejido de granulación intraarterial. Se aprecia una célula endotelial en mitosis y en su vecindad elementos celulares perivasculares con prominentes cisternas de retículo endoplásmico rugoso.





Fig. 12: Aspecto ultraestructural del engrosamiento intimal generado en la luz de un segmento arterial ocluido. Se distingue bajo la cubierta endotelial una célula miointimal de núcleo irregular con su heterocromatina dispuesta periféricamente y, en su citoplasma abundante material contráctil. Es posible apreciar en el material intercelular, finas fibras colágenas cortadas en diferentes direcciones.

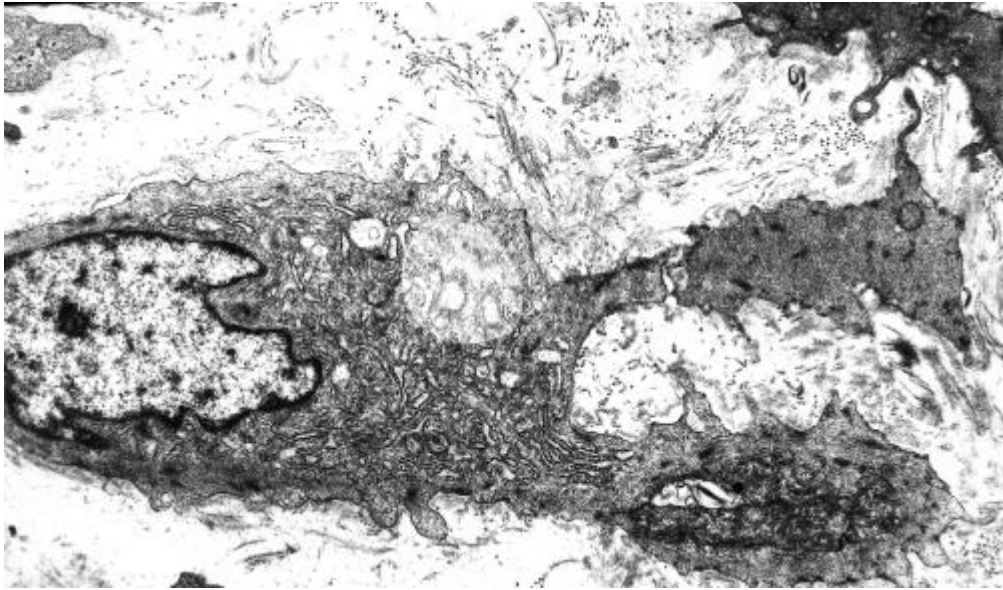
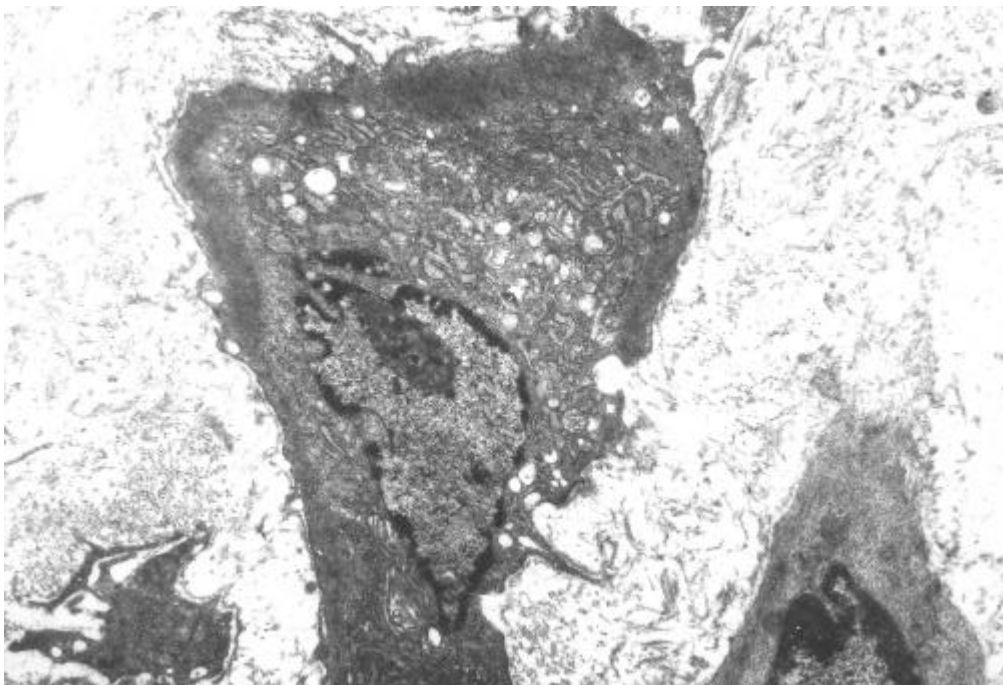


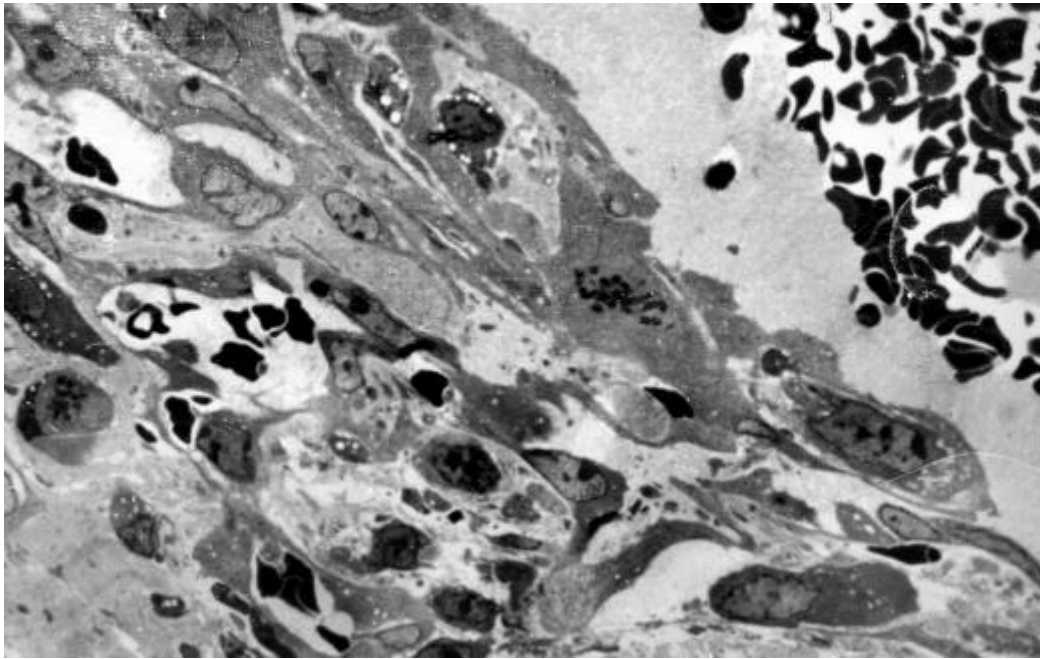
Fig. 13 y 14: Distintas imágenes ultraestructurales pertenecientes a células miointimales. Se aprecia en su citoplasma la coexistencia de áreas ricas en cisternas de RER (fenotipo sintético) con otras con predominio de material contráctil con áreas de refuerzo (fenotipo contráctil).



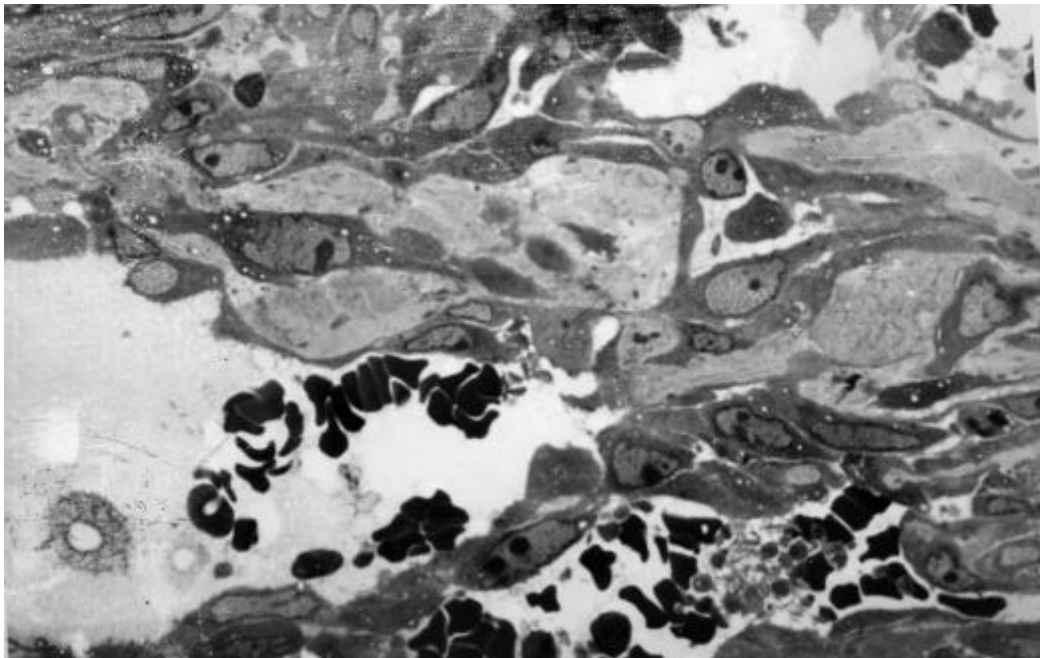
A partir del octavo día, el tejido de granulación ocupa prácticamente la totalidad de la primitiva luz arterial, salvo ocasionales áreas ocupadas por líquido negrozco y carentes de crecimiento intraluminal (**figs. 15, 16 y 17**). Generalmente, dichas áreas asientan próximas a las ligaduras que limitan el segmento arterial estudiado. Las zonas con reparación eficaz, sonrosadas macroscópicamente, evolucionan hacia un neotejido intimal, centrado por una luz con componente sanguíneo.

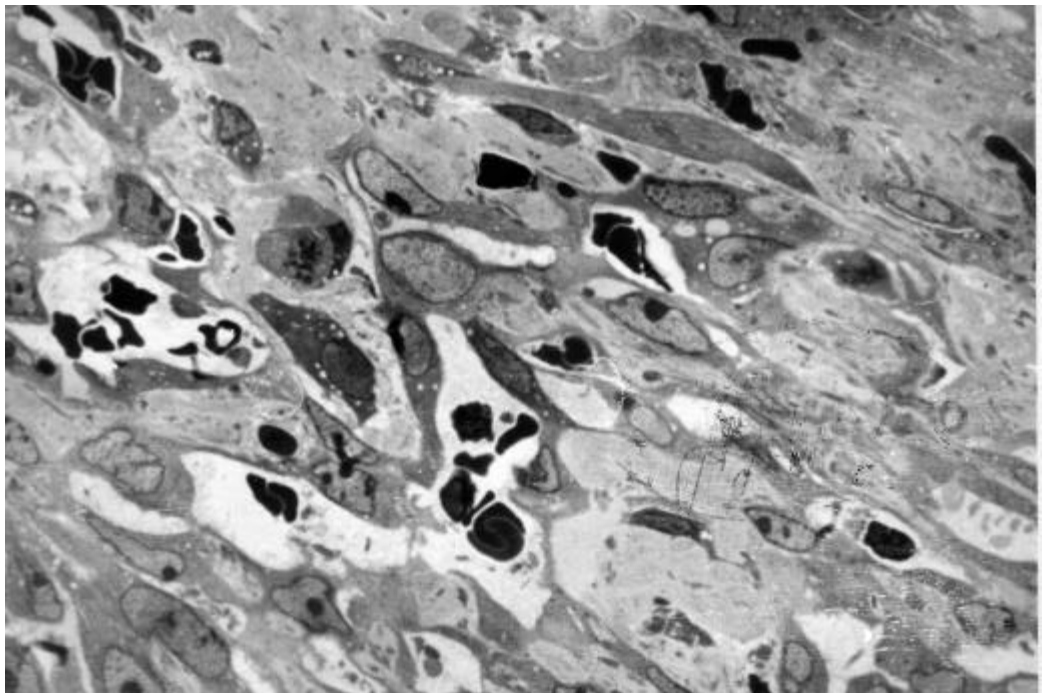
A finales de la segunda semana (9-16 días), gran número de los vasos neoformados experimentan signos involutivos (**figs. 18 y 19**), a la vez que se remodela el tejido de granulación intraarterial. Así, se consigue una amplia luz central, originada por la confluencia de las yemas vasculares y en la que es posible distinguir el drenaje de algunos vasos de menor calibre. Bajo el endotelio que reviste la neoluz, se observan predominantemente células miointimales de fenotipo contráctil (**fig. 20**), dispuestas en variable número de capas, sustancia intercelular y material fibrilar de tipo colágeno y elástico y, en menor medida, de fenotipo sintético.

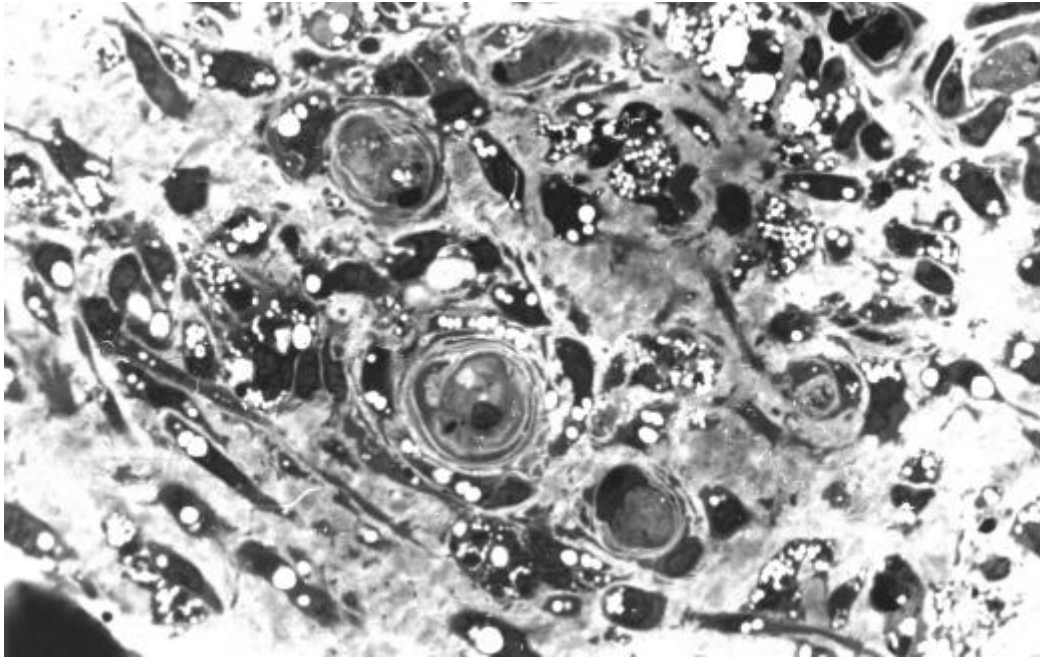
En las muestras más evolucionadas de esta serie experimental aparece un típico engrosamiento intimal, que, sobre todo en territorios próximos a los extremos ligados de los segmentos, muestra zonas de conexión entre la luz del segmento arterial y los vasos periarteriales persistentes.



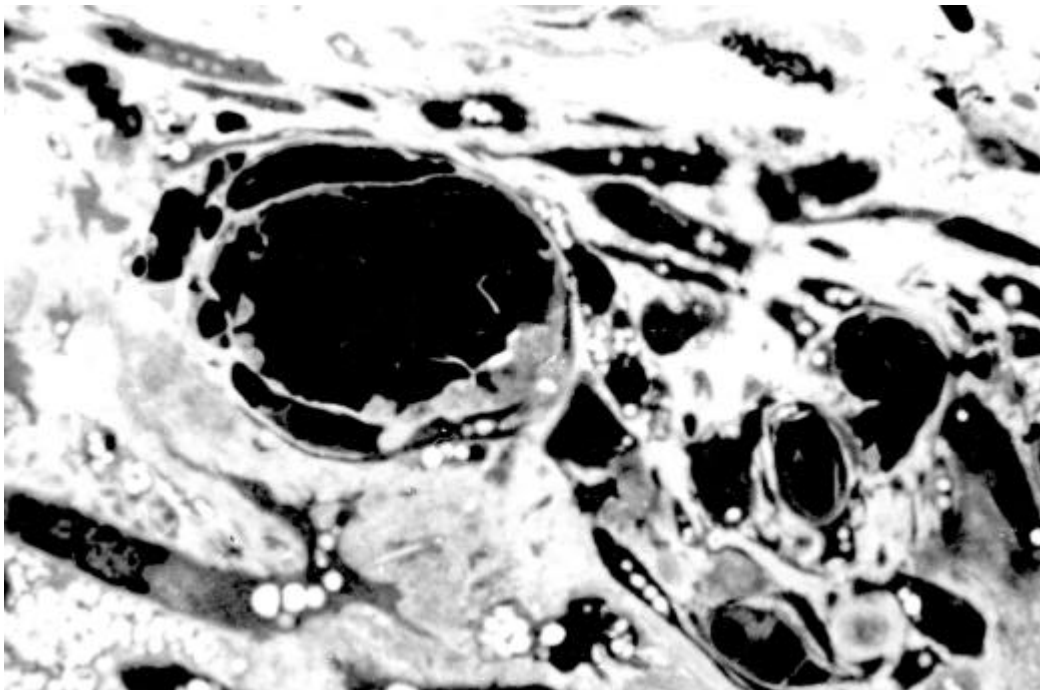
Figs. 15, 16 y 17: Diferentes áreas propias del tejido de granulación intraarterial. Se aprecian numerosos vasos neoformados de endotelios prominentes limitando espacios ocupados por hematíes circulantes. Llama la atención el abundante número de células en mitosis.







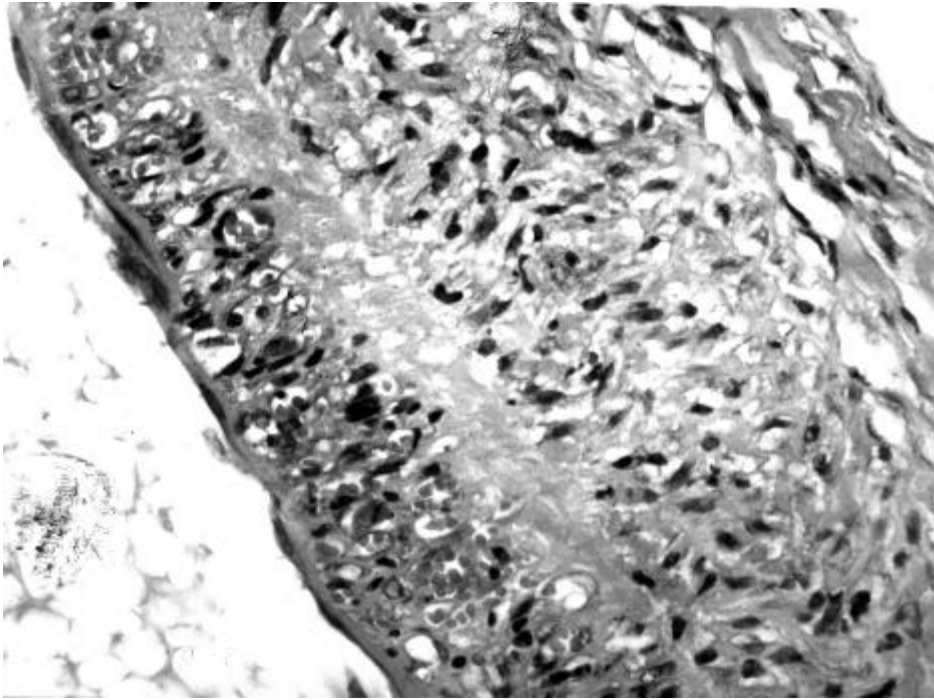
Figs. 18 y 19: Fase final en la maduración del tejido de granulación intraarterial, en la que distinguen numerosos vasos involutivos, con luces ocupadas por tapones de hematíes y plaquetas, dispuestos en un intersticio rico en elementos macrofágicos ricos en vacuolas de diferente calibre.



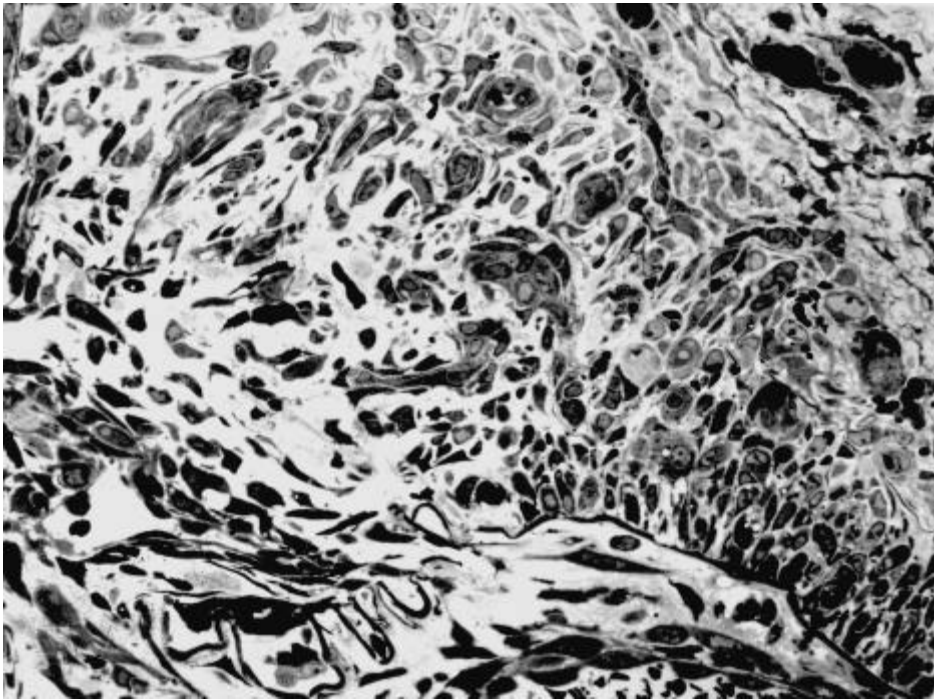
### **3.1.2 SUBSERIE I B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA**

Con la finalidad de no ser reiterativos, únicamente expondremos los hechos diferenciales con la subserie IA. En el aspecto macroscópico la arteria adquirió una coloración sonrosada más precozmente (en torno al día 4-5), con presencia de tejido de granulación intraluminal en estas fechas. La remodelación a EI fue también precoz en el segmento arterial sin adventicia (en torno al día 6 de iniciado el experimento).

Las diferencias microscópicas en la pared venosa se ponen de manifiesto una mayor activación de células endoteliales y más intensa respuesta angiogénica desde la vena (**tabla 9**). En el espacio arteriovenoso hay una intensa red microvascular y en la pared arterial se demuestra precoz penetración de yemas vasculares (**figs. 21 y 22**) que alcanzan la luz y originan tejido de granulación en los días 4 y 5.



Figs. 21 y 22: Imágenes panorámicas de la pared de vasos arteriales desprovistos de cubierta adventicial. Se evidencian claramente numerosos vasos neoformados de luces virtuales en las zonas externas de la capa media arterial.





## **3.2 SERIE II: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA**

### **3.2.1 SERIE II A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA DISTAL ÚNICA Y CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA.**

#### ***3.2.1.1 Descripción macroscópica:***

A las 24-48 horas de iniciada la experiencia, los segmentos arteriales mostraron coloración rojo-oscura en las zonas más próximas a la ligadura y sonrosada en la más alejada de ésta. A partir de las 72 horas, los segmentos arteriales, situados por encima de la ligadura, mostraron claramente dos áreas diferenciables entre sí por su coloración. En efecto, las porciones más alejadas de la ligadura aparecían de coloración rosada y aspecto turgente. Las áreas próximas a la ligadura presentaban coloración rojo oscura. El aspecto del segmento arterial previamente mencionado se mantuvo hasta el día 7-8. A partir de estas fechas el segmento arterial mostró un aspecto uniforme en la mayoría de los casos. En 3 de ellos, correspondientes a los días 14, 21 y 30 se observó esclerosis en la zona más próxima a la ligadura, adquiriendo la arteria un aspecto filiforme.

### **3.2.1.2 Descripción microscópica:**

#### **Pared venosa:**

Los hechos son similares a los de la serie previa. Es decir, escasas modificaciones morfológicas con focos de activación de las células endoteliales y de formación de yemas vasculares. Desde el día 7 en adelante son ocasionales los vasos persistentes originados desde la luz venosa. En la tabla 9 se recogen la cuantificación de la microvascularización originada desde la vena femoral.

#### **Espacio arteriovenoso:**

Al igual que ocurre con la pared venosa, los hechos son similares a los que ocurren en la arteria femoral entre doble ligadura, salvo en la zona más próxima a la ligadura. En esta última, persisten algunos vasos de grueso calibre neoformados desde los días 8 en adelante. En los tres casos en los que se esclerosó dicha zona, se produjo marcada fibrosis en todo el entorno periarterial incluido el espacio arteriovenoso.

#### **Pared y luz arterial:**

El estudio microscópico entre las 24 y 48 horas revela escasa desendotelización en las zonas más alejadas de la ligadura, mientras que en las más próximas a ésta se desendoteliza la superficie luminal. La luz de la arteria aparece ocupada por una columna sanguínea, con tractos de fibrina y cúmulos de plaquetas que se adhieren a la superficie desendotelizada.

A partir de las 72 horas, el estudio microscópico de cortes seriados revela una manifiesta proliferación celular y establecimiento de fenómenos neoangiogénicos en la adventicia arterial. Las yemas angiogénicas parecen proceder de vénulas postcapilares y capilares situados en la adventicia, así como de la vena femoral adyacente. Algunos de estos vasos, de luces virtuales y de endotelios prominentes, con núcleos que poseen manifiestos nucleolos, se insinuaban en las capas más externas de la media arterial. Ultraestructuralmente, estas células endoteliales carecen de membrana basal o ésta es incompleta; asimismo, es posible distinguir en estas células variaciones en la densidad a los electrones.

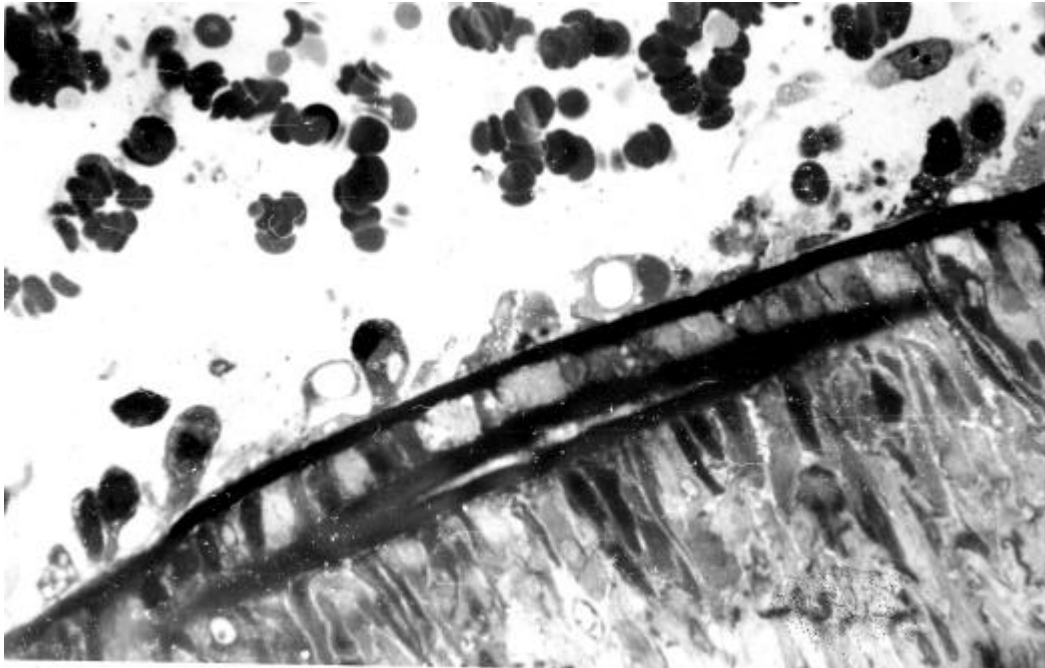
Paulatinamente, a medida que transcurren los días, las formaciones vasculares adquieren un aspecto más diferenciado, con presencia de luces aparentes, ocupadas por hematíes circulantes. En torno a las células endoteliales se demuestran elementos pericitarios, también con fenómenos de activación y algunas figuras de mitosis. Un hecho observable, fundamentalmente en cortes longitudinales, es la presencia de focos de penetración de vasos a través de la pared de la arteria, alcanzando la luz arterial. La mayor parte de estos vasos que llegan a dicha luz, constituidos por endotelios y células perivasculares, utilizan pequeñas roturas de la membrana elástica interna para poder atravesarla.

A partir del 8<sup>o</sup>–10<sup>o</sup> día de iniciada la experiencia se evidencia un típico engrosamiento intimal que puede alcanzar un espesor de varias capas, y queda revestido por células endoteliales. Dicho engrosamiento está formado por material intercelular, constituido por tenues fibras de colágeno, sustancia fundamental, componente elástico y elementos fibrilares que, en conjunto, recuerdan a los de las membranas basales. Los elementos celulares

predominantes en el engrosamiento son células miointimales que, ultraestructuralmente, aparecen alargadas, con núcleos escotados y citoplasmas en los que se aprecia gran cantidad de material filamentososo, con zonas de refuerzo, similar al de las células musculares lisas. Es posible observar también, alrededor de las células, una evidente membrana basal periférica, así como numerosas vesículas de micropinocitosis. Aparte de estas células, aparecen ocasionales macrófagos, con núcleos de cromatina condensada y amplio citoplasma, rico en lisosomas primarios y secundarios.

Las células endoteliales que revisten el engrosamiento hacen prominencia hacia la luz en las zonas donde se sitúa su núcleo y se disponen sobre una fina franja conectiva, en la que es posible constatar, con técnica de orceína, material elástico dispuesto a modo de neomembrana elástica interna. Hay ausencia de engrosamiento de la arteria en la zona de ésta inmediatamente adyacente a la ligadura (**figs. 23 y 24**). Es decir, donde adquiere una coloración rojo-oscura. La luz arterial aparece ocupada por un material rico en cristales de hematina, hematíes más o menos lisados y células dispersas de aspecto macrofágico. Estos últimos con restos de desintegración de hematíes, cuerpos residuales membranosos, así como fragmentos de cristales de hematina y gotas lipídicas. Como señalamos previamente, no se aprecian fenómenos proliferativos intraluminales o son muy escasos. Asimismo, no se encuentran yemas vasculares atravesando la pared arterial.

En la etapa final de la experiencia, con relativa frecuencia observamos vasos sanguíneos involutivos, los cuales muestran sus luces ocupadas por acúmulos plaquetarios o restos celulares (**fig. 25**). En aquellos casos en los que se siguió la evolución durante un largo periodo de tiempo después de iniciada la experiencia se comprobó macroscópicamente la existencia de una



Figs. 23 y 24: Detalles en cortes teñidos con Orceina (Fig. 23) y Azul de Toluidina (Fig. 24) del área próxima a la ligadura única distal de un segmento arterial. Llama la atención la práctica ausencia de crecimiento celular intraluminal.



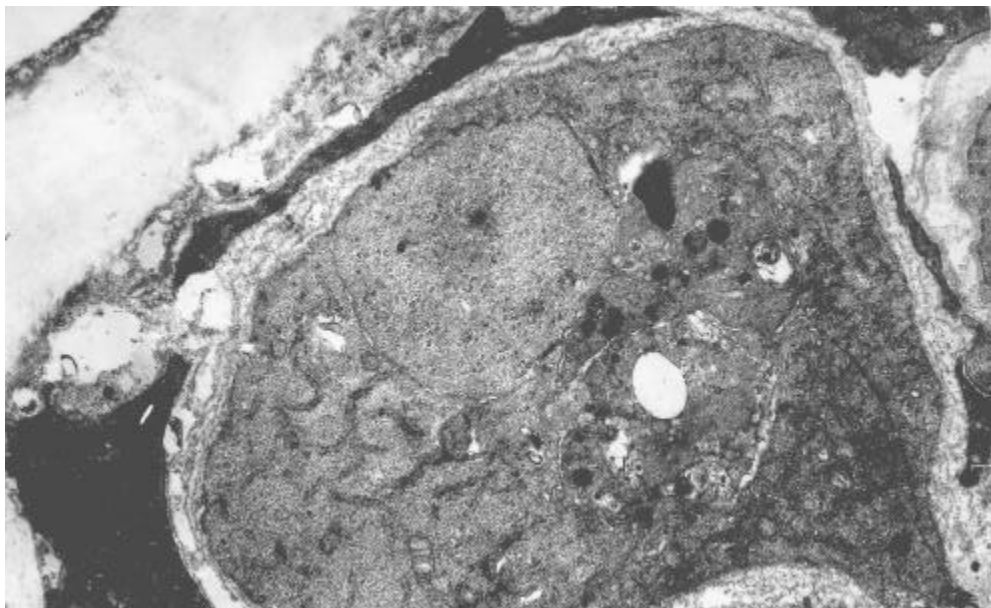


Fig. 25: Detalle ultraestructural de un vaso involutivo vecino a una lámina elástica electrolúcida. Obsérvese su luz ocupada por restos celulares y elementos plaquetarios parcialmente degranulados.

arteria femoral pulsátil, con numerosas y pequeñas ramas neoformadas, que se dirigen distalmente, sirviendo de "by pass" sobre la zona de la ligadura.

### **3.2.2 SUBSERIE II B: SEGMENTO ARTERIAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA.**

Al igual que hicimos con a subserie IB, presentamos los resultados de esta serie de forma comparativa con la IIA, con la finalidad de evitar repeticiones. La permanencia de la coloración oscura en el segmento distal fue más corta, de modo que entorno al día 4-5 el segmento arterial mostró un aspecto uniforme en todo su recorrido. Microscópicamente los fenómenos angiogénicos en la pared venosa son más intensos en esta serie que en la IIA (**véase tabla 9**). Asimismo, hay una más temprana penetración microvascular en la arteria

### **3.3 SERIE III: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA PUNCIÓNADO CON Y SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA**

#### **3.3.1 SUBSERIE III A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA PUNCIÓNADO CON CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA**

##### ***3.3.1.1 Descripción macroscópica:***

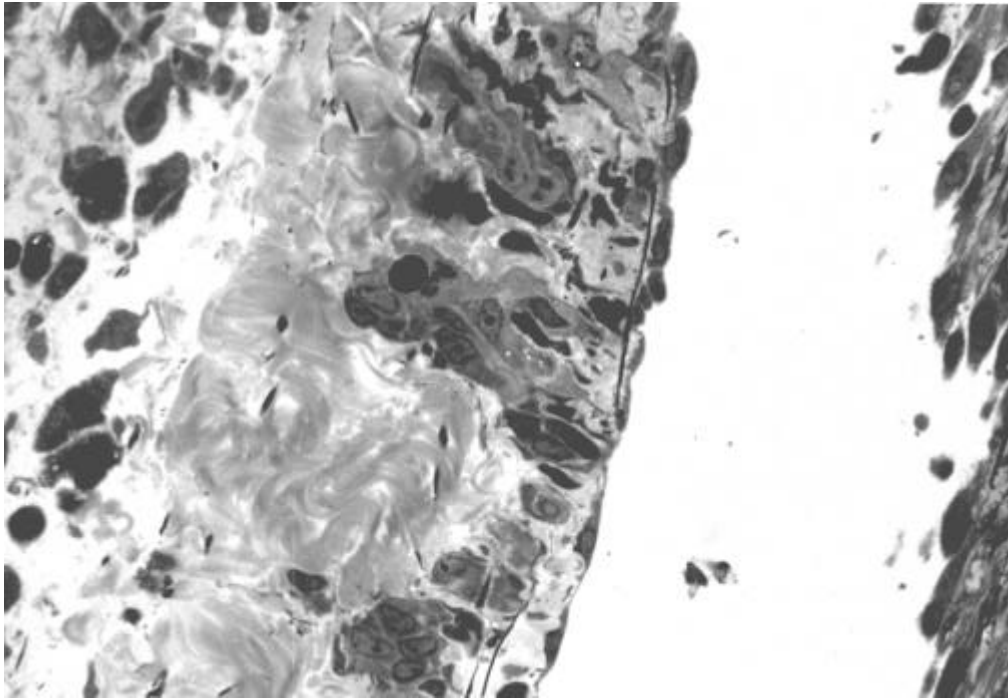
El segmento arterial en las primeras 24-48 horas fue similar al descrito para la serie I, salvo la presencia de material fibrinoso en el entorno de la arteria. Un hecho diferencial importante que ocurrió en los días posteriores, ya que se observó con mayor precocidad en el tiempo la presencia de neot Tejido intraluminal altamente vascularizado, adquiriendo también más tempranamente la arteria un color sonrosado. En efecto, hacia el día 4-5 la arteria puncionada tenía una imagen similar a la de un día 7-8 de la no-puncionada. Las características en días siguientes fueron también asimilables en ambos casos, siempre con una mayor precocidad en la arteria puncionada.



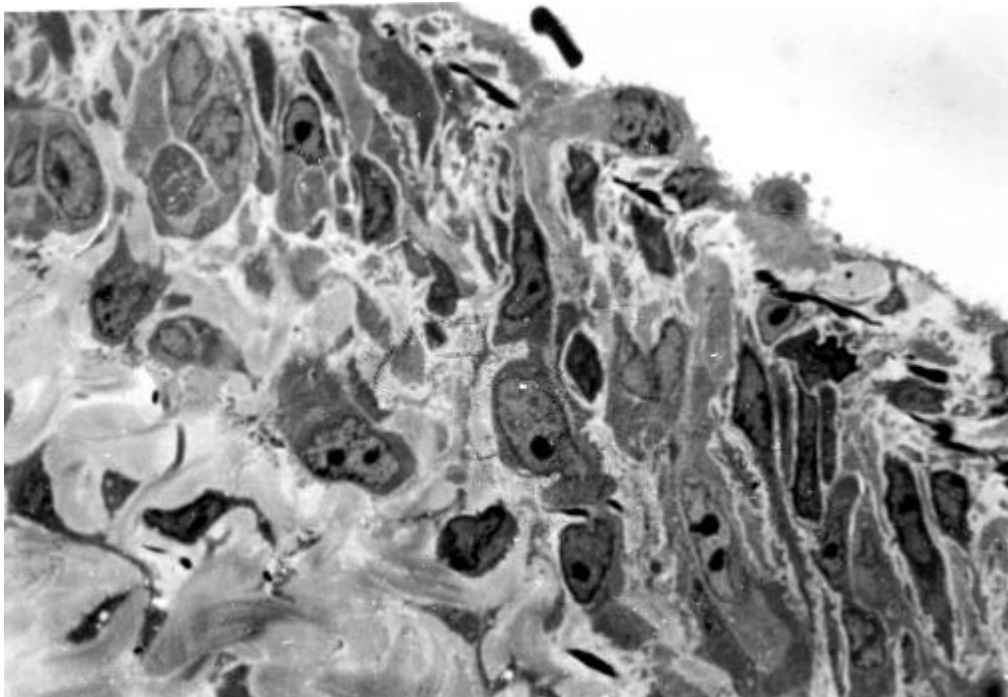
### **3.3.1.2 Descripción microscópica:**

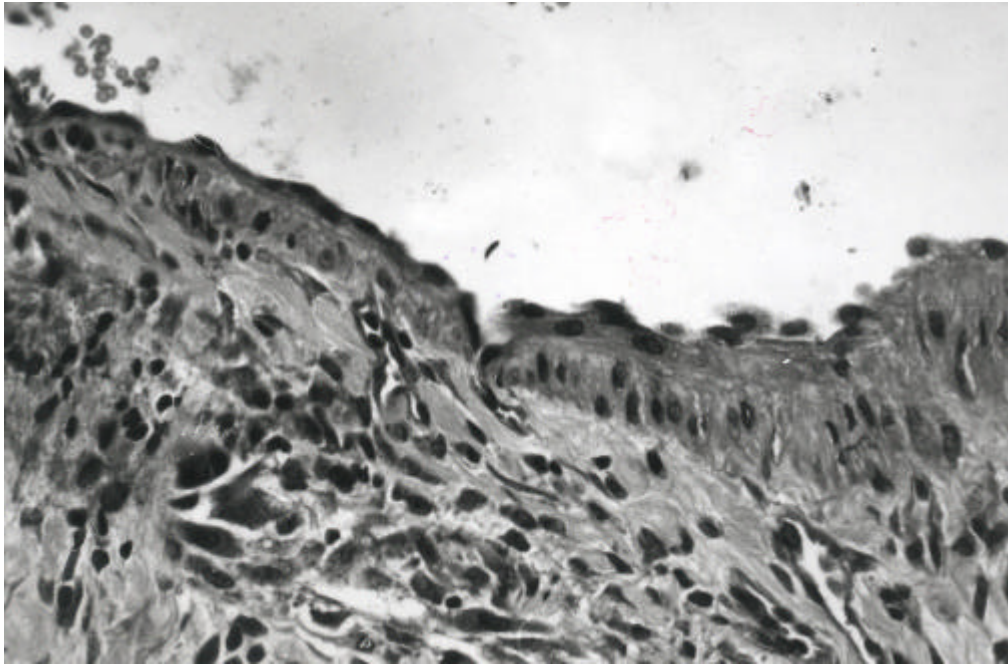
Pared venosa:

Entre los días 2-4 después de iniciada la experiencia, las células endoteliales de la vena hacen prominencia hacia la luz vascular y aparecen hipertróficas y con algunas mitosis. Entre los días 3 y 5, se evidencian células endoteliales que emiten prolongaciones que se introducen en la pared venosa, y que dan origen a yemas vasculares, en las que se observan procesos endoteliales agrupados en parejas, migrando al unísono. Entre las parejas de células endoteliales hay luces virtuales y progresivamente es posible distinguir luces que evolucionan desde muy estrechas a relativamente amplias. Estas células endoteliales migrantes, presentan frecuentes figuras de mitosis. Alrededor de las yemas neoformadas que atraviesan la pared venosa, se distinguen células musculares de esta última que experimentan modificaciones, adquiriendo formas transicionales con elementos pericitarios. En el día 5, las yemas vasculares que surgen de la pared venosa se han hecho prominentes (**figuras 26 y 27**) y alcanzan su máximo desarrollo en el sexto día de iniciado el experimento (**figuras 28 y 29**). Estas yemas vasculares aparecen ya canalizadas (**figura 28**), llegando en ocasiones a tener luces dilatadas (**figura 29**), salvo en el punto de origen. En este último es frecuente que ocurran fenómenos involutivos, lo que conlleva que las yemas vasculares queden aparentemente aisladas de la pared vascular venosa (**figura 30**). Los fenómenos previamente descritos son de mayor intensidad en el lado venoso orientado hacia la arteria femoral.

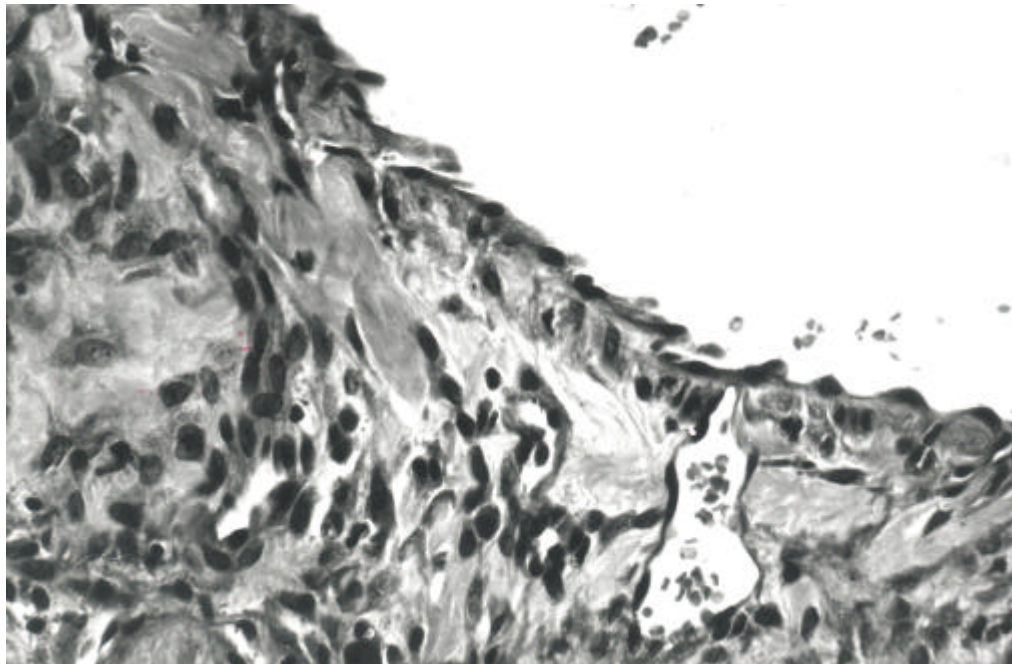


Figs. 26 y 27: Visiones parciales de la pared de la vena femoral, vecina al segmento arterial intervenido. Se ponen de manifiesto células endoteliales prominentes (Fig. 27) en conexión con abundantes yemas angiogénicas que penetran la capa media venosa en dirección hacia la adventicia.





Figs. 28 y 29: Yemas vasculares neofomadas surgidas a partir del endotelio venoso con luces permeables, incluso dilatadas, ocupadas por hematíes, conectadas con otros vasos localizados en el tejido conjuntivo adventicial.



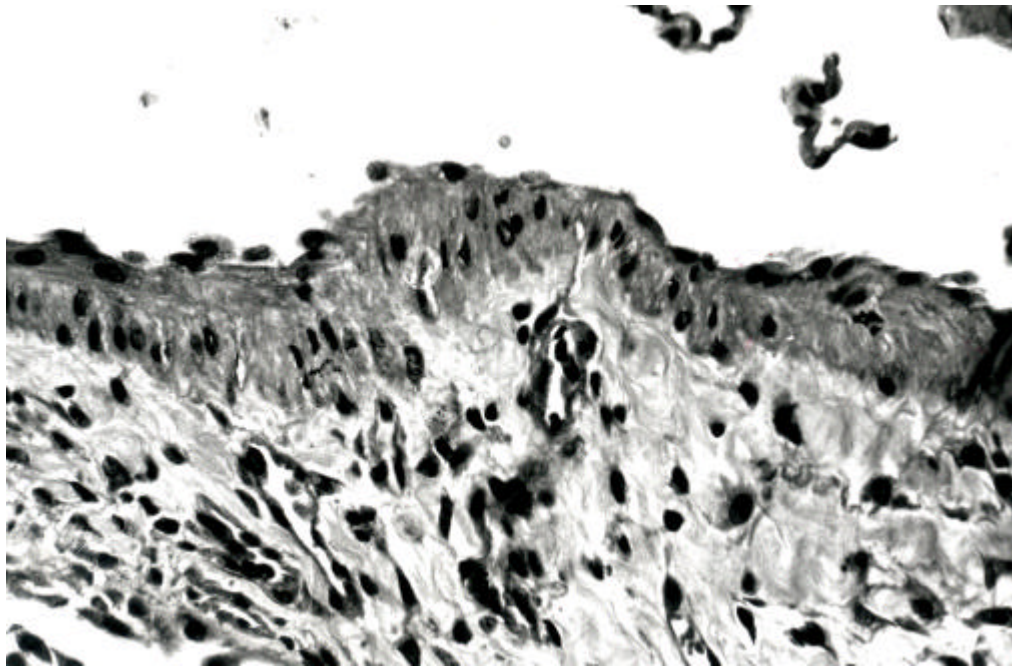


Fig. 30: Corte longitudinal, teñido con Hematoxilina-Eosina, de la pared de la vena femoral. Se aprecian yemas vasculares de luces evidentes aisladas en la adventicia venosa.

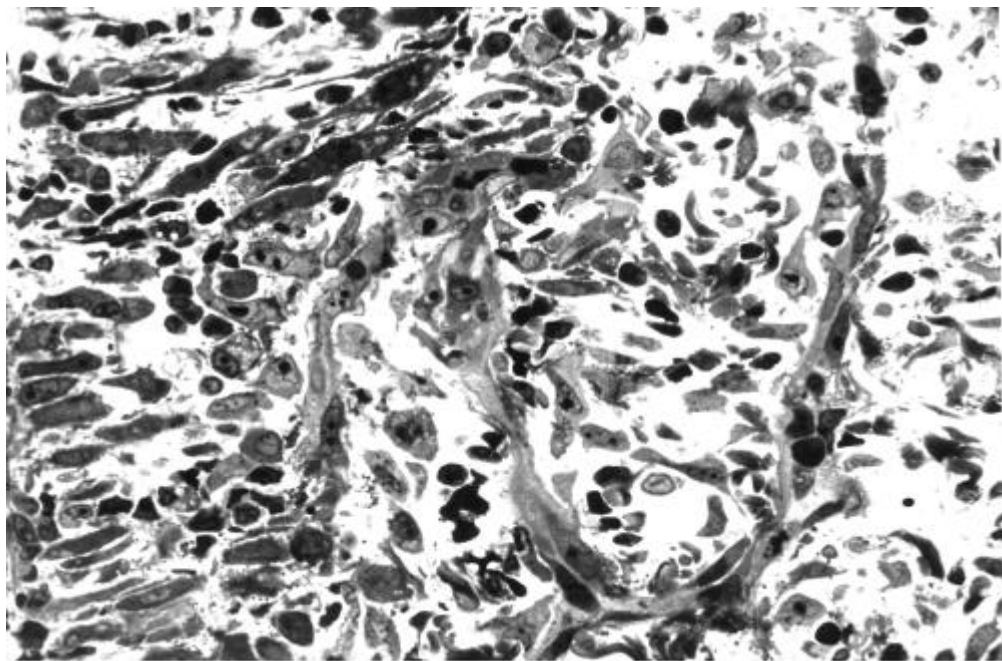


Fig. 31: Corte semifino en el que aparece una prominente red microvascular surgida a partir del endotelio venoso, en cuyo entorno aparecen elementos fusiformes, hematíes extravasados y algunos macrófagos.

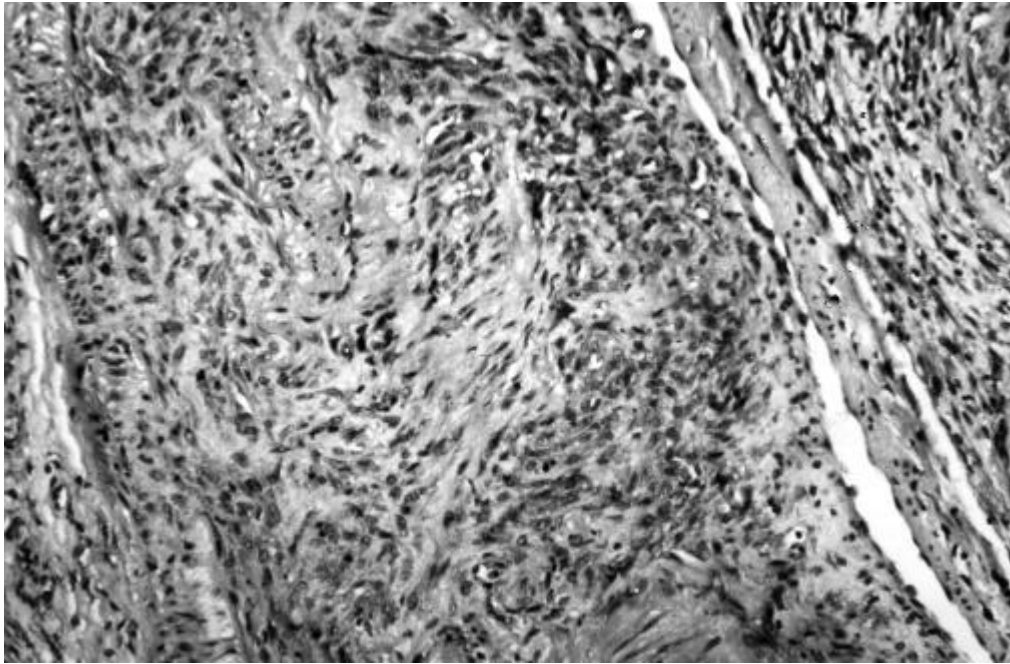
En días sucesivos, la mayoría de los capilares aparecen surgiendo de la pared venosa han involucionado, persistiendo únicamente algunos vasos comunicantes de mayor calibre.

Espacio arteriovenoso:

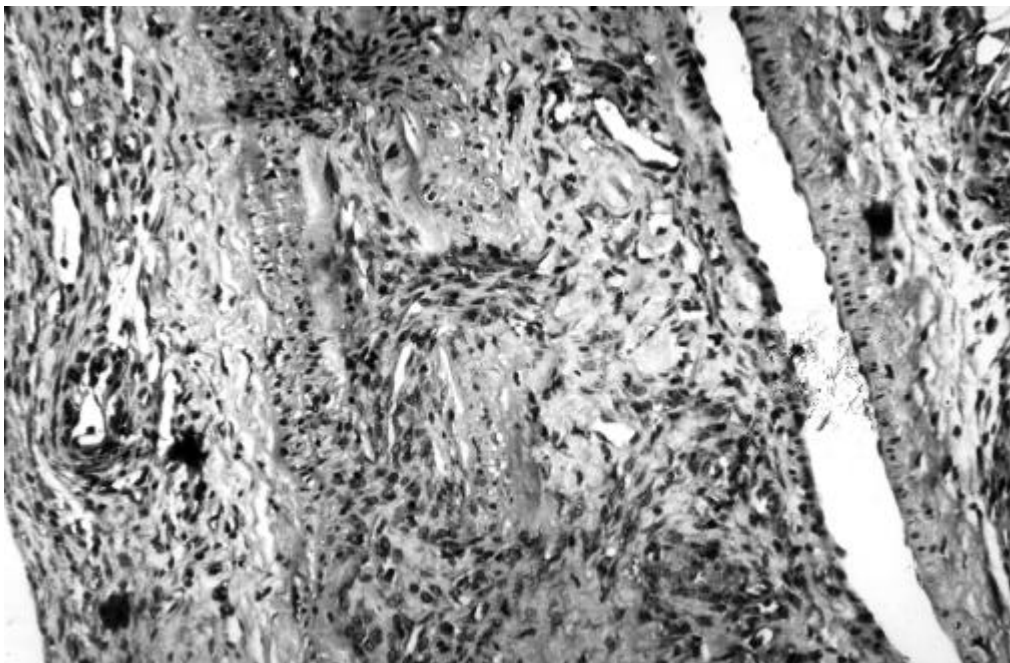
Entre los días 3 y 6 se forma una intensa red microvascular (**figura 31**) en cuyo entorno hay elementos fusiformes, hematíes extravasados y algunos macrófagos. La cantidad de yemas vasculares en la pared venosa y en el espacio arteriovenoso, así como la celularidad, se incrementan considerablemente en las zonas adyacentes a las de las punciones arteriales (**figuras 32, 33, 34, 35**). En los días siguientes se pone de manifiesto la involución de gran parte de la red microvascular y de la celularidad en el espacio arteriovenoso.

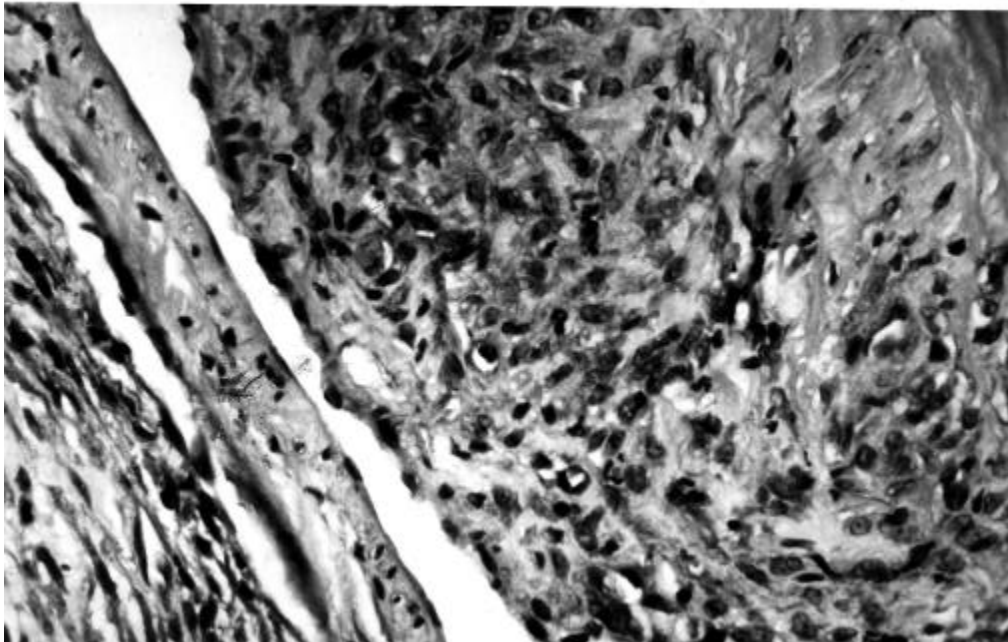
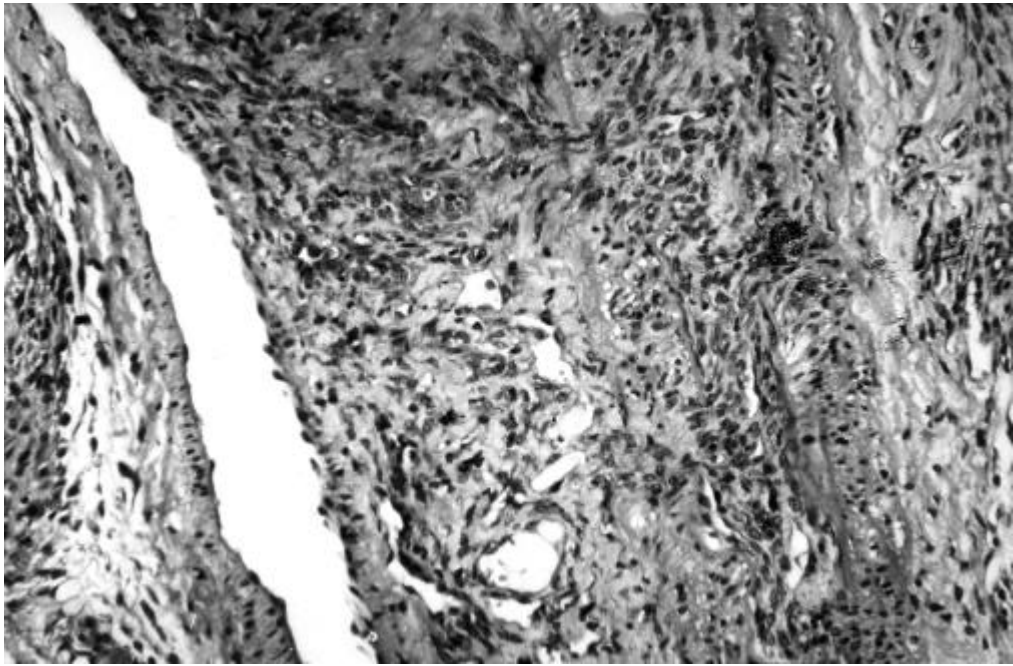
Pared y luz arterial:

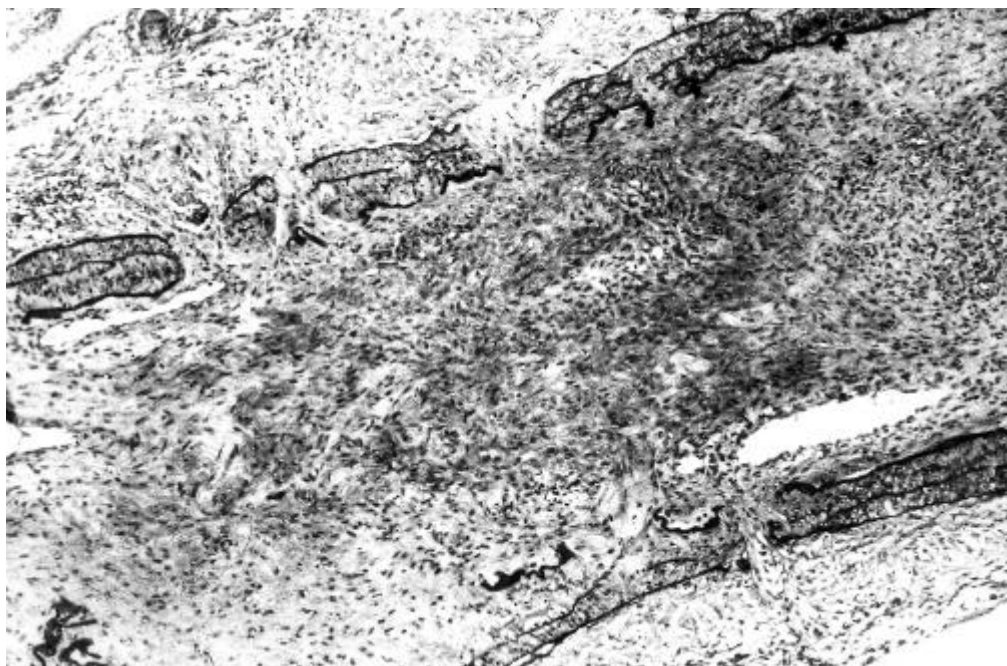
A partir del cuarto día, se identifican yemas vasculares y células perivasculares a través de la pared arterial, fundamentalmente en los espacios de punción. Estos hechos son muy evidentes al sexto día de iniciado el experimento. Ya en esta fecha, se observa gran parte de la luz arterial ocupada por un neotejido, en el que se distingue gran número de yemas vasculares, células fusiformes y algunos macrófagos (**figs. 36, 37 y 38**). Desde el día 8 en adelante, hay una marcada involución vascular en los vasos de la pared arterial y en los que ocupan la primitiva luz de la arteria, modulándose el tejido neoformado en esta última hacia típico engrosamiento



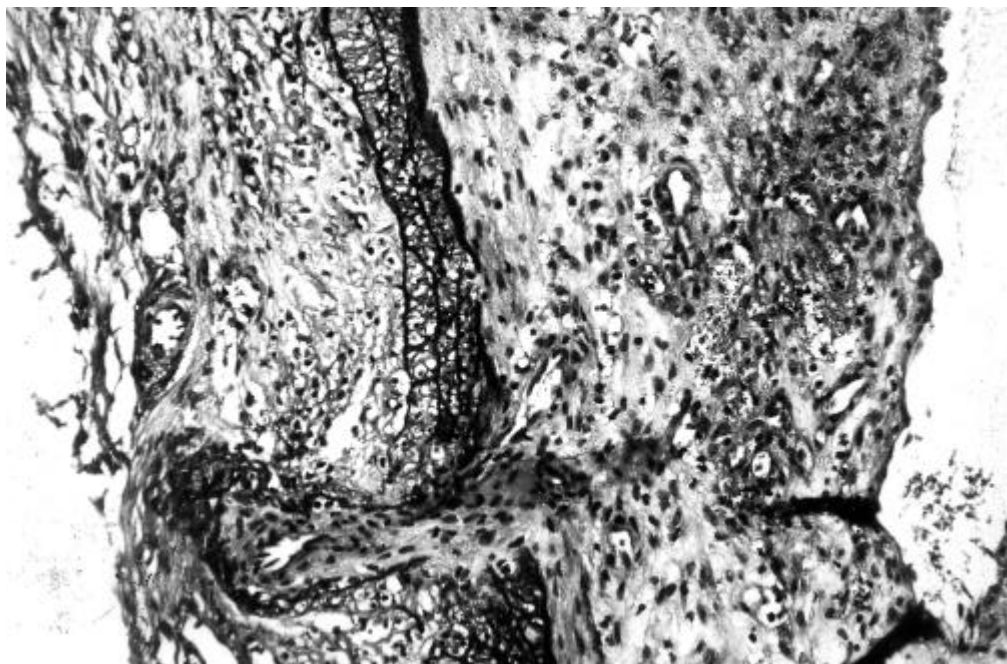
Figs. 32, 33, 34 y 35: Distintas imágenes en las que se aprecian abundantes yemas vasculares en la pared venosa y en el espacio localizado entre vena y arteria femoral. Llama la atención la intensa celularidad presente en las zonas adyacentes a las punciones arteriales.



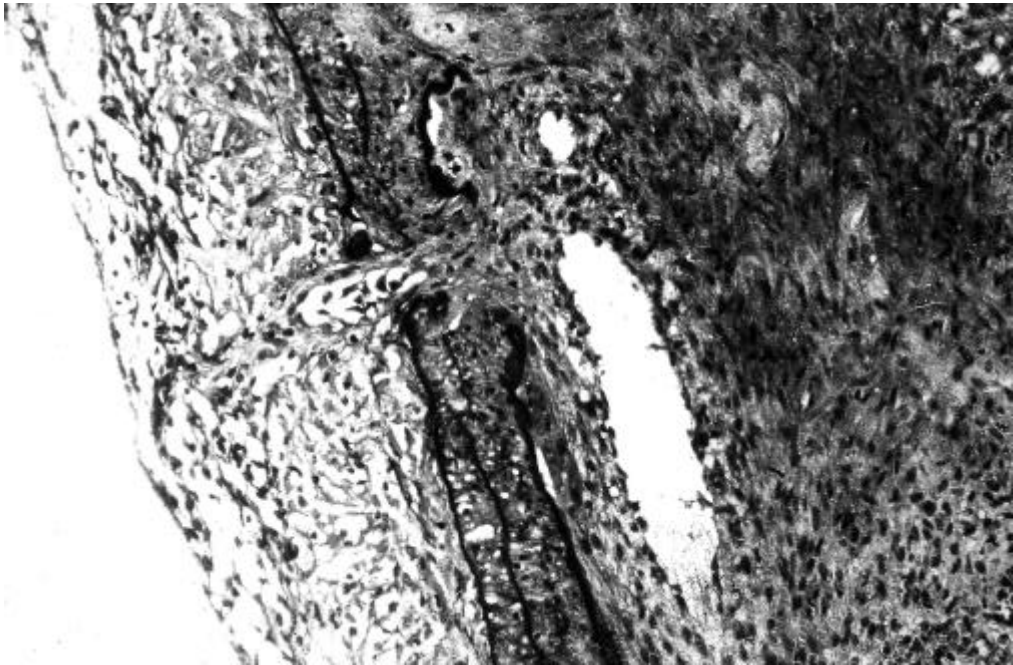




Figs. 36, 37 y 38: Distintos cortes histológicos, teñidos con técnica para elásticas, de segmentos arteriales puncionados. Se aprecian nítidamente las soluciones de continuidad generadas y la luz arterial ocupada por tejido de granulación rico en vasos y en células fusiformes, en continuidad con los tejidos periarteriales.







intimal. A la vez que ocurren estos hechos, se crea una luz vascular preferencial que sustituye a la primitiva del segmento arterial.

### **3.3.2 SUBSERIE III B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL ENTRE DOBLE LIGADURA PUNCIÓNADO SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA**

Los resultados de la presente subserie fueron similares a los de la subserie III A, resaltando una mayor angiogénesis desde la pared venosa **(tabla 9)**. La penetración microvascular en la arteria tuvo una intensidad y cronología similar en ambas subseries.

### **3.4 SERIE IV: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL PUNCIÓNADO Y CONSERVACIÓN O NO DE LA ADVENTICIA**

#### **3.4.1 SUBSERIE IV A: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA ÚNICA DISTAL PUNCIÓNADO Y CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA**

##### ***3.4.1.1 Descripción macroscópica:***

El aspecto macroscópico del segmento arterial en las fases iniciales de experimento fue similar al observado en la serie de segmento arterial con ligadura única distal no puncionado. En resumen, formación de una columna sanguínea que ocupa la primitiva luz de la arteria y que, hacia las 72 horas, adquiere una coloración más oscura en la zona del segmento más proximal a la ligadura (la más distal del segmento) (zona B), persistiendo coloración rosada y aspecto urgente en el resto de la columna sanguínea (zona A). Como se ha expuesto, el segmento arterial considerado (entre la colateral permeable y la ligadura) fue de 1,0 cm, siendo la zona A y la B de 0,5 centímetros aproximadamente. Los hechos previamente expuestos se intensifican entre los días 3 y 10. En fechas posteriores hay una marcada diferencia macroscópica entre las series mencionadas, según que se hubiese puncionado o no la arteria. Mientras que en la serie no puncionada se

produce un ensanchamiento marcado de la zona B, en la puncionada, dicha zona aparece retraída, fragmentada, con aspecto esclerótico, alternando áreas blanquecinas con otras de color amarillento.

### **3.4.1.2 Descripción microscópica:**

Pared venosa:

Los hechos morfológicos son similares a los descritos para la serie de segmento arterial puncionado entre ligaduras. En resumen se pone de manifiesto: a) activación de las células endoteliales (**fig. 39**) (incremento del volumen somático y de la actividad mitótica) entre los días 2-4 (**fig.40**); b) fenómenos de migración endotelial a través de las restantes capas de la pared venosa (emisión de prolongaciones paralelas que originan yemas vasculares) entre los días 3 y 5 (**figuras 41 y 42**), dichos fenómenos se ponen de manifiesto nítidamente en cortes ultrafinos, evidenciándose los procesos endoteliales que atraviesan las zonas discontinuas de la elástica interna venosa (**fig.43**); c) cambios de las células musculares lisas de la pared venosa adquiriendo características transicionales con células pericitarias y en coincidencia con la presencia de células endoteliales en su vecindad (**figs. 44, 45 y 46**) ; d) canalización y máximo desarrollo de las yemas vasculares neoformadas desde la pared venosa, entre los días 4 y 6 (**figura 47 y 48**); e) presencia de figuras de mitosis en las células endoteliales (**figs. 48 y 49**) y coincidencia en este tiempo de fenómenos

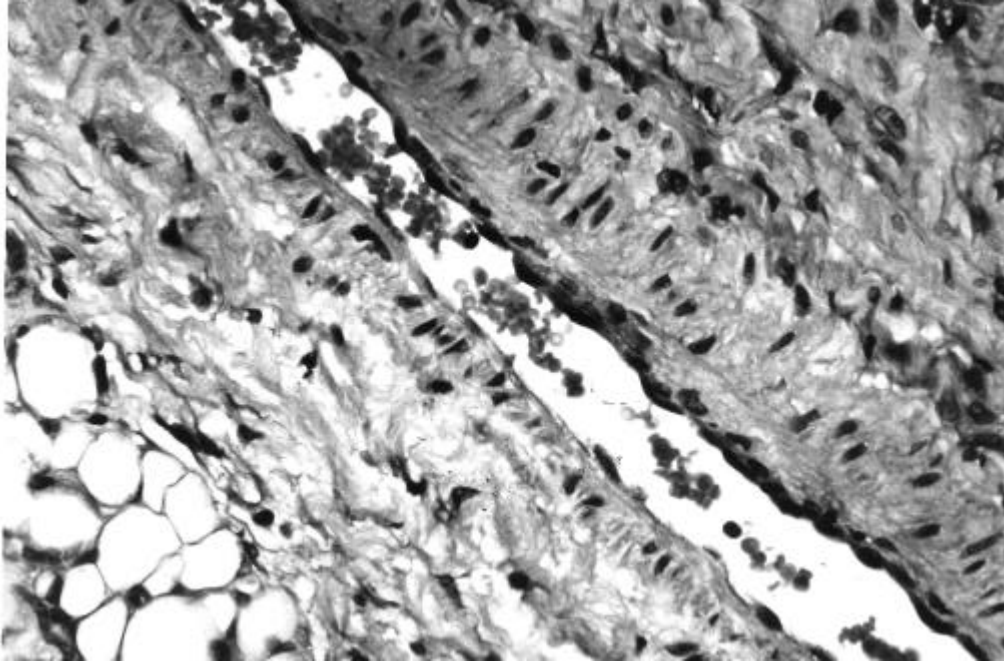


Fig. 39: Corte longitudinal de la vena femoral en la serie IVA en el que se aprecia un incremento en número y volumen de las células endoteliales en la vertiente próxima al segmento arterial.

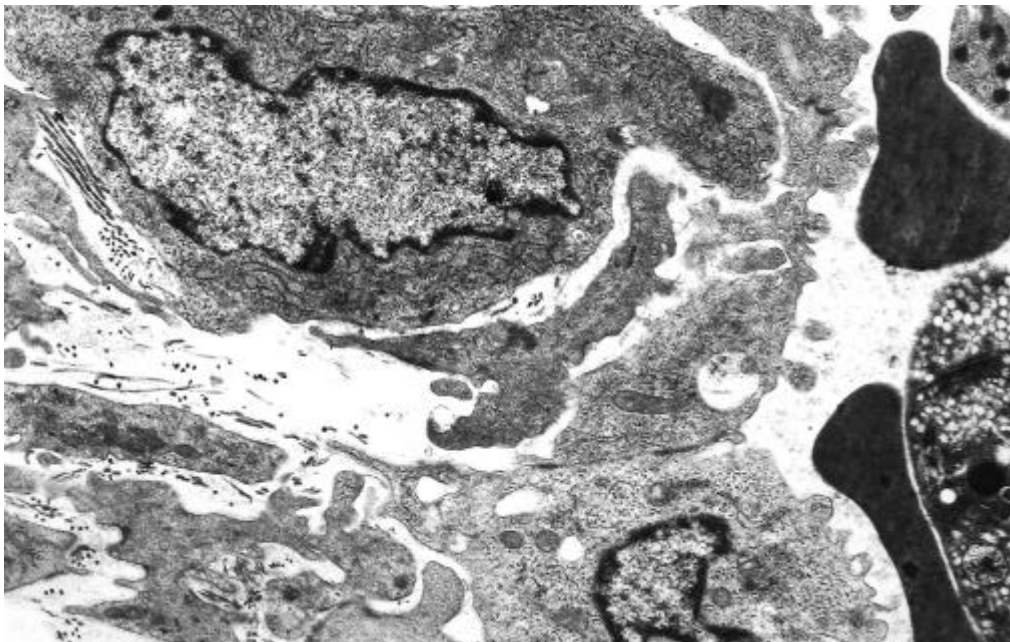
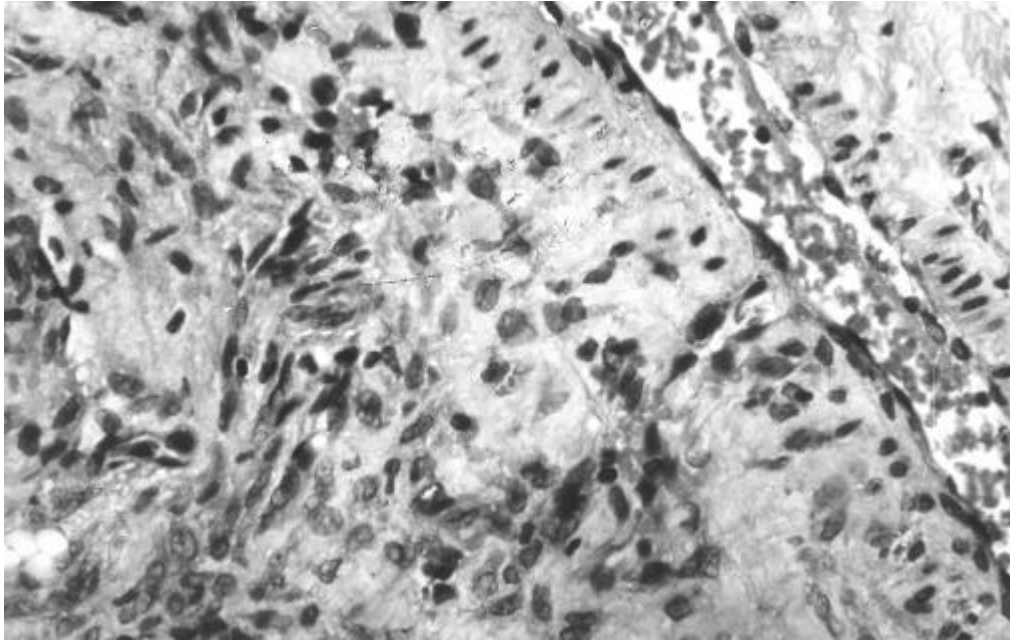
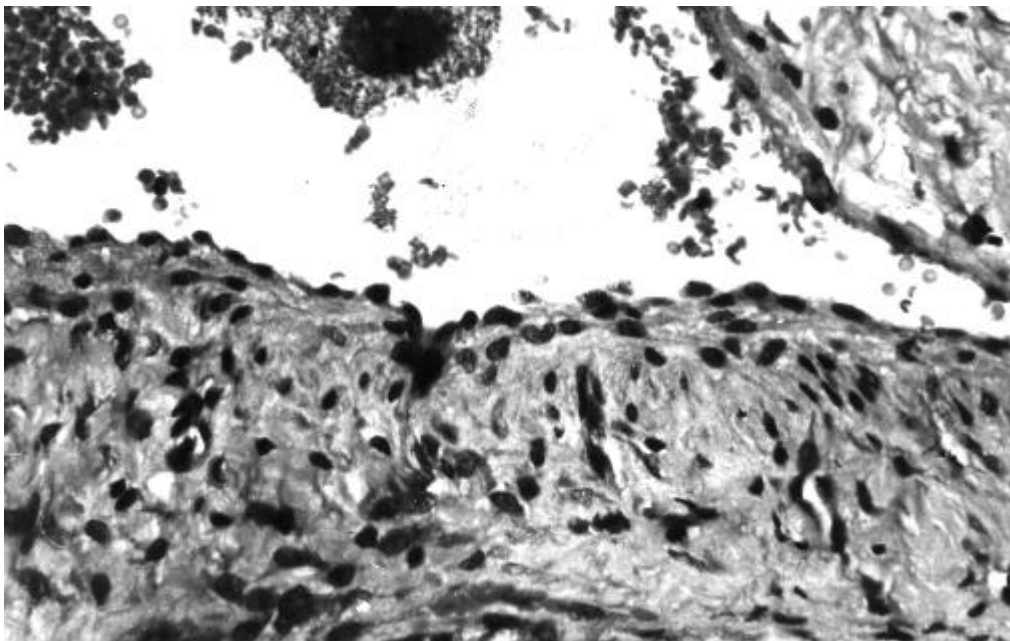


Fig. 40: Detalle ultraestructural de la intima venosa, en el que se aprecia el inicio de la formación de una yema vascular a partir del endotelio venoso.



Figs. 41 y 42: Visiones parciales de la pared venosa, perteneciente a la Serie IV. Se distinguen fenómenos de migración endotelial a través de las restantes capas de la pared venosa, dando lugar a yemas vasculares. Algunas de ellas aparecen aisladas en la capa media.



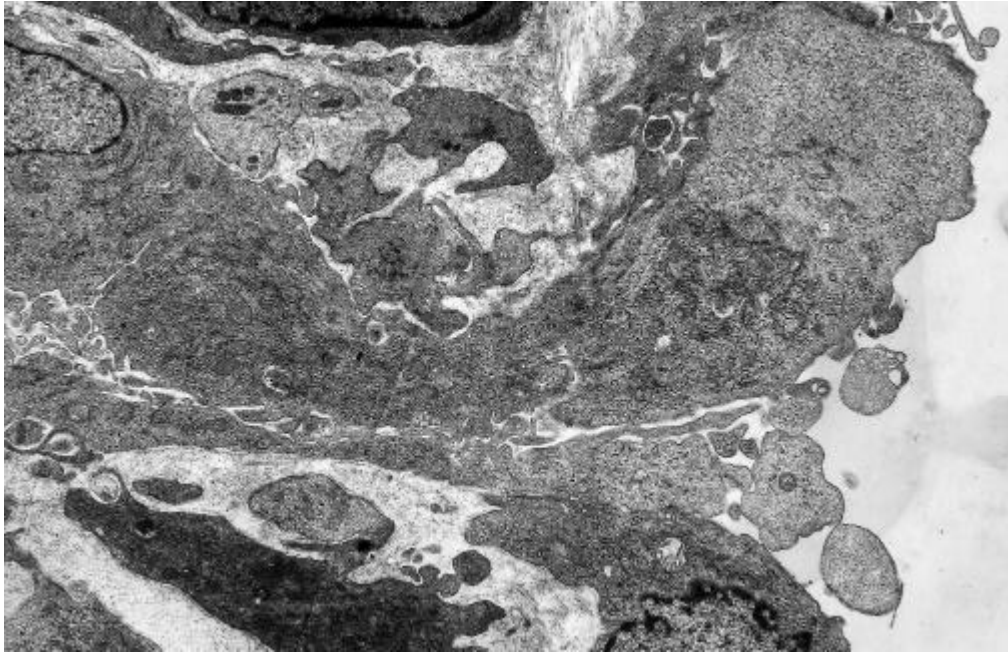
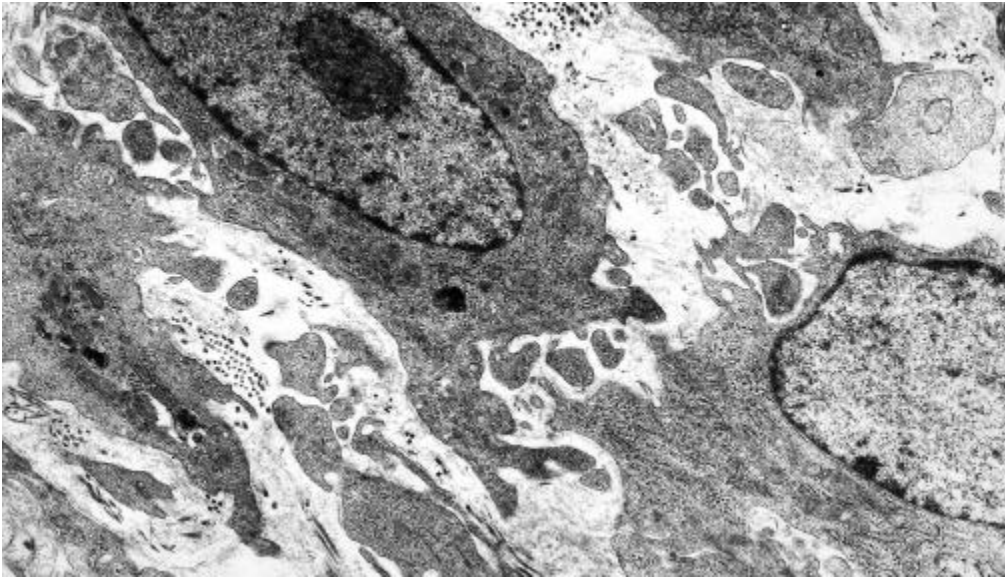
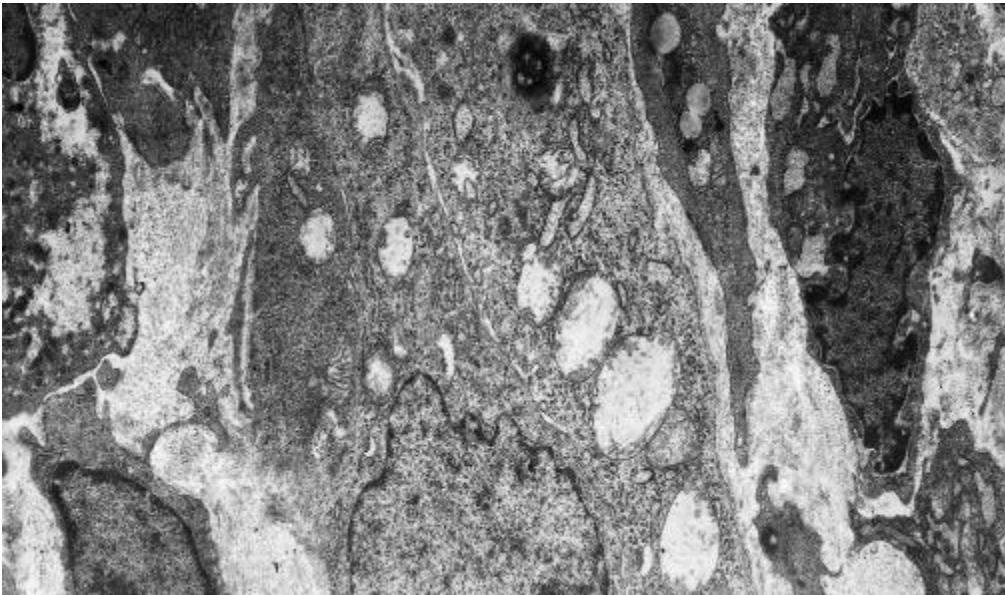


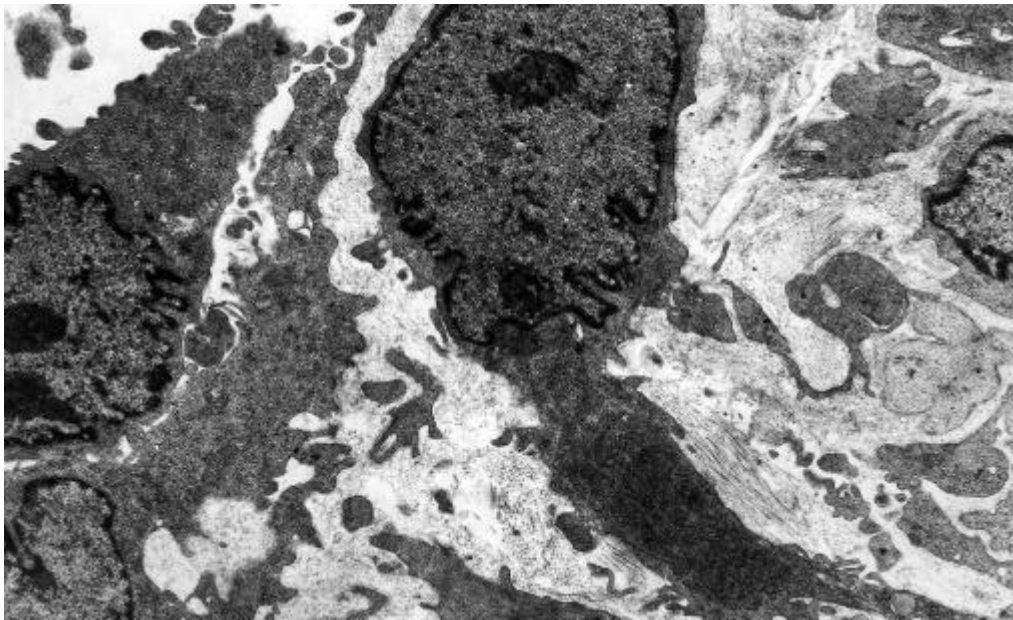
Fig. 43: Aspecto ultraestructural del nacimiento de una yema neoformada a partir del endotelio venoso. Se distingue la disposición perivascular de las células musculares lisas de mayor electrodensidad que las de estirpe endotelial.



Figs. 44, 45 y 46: Cortes ultrafinos que permiten distinguir, junto a células endoteliales, las características ultraestructurales de las células musculares lisas de la capa media en su transición hacia células perivasculares







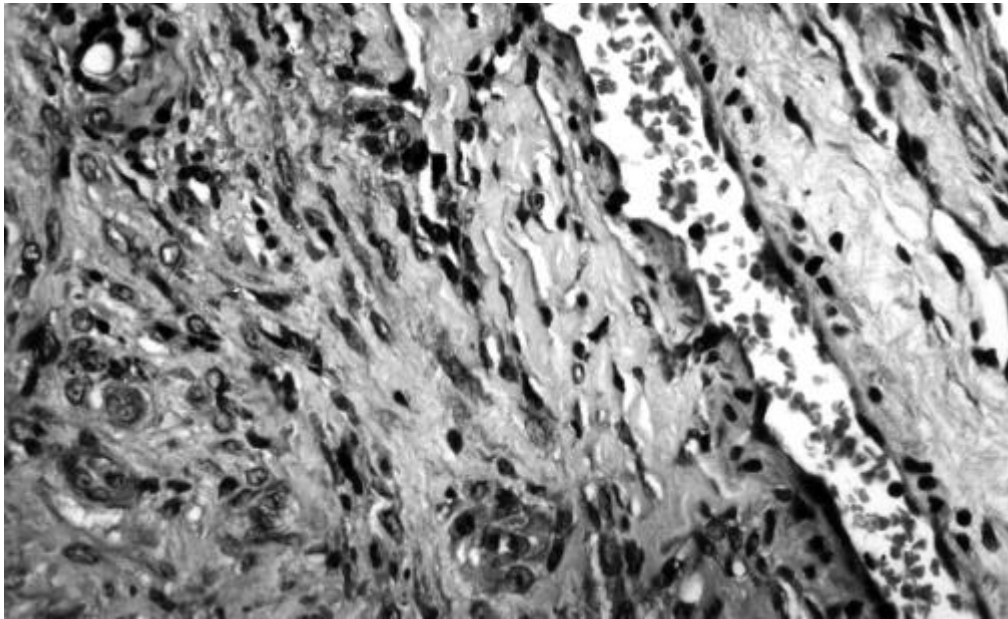
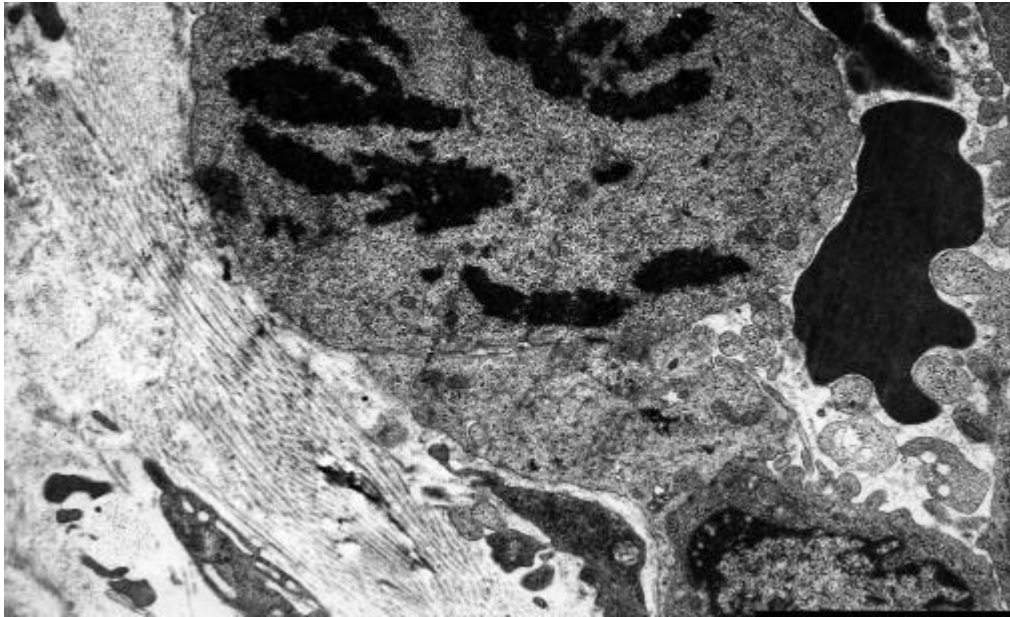
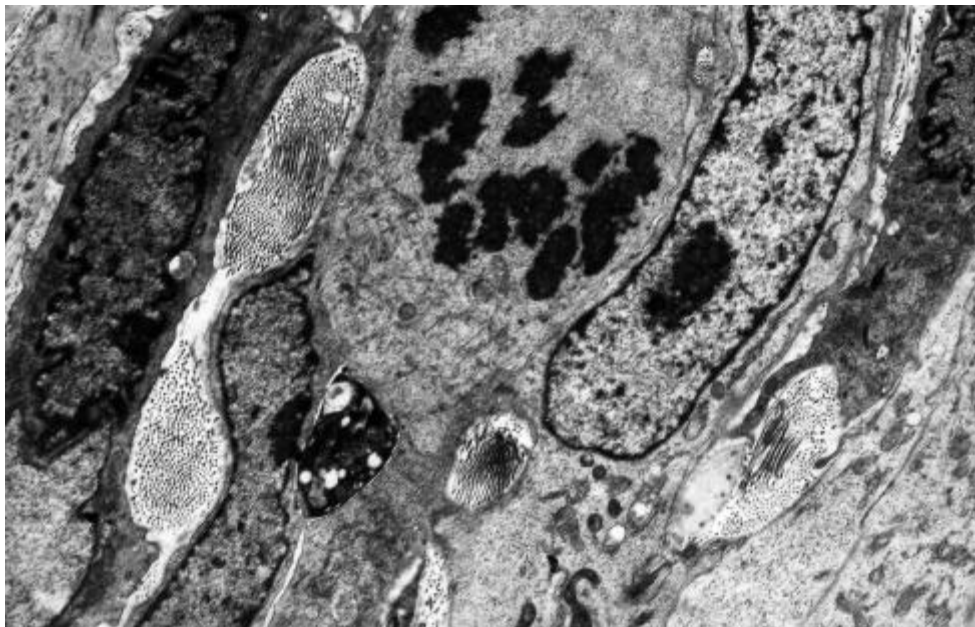


Fig. 47: Detalle, en corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina, de la pared venosa en el que se aprecia la canalización de yemas vasculares neoformadas, surgidas a partir del endotelio venoso, el día 5 de iniciada la experiencia.



Figs. 48 y 49: Imágenes en cortes ultrafinos en las que se ponen de manifiesto figuras de mitosis en las células endoteliales de yemas vasculares neoformadas a partir del endotelio venoso.



involutivos en gran parte de las yemas vasculares (**fig. 50**) neoformadas, con máxima expresión de este fenómeno entre los días 7 y 8; f) persistencia de algunos vasos preferenciales (**fig. 51**) que continúan conectados con la luz venosa (**figura 52**).

Espacio arteriovenoso:

En las fases iniciales los hallazgos morfológicos son similares en las series de segmento arterial con ligadura única distal con y sin punciones. Efectivamente, se asiste a la formación de una intensa red microvascular en el espacio arteriovenoso, con presencia de células fusiformes en su entorno. Dichos fenómenos son manifiestos entre los días 3 y 6. Se asiste también a una involución microvascular similar a la señalada en la serie de arteria no puncionada. A partir del día 6 hay diferencias según que la arteria fuese o no puncionada. El espacio arteriovenoso en vecindad a la zona B del segmento arterial puncionado experimenta marcada fibrosis, mientras que la fibrosis es discreta en los espacios arteriovenosos en torno a la zona A de dicho segmento, y a la zona A y B del segmento no puncionado.

Pared y luz arterial:

En las zonas de punción se ponen de manifiesto acúmulos de material fibrinoso, comportándose el segmento arterial estudiado de forma diferente según se trate de la zona A y B. En la zona A, los hechos son similares a los que ocurren en la del segmento no puncionado, es decir, la presencia de gran número de yemas vasculares (**fig. 53**) y células fusiformes (**fig.54**) que penetran la pared arterial y que modulan hacia engrosamiento intimal.

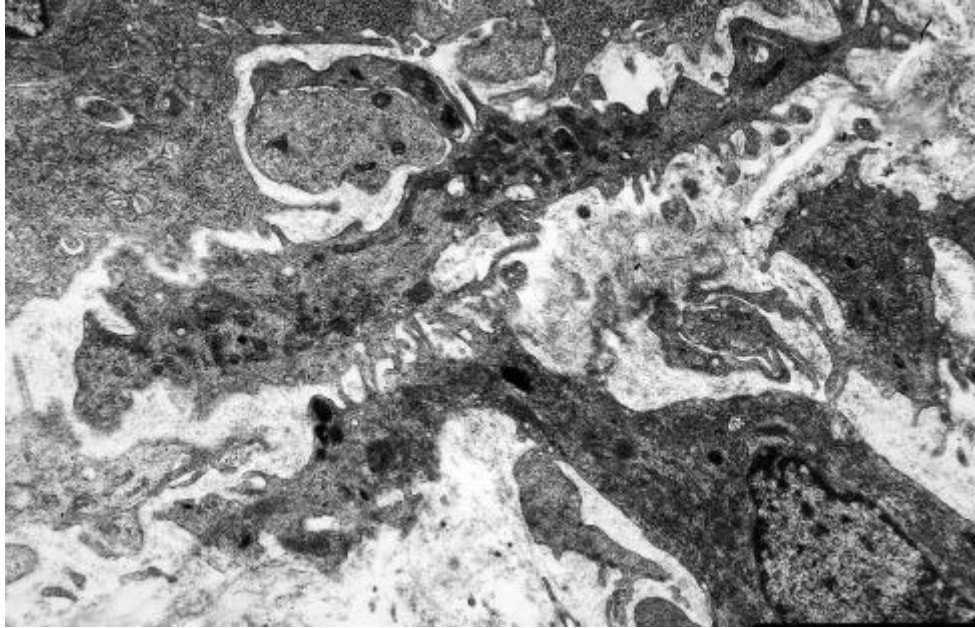


Fig. 50: Detalle de restos de vaso involutivo localizado en la pared venosa, próxima al segmento arterial intervenido.

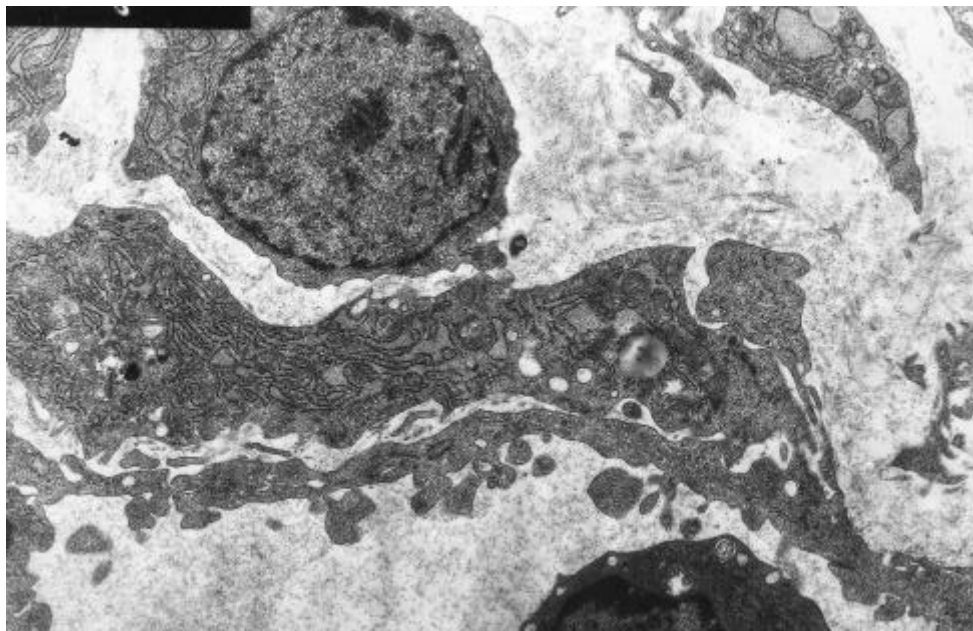


Fig. 51: Parte de la pared de un vaso preferencial persistente en la pared de la vena femoral hacia los días 7 - 8 de iniciada la experiencia. Se distingue en posición perivascular una célula con abundantes cisternas de Retículo endoplásmico rugoso.

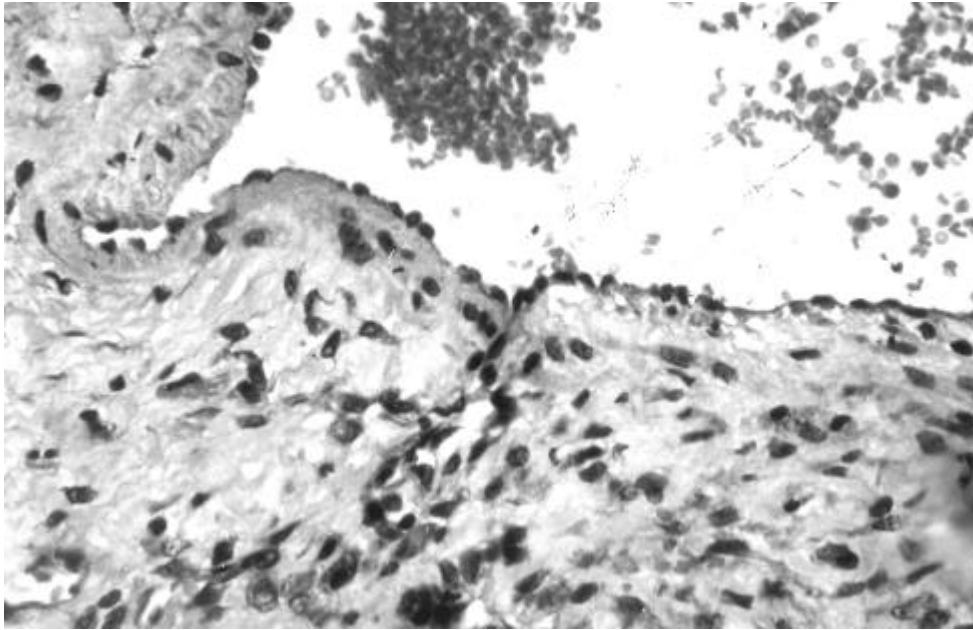


Fig. 52: Persistencia de un vaso preferencial conectado con la luz de la vena femoral en la fase final de la Serie IV.

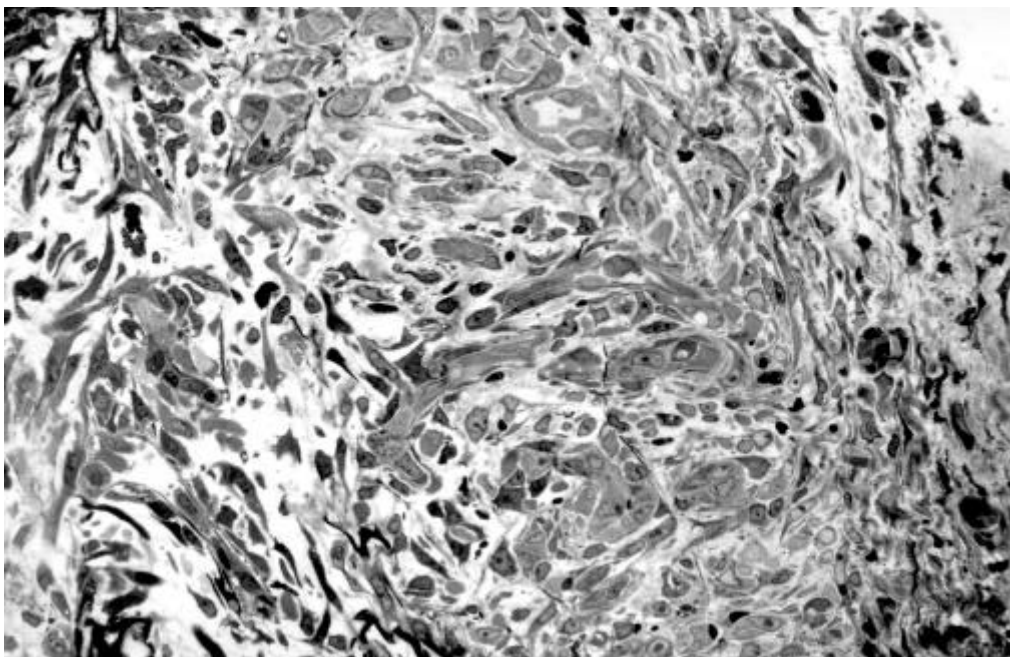
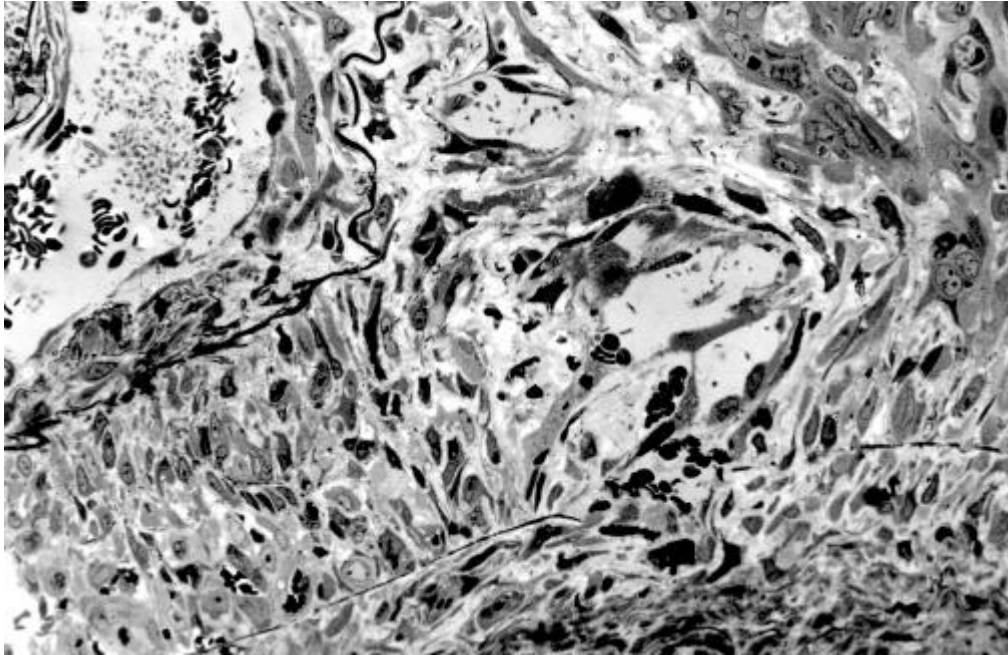


Fig. 53: Corte semifino en el que se aprecian numerosas yemas vasculares dispuestas en adventicia y capa media arterial. Es posible observar comunicación entre estas últimas y las presentes en la luz arterial.



Figs. 54: Penetración de la pared arterial por numerosos vasos angiogénicos y elementos celulares en dirección hacia la luz del segmento arterial y su modulación hacia engrosamiento intimal.

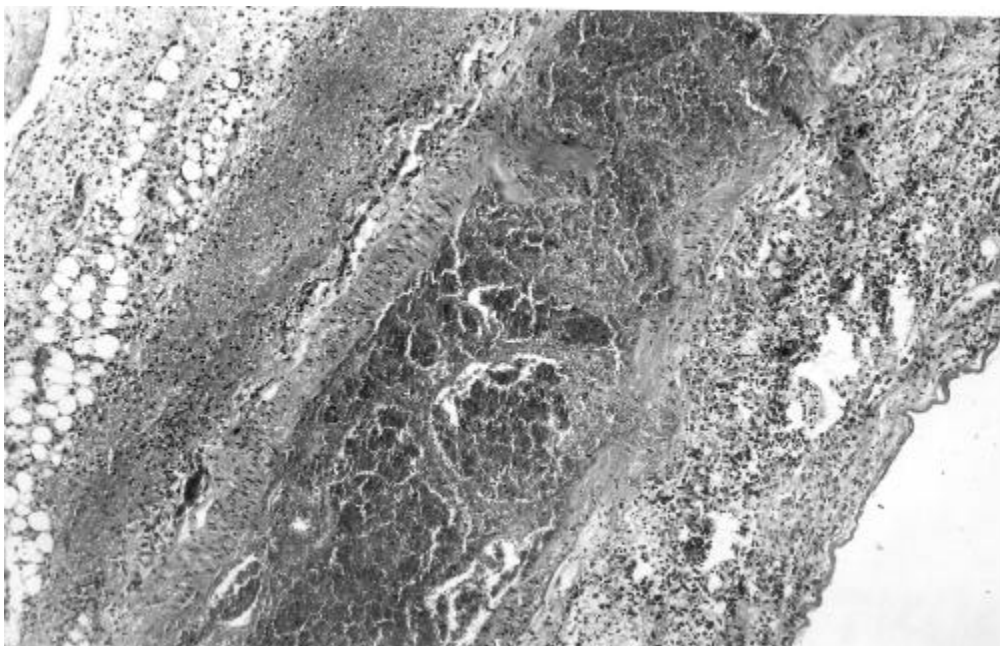
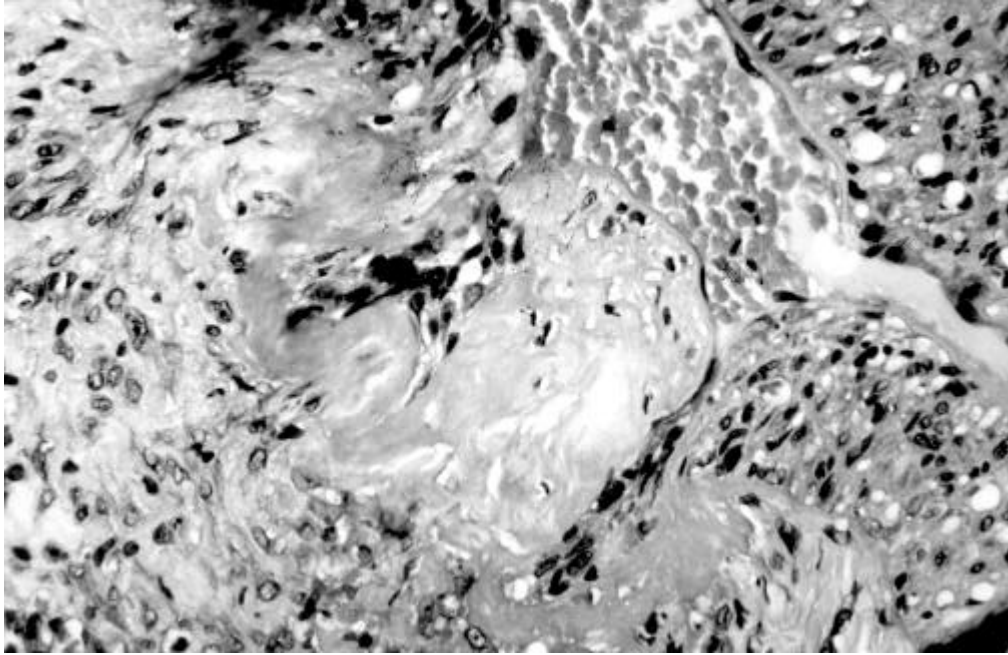


Fig. 55: Aspecto microscópico de la zona B del segmento no puncionado. Se distingue la luz ocupada básicamente por material hemático y la adventicia con un rico infiltrado inflamatorio.

En la zona B la arteria aparece repleta por material hemático modificado (**fig.55**), las zonas de punción son rodeadas por acúmulos de células fusiformes y algunas yemas vasculares (**figuras 56 y 57**). En la luz arterial hay restos hemáticos y macrófagos, muchos de estos últimos cargados de hemosiderina. Las células musculares lisas de la capa media experimentan fenómenos degenerativos, puestos de manifiesto por alteración nuclear, formación de masas sólidas filamentosas intracitoplásmicas y lisis celular. Hacia los días 5-7 no hay prácticamente células musculares lisas en la capa media y los escasos vasos que penetran involucionan (**fig. 58**). A todo ello se suma proliferación fibroblástica en la adventicia con marcada con hialinización, a la vez que presencia de macrófagos con restos celulares. Del día 10 en adelante se asiste a fragmentación de las membranas elásticas, retracción de la luz arterial, con presencia de unos macrófagos en la misma, y fibrosis periarterial (**59 y 60**). Es posible distinguir en esta zona B áreas con diferente aspecto, alternando las retráctiles con las ocupadas por abundantes macrófagos (**fig. 61**). Los mencionados hechos son responsables del aspecto macroscópico de la arteria, con apariencia filiforme y escleroso. En etapas más avanzadas el tejido fibroso se hialiniza en amplias zonas, y pueden aparecer focos de calcificación distrófica.





Figs. 56 y 57: Areas pertenecientes a las zonas de punción. Se aprecia material fibrinoso rodeados por células fusiformes y algunas yemas vasculares.

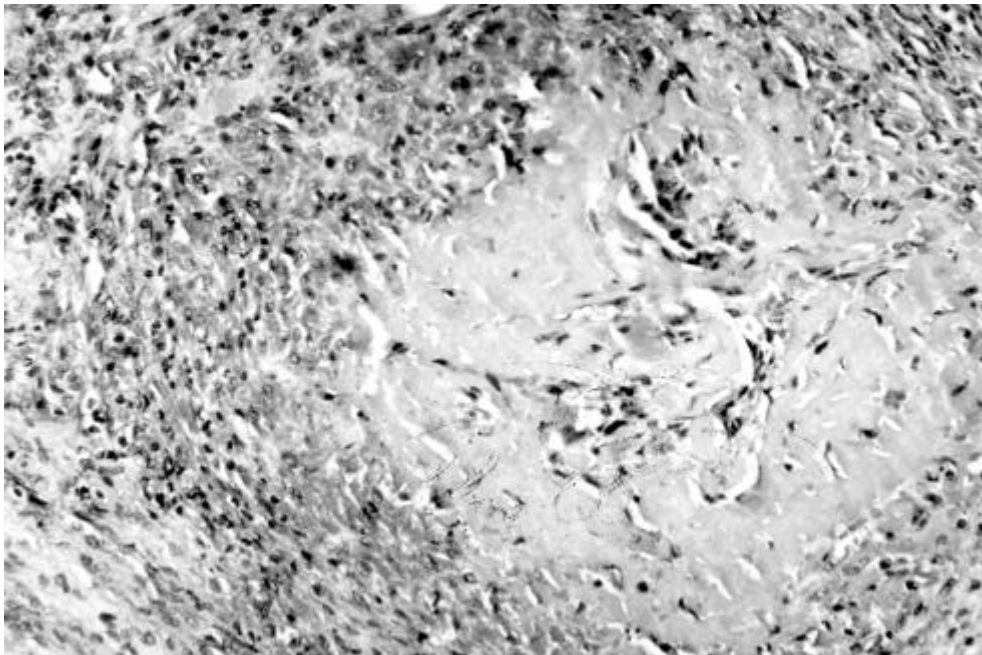
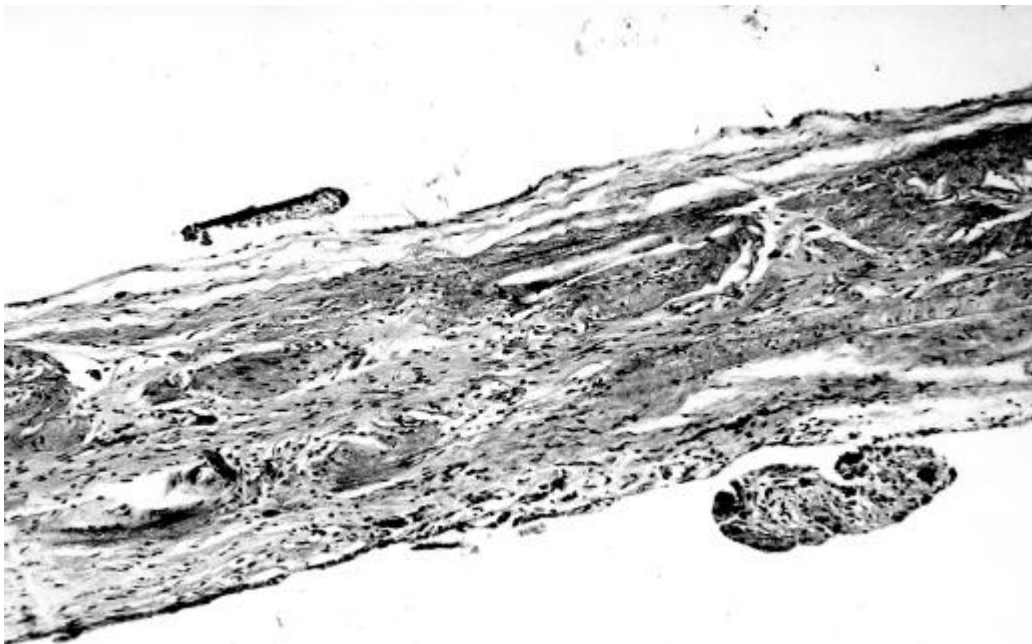




Fig. 58: Detalle ultraestructural de un vaso involutivo próximo a lámina elástica. Se observan células perivasculares que presentan una intensa electrodensidad.



Figs. 59 y 60: Fase final de la serie IVA. Obsérvese en las distintas imágenes la fragmentación de las membranas elásticas, la retracción de la luz arterial, con presencia de macrófagos en la misma, y la fibrosis periarterial.



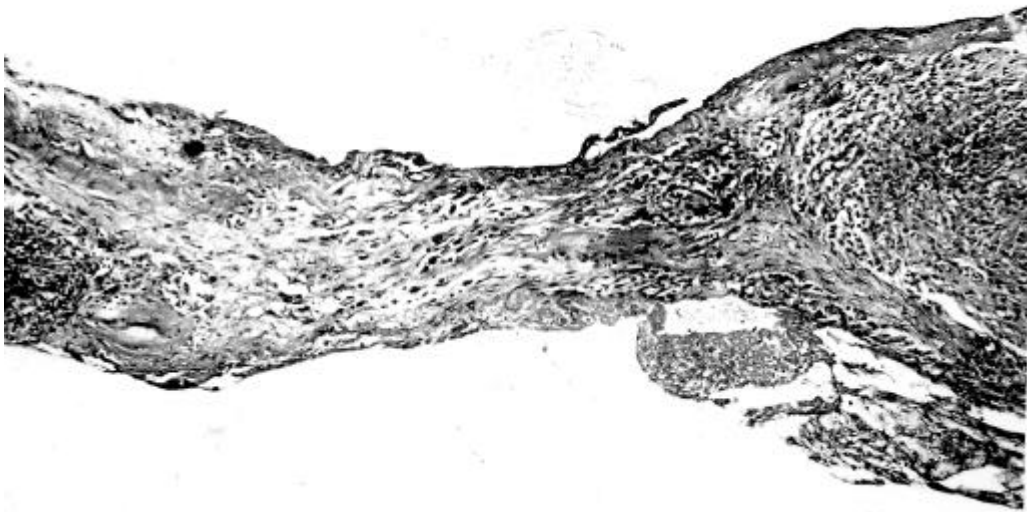


Fig. 61: Area limítrofe, en la serie IV A, entre la zona con proliferación intraluminal y la que ha experimentado fibrosis, de evidente menor calibre.

### **3.4.2 SUBSERIE IV B: SEGMENTO DE ARTERIA FEMORAL CON LIGADURA DISTAL ÚNICA PUNCIÓNADO SIN CONSERVACIÓN DE LA ADVENTICIA**

En los primeros estadios los hechos morfológicos fueron similares en las subseries A y B, aunque con incremento de la angiogénesis desde la pared venosa (**tabla 9**). Se pusieron de manifiesto diferencias a partir del día 10, ya que sólo se observó esclerosis y fragmentación de la zona B del segmento arterial en aproximadamente la mitad de los casos, mientras que en los restantes hubo recanalización de dicho segmento.

TABLA 9

Densidad neocapilar (número de capilares neoformados surgiendo desde la íntima de la pared venosa seccionada, en una longitud de 25 mm)

		1	2	3	4	5	6	7	10	21
<b>CONTROL</b>	<b>P</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>D</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>SUBSERIE Ia</b>	<b>P</b>	0	0	4 ± 2,3	10 ± 9,6	10,3 ± 9,2	12,4 ± 8,6	4,6 ± 3,8	2,33 ± 1,6	0,66 ± 0,4
	<b>D</b>	0	0	4,8 ± 3,1	11,25 ± 3,5	7,65 ± 6,15	11,3 ± 7,9	3,1 ± 1,2	1,75 ± 1,2	1,02 ± 0,73
<b>SUBSERIE Ib</b>	<b>P</b>	0	2,4 ± 2,1	14 ± 8,4	74,3 ± 50,5	101,5 ± 70,8	147,8 ± 80,7	33,4 ± 26,2	10,2 ± 7,6	2,7 ± 2,6
	<b>D</b>	0	2,6 ± 2,0	13,7 ± 7,5	60,8 ± 43,2	86,75 ± 27,55	134,25 ± 73,4	28,35 ± 12,3	9,85 ± 6,33	2,4 ± 1,95
<b>SUBSERIE IIa</b>	<b>P</b>	0	0	5,1 ± 3,6	9,8 ± 8,3	11,3 ± 7,9	15,2 ± 10,9	3,7 ± 3,3	1,8 ± 1,5	1,4 ± 1,2
	<b>D</b>	0	0,2 ± 0,1	3,01 ± 2,07	10,3 ± 8,45	8,65 ± 4,32	13,1 ± 9,7	2,5 ± 2,3	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,3
<b>SUBSERIE IIb</b>	<b>P</b>	0	5,3 ± 4,7	21,2 ± 16,4	70,5 ± 62,3	159 ± 80,9	136,9 ± 112,3	54 ± 29,7	13,6 ± 11,7	2,1 ± 1,6
	<b>D</b>	0	5,6 ± 3,8	13,3 ± 12,6	72,12 ± 29,5	122,5 ± 56,25	143,1 ± 98,2	29,2 ± 19,2	6,3 ± 5,3	3,9 ± 0,6
<b>SUBSERIE IIIa</b>	<b>P</b>	0	4,1 ± 3,9	13,7 ± 9,1	61,3 ± 49,7	97,2 ± 88,5	94,3 ± 65,6	27,4 ± 21,7	7,8 ± 6,3	3,6 ± 4,8
	<b>D</b>	0	3,2 ± 2,7	9,8 ± 3,2	65,8 ± 55,35	78,3 ± 56,7	88,6 ± 49,4	25,1 ± 16,15	8,5 ± 4,2	2,1 ± 0,2
<b>SUBSERIE IIIb</b>	<b>P</b>	0	8,3 ± 7,6	24,5 ± 12,1	89,3 ± 69,7	170,7 ± 101,3	193,2 ± 110,9	33,6 ± 19,7	11,5 ± 6,9	3,4 ± 1,2
	<b>D</b>	0	4,15 ± 0,23	6,6 ± 5,9	19,7 ± 8,33	75,4 ± 64,28	197,3 ± 31,15	201,6 ± 97,2	29,4 ± 17,3	14,2 ± 7,35
<b>SUBSERIE IVa</b>	<b>P</b>	0	4,8 ± 3,6	15,1 ± 10,6	57,6 ± 51,3	104,8 ± 85,2	111,6 ± 91,4	31,9 ± 22,6	15,1 ± 8,3	2,7 ± 1,5
	<b>D</b>	0	5,6 ± 4,8	19,17 ± 16,8	37,9 ± 26,5	93,7 ± 79	87,6 ± 71,5	17,6 ± 15	4,3 ± 3,6	0,4 ± 0,3
<b>SUBSERIE IVb</b>	<b>P</b>	0	5,2 ± 4,3	18,2 ± 11,7	85,6 ± 72,3	190,4 ± 83,4	197,1 ± 164,3	42,6 ± 31,7	22,4 ± 13,7	6,2 ± 5,5
	<b>D</b>	0	6,3 ± 6,1	15,7 ± 13,9	43,2 ± 10,6	111,5 ± 101,3	115,6 ± 96,1	21,3 ± 16,2	5,6 ± 4,3	0,9 ± 0,3

## 4 DISCUSIÓN

Tal y como se expuso en el planteamiento de los objetivos de la presente Tesis Doctoral, nos propusimos investigar la influencia sobre la angiogénesis e involución vascular de los posibles factores que se producen durante la formación del engrosamiento intimal. Con este objetivo en mente, hemos combinado modelos experimentales y hechos desarrollados y demostrados por nuestro grupo de trabajo. Mediante varios de dichos modelos, se logra producir engrosamiento intimal a lo largo de un segmento arterial conectado o no con la circulación proximal. En los casos en que dicho segmento esté conectado a la circulación proximal, interrumpiéndose ésta únicamente en la zona distal, se crea una columna hemática comunicada con el flujo sanguíneo proximal, el cual tiende a impulsar distalmente los productos y factores liberados en el propio segmento, mientras se desarrolla el engrosamiento intimal. A su vez, se han diseñado modelos experimentales en los que se permite la salida de esos posibles factores, hacia los territorios angiogénicos periarteriales, donde podría valorarse la acción de los mismos. La posibilidad de escape hacia las zonas periarteriales de dichos productos puede a su vez realizarse en toda la longitud del segmento considerado, con lo cual puede también estudiarse el efecto según se alejan de las regiones proximales.

Entre los hechos ya demostrados por nuestro grupo, está la capacidad de la vena femoral de la rata para participar en los procesos de

neovascularización. Efectivamente, mediante un modelo fácilmente reproducible se ha podido analizar detalladamente la acción de diferentes sustancias en toda la extensión de la pared venosa, lo cual permite una cuantificación precisa de las yemas vasculares neoformadas a lo largo de la misma, justamente en un territorio paralelo al segmento de la arteria femoral objeto de nuestro estudio.

Para una mejor combinación de los hechos, el segmento arterial en estudio y el venoso adyacente (1,0 centímetro de longitud) fueron, tras su extracción una vez transcurrido el tiempo del experimento, orientados de forma que los cortes histológicos se efectuaran paralelamente al eje longitudinal de la vena y arteria, facilitando además que coincidieran ambos vasos en un mismo corte. Ello ha permitido comparar lo que ocurría en las diferentes zonas de la vena con respecto a las de la arteria y cuantificar la microvascularización que surge en las mismas desde la pared venosa. Dado que los resultados orientaron una diferente respuesta, en determinadas series, en dos partes concretas del segmento arterial y venoso (zona A: más proximal de 0,5 centímetros de longitud, y zona B, más distal, también de 0,5 centímetros de longitud)., dispusimos la sistematización de los estudios en ambas zonas, para establecer comparaciones entre las mismas.

Mediante los procedimientos indicados hemos confirmado que, mientras tiene lugar el engrosamiento intimal arterial, se producen yemas angiogénicas desde la pared venosa adyacente, a la vez que desde la microcirculación (vénulas, vénulas postcapilares y capilares periarteriales).

Desde el punto de vista histológico hemos también confirmado las diferentes etapas y hechos morfológicos descritos previamente durante los



fenómenos de angiogénesis. En este caso, con la particularidad de tratarse de una vena con cubierta muscular. Efectivamente, las células quiescentes de la pared venosa experimentan hipertrofia y prominencia hacia la luz vascular, con agrandamiento de los núcleos, prominencia de los nucleolos, incremento de ribosomas que se disponen de forma libre, así como del número de organelas y de proyecciones hacia la superficie libre de la célula (Yamagami, 1970; Ausprunk y Folkman, 1977; McCracken y cols., 1979; Burger y Klinworth, 1981; D'Amore y Thompson, 1987).

Ocasionalmente, hemos puesto también de manifiesto zonas en las que la membrana basal se fragmenta y tiende a desaparecer, a la vez que las células endoteliales migran sin presencia de membrana basal en su entorno (Clark y cols., 1982 a, b). Es posible que esto ocurra tal, y como se ha expuesto por diversos autores, mediante la actuación de enzimas proteolíticas sintetizadas por las células endoteliales activadas (Rifkin y cols., 1982; Moscatelli y Rifkin, 1988).

Posteriormente hemos confirmado fenómenos de migración, que comienzan por la protusión de las CE a través de la pared venosa, en forma de pseudópodos que adoptan configuración bipolar o bicelular, tal y como ha sido descrito en otros territorios (Burger y cols., 1983), adquiriendo lo que se denomina disposición en telescopaje (Sholley y cols., 1984). En otras palabras, dan origen a prolongaciones o procesos celulares paralelos y dispuestos en pares (Sholley y cols., 1984). Tal y como ha sido señalado (Furusato y cols., 1985), es posible, que en la migración de estas prolongaciones celulares, intervenga la capacidad contráctil de filamentos intermedios, los cuales han estado presentes de forma constante en los citoplasmas de estas células. Hemos distinguido también proliferación

endotelial, la cual ha sido demostrada paralelamente con la migración del endotelio, hecho en el que estamos de acuerdo con Sholley y colaboradores (1984). Así mismo, se distinguen también CE en mitosis en los vasos neoformados, fundamentalmente en la parte en que éstos conectan con el vaso progenitor, lo que coincide con observaciones de algunos autores previos (Ausprunk y Folkman, 1977; Folkman, 1982, 1986). A la vez que las CE migran y proliferan, comienzan a formar canales tubulares, que pueden contener algún hematíe. En cuanto al origen de las luces de estos capilares no nos parece adecuada la hipótesis de que se forman por vacuolización de las CE (furusato y cols., 1984, 1985), ya que, en nuestro criterio y ante las observaciones del presente trabajo, nos parece más acertada la idea de una canalización surgiendo en el espacio entre CE adyacentes por curvatura de dichas células (Wakui, 1988). Discutiremos más adelante el posible origen de los pericitos formados en torno a las yemas vasculares que surgen desde la pared venosa. A la vez que aparecen dichas células perivasculares, se observa una matriz provisional en torno al endotelio, la cual va a ser sustituida progresivamente por una membrana basal. A continuación se forma una red u ovillo microvascular, en cuya organización parecen intervenir la disposición de células perivasculares, las cuales, como indican Nehls y colaboradores (1992), pueden servir como una guía de crecimiento.

Además de los estudios morfológicos, los cuantitativos demuestran una capacidad significativa de los segmentos ocluidos de la arteria femoral de la rata para inducir neovascularización desde la vena femoral, así como desde las vénulas postcapilares y capilares. Efectivamente, en la serie control, la pared venosa muestra un revestimiento endotelial quiescente, mientras que, tras la producción de engrosamiento intimal en el segmento

arterial adyacente, se produce una neovascularización de la pared venosa con aumento significativo en todas las series. Ello está de acuerdo con la liberación de moléculas angiogénicas desde la arteria, las cuales parecen alcanzar la pared de la vena adyacente. Esta capacidad angiogénica de la vena femoral, comprobada previamente por nuestro grupo de trabajo (Díaz-Flores y cols. 1994, 1996), es de interés, ya que se demuestra que venas con células musculares lisas (CML) en su pared y una lámina elástica interna discontinua pueden incrementar la neovascularización que se origina a partir de los vasos pericíticos.

Recientemente (Nicosia y Villaschi 1995) se ha demostrado que las CML de la pared arterial pueden intervenir en el origen de los pericitos de los microvasos formados in vitro a partir de anillos aórticos. Para los autores que han hecho esta demostración, los pericitos de los capilares y vénulas pueden ser representantes de un amplio sistema de CML pluripotenciales. Dado que en nuestras observaciones, las células periendotheliales de los capilares neoformados a partir de la vena femoral corresponden a CML que adquieren un aspecto transicional hacia pericitos, es posible que estos últimos puedan ser originados de dichas células, cuando la yema angiogénica inicia su desarrollo desde la pared venosa femoral. Más adelante volveremos sobre este aspecto, ya que, al discutir la penetración de capilares en el segmento arterial ocluido, tendremos ocasión para especular sobre el hecho de que las CML pueden participar en el origen de nuevos pericitos durante la neovascularización formada desde la vena, mientras que los capilares que penetran en la pared arterial pueden contribuir al origen de CML en la capa media arterial y en la íntima de la arteria.

El incremento de la neovascularización a partir de la vena, cuando se retira la adventicia y/o se punciona la arteria, alcanzando cifras hasta 8-10 veces superiores que cuando los segmentos arteriales cuentan con adventicia conservada, estaría de acuerdo con la posibilidad de que las moléculas angiogénicas liberadas alcancen más fácilmente la pared de la vena en estas condiciones que cuando se interpone la capa adventicial y/o las membranas elásticas. En este sentido, es conocido que la respuesta angiogénica puede ser modificada por la proximidad del territorio afecto a la fuente de los factores controladores de la angiogénesis (Edelman y cols 1990; Folkmann y Shing 1992).

Como hemos expuesto, en dicha capacidad angiogénica de la vena y de la microvascularización periarterial pueden intervenir factores angiogénicos liberados mientras se desarrolla el engrosamiento arterial. En este sentido, es conocido que la angiogénesis es iniciada por la acción de factores angiogénicos, bien por activación local de los genes que los codifican o bien por liberación desde su sitio de almacenamiento. En la pasada década, se ha demostrado que algunas moléculas se comportan como inductoras de la angiogénesis por vía directa o indirecta, incluyendo a los factores de crecimiento (Folkman y Klagsbrun, 1987; Klagsbrun y D'Amore, 1991; Folkman y Shing, 1992).

En este grupo están los denominados factores angiogénicos directos, cuando son capaces de inducir la proliferación y/o migración de las células endoteliales "in vivo" y estimularlas "in vitro" y los indirectos, cuando la acción "in vitro" falla o es inhibida, considerándose que movilizan a otros factores o células "in vivo". A su vez, es posible que los factores angiogénicos liberados durante el desarrollo del EI arterial actúen bien

principalmente de forma específica sobre las células endoteliales o que por el contrario puedan ser pleiotrópicos, interviniendo también sobre otras células, tales como fibroblastos, células musculares lisas, etc.

Teniendo en cuenta lo previamente expuesto, los factores angiogénicos pueden ser quimiotácticos y mitogénicos de forma simultánea o simplemente favorecedores de la angiogénesis de forma indirecta (Klagsbrun y Folkman, 1991). Entre los directos figuran el factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (bFGF) (Folkman y Klagsbrun, 1987; Gospodarowicz et al., 1987; Klagsbrun y Vlodavsky, 1988; Folkman y Haudenschild, 1980), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Connolly et al., 1989; Keck et al., 1989; Leung et al., 1989) y el derivado de plaquetas y endotelio (PD-EGF) (Thomas et al., 1985; Gospodarowicz et al., 1987; Miyazono et al., 1987; Ishikawa et al., 1989; Ferrara et al., 1989; Leung et al., 1989).

Los factores angiogénicos indirectos cubren un amplio abanico de sustancias, tales como factor transformador del crecimiento alfa (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Schreiber et al., 1986), factor transformante del crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) (Roberts et al., 1986), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (FraterSchröder et al., 1987), Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Sato et al., 1993), prostaglandinas de la serie E (Ziche et al., 1982), angiogenina (Fett et al., 1985; Hallahan et al., 1991), monobutiril (Dobson et al., 1990), nicotinamida (Kull et al., 1987), adenosina, ácido ocaico (Oikawa et al., 1992), ácido hidroxieicosatrienoico (Masferrer et al., 1991), algunos complejos cúpricos (Ziche et al., 1982; Raju et al., 1984; Folkman y Klagsbrun, 1987; Brem et al., 1990), productos de degradación del ácido hialurónico (West et al.,

1985) y productos finales en la glicosilación, relacionados con la edad (Cozzolino et al., 1990).

Algunas moléculas angiogénicas están presentes en determinados tejidos del adulto donde precisamente la angiogénesis no se produce (Gullino, 1981). Este hecho hace posible que la respuesta angiogénica dependa de la activación local o inactivación de esas moléculas (Ziche et al., 1992).

Entre los factores que se han descrito como capaces de ser liberados en el engrosamiento intimal están el bFGF, la angiotensina II, el óxido nítrico, la endotelina, el c-myc, factores leucocitarios, el PDGF, el TGF- $\beta$ , y el factor de von Willebrand, siendo posible hacer un seguimiento cronológico del engrosamiento intimal según los factores liberados y los efectos que éstos tienen sobre los elementos celulares y la matriz extracelular arterial.

Un hecho constante y ampliamente aceptado por la comunidad científica es señalar al daño ejercido sobre las CML como el primer requisito para el EI. Aunque en algunas de las muestras histológicas analizadas por nosotros no existía aparentemente tal daño con microscopía óptica, éste sí que fue evidente en estudios ultraestructurales. En todo caso, sí que observamos un brusco aumento de la proliferación de las CML en los días siguientes. En esta primera fase de replicación y durante el proceso de muerte de algunas otras células de igual naturaleza, se ha demostrado la liberación, por parte de las CML, de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (Lindner y Reidy, 1991; Olson y cols. 1992). Es posible que otros factores, tales como la angiotensina II, la endotelina, c-myc y la pérdida de

inhibidores del crecimiento puedan jugar también un papel primordial en el control de la replicación de la capa media.

El factor de crecimiento fibroblástico básico (b FGF), también implicado en fenómenos angiogénicos, es, como veíamos en los primeros apartados de esta tesis doctoral, una molécula polipeptídica multifuncional de 146 aa (Esch y cols. 1985) que presenta una gran afinidad por el heparan glicosamin-glicano (Baird y Ling, 1987). Varios autores han descrito una mayor potencia mitogénica sobre las CML cuando el endotelio estaba alterado (Lindner y cols. 1991). Estas apreciaciones coinciden con nuestra observación del mayor grado de EI en aquellas series con ausencia de un endotelio intacto.

Otro de los innumerables efectos del bFGF, los cuales no vamos a considerar con el fin de no ser reiterativos, es la inducción de la secreción de enzima convertidora de la angiotensina, la cual a su vez facilita la formación de angiotensina II, el segundo mitógeno de la primera fase que analizaremos en este apartado. Ambos estimulan el crecimiento de CML (Fishel y cols., 1995).

El principal interés en la angiotensina II como factor de crecimiento, es la facilidad de revertir su efecto mediante sustancias inhibitoras del tipo de los IECA. De hecho una sustancia de este tipo, el cilazapril ha demostrado tener un efecto antiproliferativo sobre las CML de la capa media e inhibe la migración de estas células hacia la íntima arterial, aunque aún permanece sin descubrir si este efecto se logra a través de la inhibición de la degradación de las bradicininas, lo que a tenor de los conocimientos actuales parece lo más lógico. Otros experimentos basados en la combinación con inhibidores

de la NO-sintetasa (INOS) sugieren que el efecto protector de los IECA se debe tanto al bloqueo de la formación de angiotensina II como de la degradación de las quininas, y que el óxido nítrico (NO) juega un papel principal en el efecto inhibitor de los IECA (Farhy y Carretero, 1993). La transferencia in vivo del gen de la NO-sintetasa endotelial (eNOS) en la pared de arteria carótida de conejo tras denudación con balón, ha provisto más evidencias sobre la inhibición de la acumulación de CML debido al NO (von der Leyen y cols., 1995). Estudios in vitro, sin embargo, sugieren que en presencia de FGF básico, el óxido nítrico puede estimular la síntesis de DNA en células musculares lisas en cultivo provenientes de aorta de rata, mientras que el óxido nítrico induce la inhibición de síntesis de DNA en células musculares lisas emigradas (Hassid y cols. 1994). Así pues, el papel del óxido nítrico, como inhibidor endógeno de las células musculares lisas no está del todo claro. Además del NO, la pérdida de otros inhibidores de crecimiento del tipo de la heparina/heparansulfato y el TGF- $\beta$  deben jugar un papel importante en la génesis del EI.

En el presente estudio hemos delimitado como segunda fase, el periodo que se caracteriza por la migración de las CML desde la media a la íntima. En esta segunda fase son varios los factores clásicamente descritos como contribuyentes a la migración de las células musculares lisas, como es el caso de los propios leucocitos, así como PDGF, TGF- $\beta$ , bFGF, la angiotensina II y el factor de von Willebrand. A pesar del gran número de líneas investigadoras desarrolladas en este sentido, la contribución de todos estos factores no está del todo definida (revisión 7ME).

Uno de los hechos más constantes observados por nosotros fue la presencia de gran cantidad de leucocitos y macrófagos en fases iniciales del



EI, con un especial énfasis en las zonas de mayor actividad angiogénica y formación de EI.

Recientemente se ha demostrado, utilizando anticuerpos monoclonales frente a moléculas de adhesión, que los mononucleares (Kling y cols. 1995) y no los neutrófilos (Tracey y Peach, 1992; Bult y cols., 1995) promueven el engrosamiento intimal estimulando la migración de células musculares lisas, probablemente por los factores de crecimiento que liberan.

Otro de los factores involucrados en esta segunda fase del EI es el PDGF, que, en contraste con los estudios in vitro, favorece en el modelo de denudación de arteria carótida en rata la migración de las células musculares lisas y no su proliferación (Jackson y cols., 1993; Jackson, 1994; Jawien y cols. 1992). Estudios basados en la observación del papel de los receptores del PDGF alfa y beta (PDGFR- $\alpha$  y  $\beta$ ) sugieren que deben actuar de forma diferente pero coordinada dentro de los mecanismos reguladores de la formación neointimal (Koyama y cols., 1994). La expresión abundante del PDGFR- $\beta$  por parte de las células musculares lisas intimaes sugiere que el PDGF- $\beta$  sintetizado por estas células debe estar involucrado en la formación neointimal a través de un mecanismo paracrino o autocrino (Lindner y cols. 1995).

Otro factor que debe jugar un papel importante en la migración de las CML es el factor de von Willebrand. Esta hipótesis está basada en el hallazgo de que este factor se acumula en la íntima tras la colocación de un anillo no oclusivo de silicona alrededor de la arteria carótida del conejo (Kockx y cols. 1993) en los estadios precoces del engrosamiento intimal. También se ha observado la acumulación de factor de von Willebrand bajo

las células endoteliales durante la formación de engrosamiento intimal en el ductus arterioso (Slomp y cols. 1992).

El factor de von Willebrand debe estar implicado por lo tanto en la migración de las células musculares lisas desde la media hacia la íntima. Es más, durante su procesamiento se secreta un pro-polipéptido que es quimiotáctico, al menos para neutrófilos y macrófagos (Tijburg y cols. 1992), hecho que confirmaría las posibles interacciones entre células endoteliales y leucocitos y macrófagos en esta fase.

Un hecho de particular importancia en la migración de las CML es la degradación de la matriz extracelular previa a ésta por enzimas proteolíticas. Las metaloproteínas de la matriz han sido implicadas de esta manera, como mediadores clave en la liberación de las células musculares lisas de su andamiaje de matriz extracelular (Bendeck y cols., 1994; Bendeck y cols. 1996; Zempo y cols. 1996; Dollery y cols., 1995).

Además de la migración celular, para que se desarrolle un verdadero EI hace falta que las células migrantes proliferen en la íntima. Este hecho es lo que se ha definido como tercera fase en la génesis del EI. Aún no ha sido identificada ninguna molécula como mitógena en esta fase, aunque se ha observado que cadenas de PDGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , y AT1 están sobreexpresados en la neoíntima de la rata (Viswathan y cols., 1992). En estos modelos, la infusión de PDGF  $\beta$  no estimuló la replicación (Jackson y cols. 1993), mientras que IGF-1 sólo está sobreexpresada en la media (Cercek y cols., 1990).

Aunque nuestro estudio es morfológico y no podemos precisar cuáles de los factores relacionados intervienen de forma directa o indirecta en los

fenómenos angiogénicos de nuestros experimentos, lo que sí ha quedado claro es la capacidad angiogénica a partir del engrosamiento intimal arterial en desarrollo, ya que la hemos podido poner de manifiesto en todas las series experimentales efectuadas. No obstante, la intensidad de la misma y la evolución de los vasos neoformados, a la vez que las características del tejido resultante, varió considerablemente según la serie y la zona considerada dentro del segmento.

Cuando el segmento arterial ocluido, con una o dos ligaduras, fue puncionado y/o desprovisto de adventicia, se produjo una más intensa neovascularización desde la pared venosa, oscilando las cifras de la siguiente manera.

Lo previamente expuesto indica que la adventicia constituye un espacio que, en cierta manera, aísla a los factores de crecimiento producidos en las capas media e íntima arterial y que, cuando se evita esta barrera, mediante punciones de la misma o retirada de su componente colágeno, hay un paso más permisible que eleva considerablemente la respuesta angiogénica desde los territorios periféricos.

La secuencia de los hechos morfológicos observados en el presente trabajo durante el desarrollo del engrosamiento intimal en arterias ocluidas confiere un elevado papel a la microvascularización originada en los vasos periarteriales. Esta capacidad ha sido ya señalada por diferentes autores en patología humana (Koester, 1876; Paterson, 1936, 1938; Barger et al., 1984; Eisenstein, 1991; Zhang et al., 1993) y experimental (Díaz-Flores et al., 1990a).

En este orden de cosas, los autores que confieren un importante papel a la neovascularización consideran que a) aporta componentes del plasma al área lesional, (Koester, 1976; Le Compte, 1967; Graszek y Grundy, 1980; Zhang y cols., 1993); b) justifica las microhemorragias que se producen en las paredes arteriales portadoras de las placas de ateroma (Paterson, 1938; Barger y Beeuwkes, 1990) y c) contribuye por medio de nuevos elementos celulares al crecimiento del engrosamiento intimal (Díaz-Flores y Domínguez, 1985; Díaz-Flores y cols., 1990 a, 1991 b). Sin embargo, la mayor parte de las referencias existentes en la literatura, no sostienen, e incluso niegan la participación los vasos sanguíneos en la formación del engrosamiento intimal.

En efecto, la mayoría de los autores, que han centrado su atención en este problema, consideran que el origen de las células del EI ha de buscarse en los elementos musculares lisos de la capa media arterial. Se basa esta preponderante corriente científica en distintos hechos morfológicos. En concreto, los pilares sobre los que asienta la teoría más ampliamente difundida son: a) la morfología similar entre las células musculares lisas de la capa media arterial y las células propias del EI, b) la observación de CML migrando a través de pequeñas soluciones de continuidad presentes en la lámina elástica interna, c) la demostración de intensa captación de timidina tritiada por parte de las CML de la túnica media durante la génesis del engrosamiento, y d) la ausencia de microvasos en la hiperplasia intimal evolucionada.

No obstante, estos hechos evidentes son susceptibles de matizaciones muy relacionadas con la orientación de los cortes histológicos de las piezas, y con el estudio minucioso y secuencial en el transcurso del tiempo del EI, es

decir, desde las primeras horas tras la agresión de la arteria, hasta la constitución plena de dicho engrosamiento. Efectivamente, la mayor parte de los trabajos referentes al EI se han llevado a cabo estudiando cortes transversales de la arteria. Tal orientación conlleva, aparte de la necesidad de realizar muy numerosos cortes seriados, una gran dificultad en la localización de microvasos atravesando la pared vascular. Además, estos vasos, como su nombre indica, son de calibre mínimo y su luz es prácticamente virtual, por lo que es muy difícil distinguirlos con técnicas histológicas convencionales, requiriendo su observación cortes semifinos e incluso ultrafinos.

Estos hechos se obvian al emplear cortes longitudinales, pues se obtiene una visión panorámica de la pared arterial en sus dos vertientes, con la consiguiente visión de los microvasos en las diferentes capas arteriales. Es probable que esta simple decisión técnica, unido al modelo experimental empleado, haya permitido a nuestro grupo, distinguir la intensa penetración de yemas vasculares originadas desde vasos pericíticos en la pared arterial, que atraviesan las distintas capas parietales que incluso llegan a alcanzar la luz de la arteria, aprovechando finas soluciones de continuidad de la lámina elástica interna. Precisamente en tales ocasiones, se ha demostrado, al igual que ocurre en este trabajo, continuidad de las CE con las que revisten el engrosamiento intimal. Así mismo, se ha llamado la atención sobre el hecho de que elementos perivasculares que acompañaban a los vasos penetrantes se sumaban al EI, pudiendo posiblemente diferenciarse hacia células miointimales.

Evidentemente, la penetración de la pared arterial por vasos neoformados surgidos desde los adventiciales se entronca con los fenómenos

angiogénicos que acontecen en todo tejido lesionado. En efecto, la lesión de la cubierta endotelial, sea cual sea el mecanismo, condiciona la agregación plaquetaria y de elementos inflamatorios al subendotelio. Tales componentes sanguíneos, como es conocido y se ha citado en diferentes apartados del presente trabajo, condiciona la liberación de numerosos factores de crecimiento, entre los que destacan los plaquetarios y macrofágicos, que tienen una gran capacidad quimiotáctica, proliferativa y ,en concreto, angiogénica. No es así pues de extrañar que un hecho común a todas nuestras series haya sido la presencia de intensos fenómenos angiogénicos en las capas adventiciales y en la pared de la vena femoral adyacente.

Otro hecho que refuerza el concepto de la participación de los microvasos en la génesis del engrosamiento intimal ha sido que éste se ha producido con mayor rapidez en las distintas series en las que las cubiertas conectivas adventiciales fueron retiradas.

En cualquier caso, otros autores han reflejado en sus resultados la existencia de microvasos en la pared arterial, pero, al encontrarlos relativamente próximos a los puntos de ligadura, los han interpretados como artefactos. En otras palabras consideran que forman parte de los vasos procedentes del tejido de granulación desarrollado en torno a las ligaduras o motivados por la propia intervención quirúrgica. En cualquier caso, una de las razones por las que los autores no les confieren un papel determinante en la génesis del EI se debe a que en las fases últimas de remodelación, dichos vasos se encuentran ausentes . Ello es debido a nuestro entender a que, como ocurre en todo tejido de granulación, se produce involución de gran número de vasos neoformados cuando dicho tejido madura y se remodela. De hecho, en algunas imágenes afortunadas hemos podido

constatar restos de neovasos adoptando imágenes en huella dactilar, presentes en engrosamientos intimaes evolucionadas.

No debe olvidarse, por otra parte, que los modelos experimentales clásicamente utilizados han sido realizados empleando vasos circulantes. En concreto, uno de los más difundidos ha sido la inducción de lesión endotelial mediante balón-catéter. En tales modelos, no se ha podido evidenciar claramente la presencia de vasos sanguíneos penetrando desde la adventicia hacia la íntima. Ello probablemente sea debido a que la propia tensión de la pared, producida por la distensión del vaso, dificulta sensiblemente la penetración vascular. No obstante, ello no descarta que las células pericitarias de los microvasos activados en la capa adventicial puedan contribuir al EI. En efecto, es posible que dichos elementos pericitarios, puedan desprenderse del entorno vascular y migrar en dirección hacia la luz de la arteria.

De hecho, es conocido, desde las primeras descripciones de Rouget en el siglo XIX, que los pericitos o células perivasculares pueden ser considerados elementos celulares inmaduros, indiferenciados o con capacidad mesenquimal. En otras palabras, son células que, tras desprenderse de la pared venular o capilar, pueden transformarse en tipos celulares más diferenciados, tales como osteoblastos, condroblastos, etc.; en definitiva en células formadoras de fibras. Teniendo en cuenta esto y basándonos en experiencias propias, es posible presuponer que en las arterias circulantes expuestas al desarrollo de engrosamiento intimal, las células pericitarias desprendidas de los neocapilares, la capa muscular, la lámina elástica interna y mediante la acción de factores de diferenciación se transformen en células miointimaes.

Dentro de los principales factores que originan EI en el modelo de doble ligadura, se han propuesto varias teorías: 1) pérdida de la inervación perivascular, 2) hipoxia resultante ante la oclusión de los vasa vasora, 3) interrupción brusca del flujo arterial, 4) cambios en las células endoteliales, y 5) influjo de leucocitos, siendo el más aceptado la alteración de las células endoteliales, aunque probablemente pueden sumarse varias de estas posibilidades.

Meyer y colaboradores (1997), en el modelo menos agresivo de anillos de silicona, descartaron a la hipoxia debida a oclusión de la vasa vasorum, la inhibición de la actividad neuronal, el retorcimiento de la arteria y los cambios en el flujo de ésta, como principales inductores del EI. Aunque los resultados de este estudio y los nuestros no son directamente comparables entre sí, sí coincidimos en señalar al daño de la capa media y la obstaculización del flujo transmembrana como factores involucrados de manera importante en la aparición y desarrollo de EI.

En todas las series realizadas por nosotros se produjo como hecho constante la desendotelización precoz del fragmento arterial estudiado. Por lo tanto de forma estricta deberíamos habernos referido al EI como "engrosamiento neointimal" (ENI), aunque por su amplia utilización es mejor utilizar indistintamente el de EI.

De forma general nosotros consideramos tres fases en la formación del engrosamiento intimal: 1) replicación de las células musculares lisas en la capa media; 2) migración de CML a través de la lámina elástica interna para formar la neointima; 3) replicación de las células neointimales. A todo ello



hay que sumar la penetración microvascular y la remodelación posterior que ésta experimenta.

El primer hecho a destacar sobre la nueva íntima fue la observación de una mayor densidad de CE en la vertiente arterial adyacente a la vena. Esto se puede explicar por una mayor concentración de factores de crecimiento estimuladores del EI en este lado de la arteria. Este grado de asimetría también es observable al cuantificar el número de leucocitos y macrófagos.

Otro fenómeno observado precozmente es la apoptosis de CML, cuyo mecanismo intrínseco no se conoce por completo. Es sabido que citoquinas proinflamatorias pueden ejercer diferentes efectos sobre las CML. Por ejemplo, mientras que TFN e IL-1 estimulan el crecimiento de CML, IFN- $\alpha$  inhibe la proliferación de dichas células. Existe un sinergismo en la expresión de promotores para la transcripción de nuevos genes de estas sustancias. La producción excesiva de NO inducida por citoquinas podría tener un efecto deletéreo sobre las CML, aunque este último extremo no ha sido confirmado en CML humanas.

Una de las proteínas que ha sido implicada más recientemente en la apoptosis celular es la proteína Fas/apo-1, un antígeno de superficie (CD95) que pertenece a la superfamilia de los receptores de TNF. Las CML, al igual que los linfocitos activados y macrófagos, pueden también expresar niveles basales de Fas, aunque la expresión del ligando de este receptor no es suficiente para inducir la muerte celular de las CML en cultivo.

Otros elementos involucrados en los fenómenos de apoptosis son la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE), una cisteinproteasa presente en los

mamíferos, y los genes c-myc y p53. La ICE ha sido descrita como causante de apoptosis en células transfectadas con el cADN de dicha enzima, mientras que el p53 es un gen supresor de tumores relacionado con la apoptosis de células tumorales, y el protooncogen c-myc media tanto la proliferación como la muerte celular dependiendo de los niveles de expresión.

Estos procesos de apoptosis son de mayor importancia en el modelo de segmento arterial con ligadura distal y micropuncionado, en el que asistimos a la involución y hialinización del segmento arterial dispuesto entre la última colateral permeable y la ligadura, también denominado zona B.

## 5 CONCLUSIONES

1. Se confirma la capacidad de formación de EI en segmentos ocluidos, entre doble ligadura, de arteria femoral de la rata. Asimismo, en su histogénesis se pone de manifiesto que este proceso ocurre por modulación de tejido de granulación originado previamente en la luz arterial por crecimiento de yemas vasculares y células perivasculares que, a su vez, derivan de la microcirculación periarterial y de la pared de la vena femoral adyacente.

2. La respuesta angiogénica a partir de la vena femoral se intensifica de forma significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se retira previamente la adventicia de los segmentos arteriales ocluidos. Ello sugiere que los posibles factores de crecimiento producidos en la capa media arterial alcanzan más fácilmente la estructura diana, pared venosa adyacente, al no interponerse los componentes fibrosos de la capa adventicial. Por lo tanto, esta última, entre sus funciones, podría tener la de aislar, en cierta medida, la capa media arterial de las estructuras periarteriales.

3. En los segmentos arteriales ocluidos y con retirada de la adventicia, se produce un aumento marcado de la penetración de yemas vasculares a través de la capa media y membranas elásticas. En estas condiciones se anticipa en dos o tres días la formación del EI, observándose tejido de granulación intrarterial a los 4-5 días de iniciada la experiencia.

4. Cuando el segmento de arteria femoral conservando la adventicia es, además de ocluido entre doble ligadura, puncionado, hay una intensificación manifiesta de la respuesta angiogénica desde la vena femoral (significación estadística  $p < 0.05$ ). Este hecho se acompaña de una intensa penetración de yemas vasculares a través de las discontinuidades parietales en las zonas de punción de la arteria, alcanzándose por esta vía la luz arterial precozmente. Todo ello conlleva una anticipación de la formación del tejido de granulación intraarterial. Postulamos que dichas soluciones de continuidad en la pared arterial tendrían una repercusión similar a lo que ocurre cuando se retira la adventicia del segmento arterial ocluido.

5. En las series en las que la oclusión arterial se hace mediante ligadura única, se produce similar respuesta angiogénica en la pared venosa adyacente al segmento arterial ocluido que cuando la interrupción del flujo arterial se hace mediante doble ligadura. Ello indica que los factores estimuladores de la angiogénesis se liberan de forma homogénea en ambas series.

6. En la serie de doble ligadura los segmentos arteriales ocluidos muestran respuesta uniforme en todo su trayecto, mientras que en los de ligadura única dichos segmentos presentan dos zonas claramente diferenciables: una proximal, con formación de tejido de granulación y EI equiparable a la del segmento ocluido entre doble ligadura, y otra distal, en la que aparecen componentes sanguíneos residuales, con escasa proliferación vascular y celular. Postulamos que los posibles factores inhibitorios de la proliferación vascular y celular, producidos después de alcanzar esta última la luz arterial, podrían ser vehiculados distalmente por la presión sanguínea cuando los segmentos arteriales son ocluidos por ligadura única. Dichos factores antiangiogénicos e inhibidores de la proliferación celular, almacenados en la zona distal, podrían ser los responsables de la escasa respuesta proliferativa en la misma.

7. Las diferencias de la respuesta en el segmento arterial ocluido, según que la oclusión sea por doble o única ligadura se acentúan considerablemente en las series con micropunciones. Efectivamente, en la zona proximal de los segmentos puncionados y ocluidos por ligadura única, la respuesta conlleva un EI, similar al que ocurre en todo el trayecto de los segmentos puncionados y con doble ligadura. Por el contrario, en la zona distal evoluciona a una intensa atrofia y fragmentación de la pared arterial, con marcada fibrosis periarterial. Postulamos que los posibles factores inhibitorios producidos en áreas proximales del segmento arterial, después de alcanzar la proliferación vascular y celular la luz de la arteria, transportados hacia la zona distal, podrían pasar a las áreas periarteriales, a través de las micropunciones, determinando la respuesta fibrótica e involutiva.

8. En todas las series experimentales, la angiogénesis se incrementó entre los días 2 a 6, produciéndose una rápida involución microvascular inmediatamente después (significación estadística  $p < 0.05$ ). Ello puede ser debido al cese de los factores angiogénicos e incremento de los antiangiogénicos a partir del día sexto de iniciada la experiencia.

**9.** La densidad de los neocapilares formados a partir de la zona distal del segmento venoso en las series de ligadura única arterial es similar, en los 6 primeros días de iniciada la experiencia, que en las zonas proximales. En días posteriores se produce una rápida involución vascular en la zona distal, cuando el segmento arterial puncionado (con y sin adventicia). Lo previamente expuesto confirma que los factores antiangiogénicos e involutivos tienen su mayor expresión en nuestras experiencias a partir del sexto día.

**10.** Teniendo en cuenta las conclusiones previas, es evidente la existencia de un balance de factores angiogénicos y antiangiogénicos durante la formación del engrosamiento intimal arterial. Esto último se ve también influido en el desarrollo por la intensidad que alcanza la neovascularización periarterial, a la vez que por la mayor o menor facilidad de penetración de yemas vasculares a través de la pared de la arteria. Todo ello puede ser de interés en su desarrollo y comportamiento evolutivo de las lesiones precursoras de la placa aterosclerótica.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Adams DO y Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol* 2, 283-318.
2. Adams SO, Nissley SP, Handwerger S y Rechler MM (1983). Developmental patterns of insuline-like growth factor I and II synthesis and its regulation in rat fibroblasts. *Nature (Lond)*. 302, 150- 153.
3. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM (1995). Synergistic effect of vascular endothelial growth and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92 (Suppl II) II 365-II 371.
4. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB (1987). Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 6020-6024
5. Auerbach R (1981). Angiogenesis-inducing factors: a review. In: *Lymphokines, Vol IV*. Pick E (ED) Academic Press. New York Pp 69-88.
6. Auerbach R, Auerbach W y Polakowski I (1991). Assays for angiogenesis a review. *Pharmac Ther* 51, 1-11.
7. Auerbach R, Kubai L, Knighton D y Folkman J (1974). A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev. Biol* 41, 391-394.
8. Ausprunk DH y Folkman J (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*. 14, 53-65.



9. Ausprunk DH, Falterman K y Folkman J (1978). The sequence of events in the regression of corneal capillaries. *Lab Invest* 38, 284-294.
10. Bagavandoss P, Wilks JW (1990). Specific Inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 867-72.
11. Baird A. and Ling N. (1987). Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells in vitro: implications for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 428-435.
12. Banda MJ y Werb Z (1981). Mouse macrophage elastase: purification and characterization as a metalloproteínase. *Biochem J* 193, 589-605
13. Banda MJ, Herron GS, Murphy G y Werb Z (1987). Regulation of metalloproteínase activity by microvascular endothelial cells. In: *Angiogenesis. Mechanisms and pathophysiology.* Rifkin DB y Klagsbrun M (Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory. Pp. 101-109. New York.
14. Bar RS (1982). Interactions of insulin and insulin-like growth factors (IGF) with endothelial cells. *Ann N y Acad Sci*, 401, 150-62
15. Barger AC y Beeuwkes R (1990). Rupture of coronary vasa vasorum as trigger of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 66, 41g-43g.
16. Barger AC, Beeuwkes R, Lainey LL y Silverman KJ (1984). Hypothesis: Vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries: a possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 310, 175-177.
17. Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J y Vlodavsky I (1989). Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochem* 28, 1737-1743.
18. Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, (1990). TGF-beta 1 induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 63, 515-524.
19. Bell L y Madri JA (1989). Effect of platelet factors on migration of cultured bovine aortic endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 65, 1057-1065.

20. Bicknell R y Vallee BL (1988). Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. Proc Natl Acad Sci USA 85(16), 5961-5
21. Bicknell R y Vallee BL (1989). Angiogenin stimulates endothelial cell prostacyclin secretion by activation of phospholipase A2. Proc Natl Acad Sci USA 86(5) 1573-7
22. Bierman EL, Albers JJ (1975). Lipoprotein uptake by cultured human arterial smooth muscle cells. Biochim Biophys Acta 388, 198-202
23. Bini A, Fenoglio JJ Jr Mesa-Tejada R, Kudryk B y Kaplan KL (1989). Identification and distribution of fibrinogen, fibrin and fibrinogen degradation products in atherosclerosis: use of monoclonal antibodies. Arteriosclerosis 1, 109-21
24. Bishop DK, Jutila MA, Sedmak DD, Beattie MS y Orosz CG (1989). Lymphocyte entry into inflammatory tissues in vivo. qualitative differences of high endothelial venule-like vessels in sponge matrix allografts vs isografts. J Immun 142, 4219-4224.
25. Bishop DK, Sedmak DD, Leppink DM y Orosz CG (1990). Vascular endothelial differentiation in sponge matrix allografts. Hum Immun 28, 128-133.
26. Bjorkerud S, Bondjers G (1973). Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury: tissue response after induction of a larger superficial transverse injury. Atherosclerosis 18, 235-255.
27. Blood CH y Zetter BR (1990). Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. Biochem Biophys Acta 1032, 89-118.
28. Bobik A, Grooms A, Millar JA y cols. (1990). Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. Am J Physiol 258, C408-C415
29. Bornstein P y Sage H (1980). Structurally distinct collagen types. Annu Rev Biochem 49, 957-980.
30. Botiari D, Shepro D, Peterson S y Hechtman HB (1985). Serotonin, histamine, and norepinephrine mediation of endothelial and vascular muscle cell involvement. Am J Physiol 248, C252-C257.

31. Brem H y Folkman JH (1975). Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage J Exp Med 141, 427-438.
32. Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AMC, Gately S, Elkouby MP y Brien SE (1990). Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. Am J Pathol 137, 1121-1142.
33. Brown L, Detmar M, Claffey K, Nagy J, Feng D, Dvorak A y Dvorak H (1996). Vascular permeability factor /vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. In: Control of angiogenesis. Goldberg I, Rosen E, Cds. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland Pp 233-269.
34. Burgeson RE (1982). Genetic heterogeneity of collagens. J Invest Dermatol, 79(Suppl 1), 25.
35. Burgess WH y Maciag TA (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. Rev Biochem 58, 575-606.
36. Burke JN y Ross R (1979). Synthesis of connective tissue macromolecules by smooth muscle Int Rev Connect Tissue Res 8, 119.
37. Campbell GR y Chamley-Campbell JH (1981). The cellular pathobiology of atherosclerosis. Pathology 13, 423.
38. Cantor JO, Keller S, Parshley MS, Darnule TV, Cerreta JM, Turino GM y Mandl I (1980). Synthesis of crosslinked elastin by an endothelial cell culture. Biochem Biophys Res Commun 95, 1381.
39. Carmeliet P, Verreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W y Nagy A (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 380, 435-39.
40. Carnes WH, Abraham PA y Bounassi V (1979). Biosynthesis of elastin by an endothelial cell culture. Biochem Biophys Res Commun 90, 1393.

41. Caro CG, Parker KH, Fish PJ y Lever MJ (1985). Blood flow near the arterial wall and arterial disease. *Clin Hemor* 5, 849.
42. Cavallo T, Sade R, Folkman J y Cotran RS (1973). Ultrastructural autoradiographic studies of the early vasoproliferative response in tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 70, 345-362.
43. Cheah KS (1985). Collagen genes ad inherited connective tissue disease. *Biochem J* 229, 287-303.
44. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley B, Delfino JJ, Siegel RN, Leingruber RM y Feder J (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84, 1470-1478.
45. Cozzolino F, Torcia G, Ziche M, Ogawa S, Brett J, Koga S, Vlassara H, Nawroth P y Stern D (1990). Advanced glycosylation endproducts (AGES) stimulate endothelial cell growth in vitro and in vivo. *Circulation* 82, 36.
46. Crowley ST, Demosey EC, Horwitz KB y Horwitz LD (1994). Platelet-induced vascular smooth muscle cell proliferation is modulated by the growth amplification factors serotonin and adenosine diphosphate. *Circulation* 90, 1908-1918.
47. Culton M, Chandler DB, Proia AD, Hickingbotham D y Klintworth GK (1990). The effect of oxygen on corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 1277-1281.
48. D'Amato RJ, Lounghnan MS, Flynn E, y Folkman (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4082-4085.
49. D'Amore PA y Thompson RW (1987). Mechanisms of angiogenesis. *Ann Rev Physiol.* 49, 453-464.
50. Davidson JM, Crystal RG (1982). The molecular aspects of elastin gene expression. *J Invest Dermatol* 79 (Suppl 1), 133s-137s
51. Davies PF (1985). Current concepts of vascular endothelial and smooth muscle cell communication. *Surv Synth Pathol Res* 4, 357-373.
52. Davis MD (1988). Diabetic retinopathy: acinical overview. *Diabetes Metab Rev* 4, 291-322.

53. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC y Yancopoulos GD (1996). Isolation of angiotensin-1, a ligand for the Tie-2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87, 1161-9.
54. Díaz-Flores L y Domínguez C (1985). Relation between arterial intimal thickening and the vasa-vasorum. *Virchows Arch (A)* 406, 165-177.
55. Díaz-Flores L, Gutiérrez R y Varela H (1994a). Angiogenesis: An update *Histol Histopathol* 9, 807-843.
56. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, González P, y Varela H (1991a). Inducible perivascular cells contribute to the neochondrogenesis in grafted perichondrium. *Anat Rec* 229, 1-8.
57. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Valladares F, Varela H y Pérez M (1994b). Intense vascular sprouting from rat femoral vein induced by prostaglandins E1 and E2. *Anat Rec* 238, 68-76.
58. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela M, Rancel N y Valladares F (1991b). Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol* 6, 269-286.
59. Díaz-Flores L, Martín AI, García Montelongo R y Gutiérrez R (1990a). Role of pericytes and endothelial cells in tissue repair and related pathological processes. *J Cutan Pathol* 17, 191-192.
60. Díaz-Flores L, Valladares F, Gutiérrez R y Varela H (1990b). The role of the pericytes of the adventitial microcirculation in the arterial intimal thickening *Histol Histopathol*; 5, 145.
61. Díaz-Flores L, Gutiérrez R y Varela H (1996). Induction of neovascularization in vivo by glycerol. *Experientia* 52, 25-30.
62. Dicorleto PE y Zilversmit DB (1975). Lipoprotein lipase activity in bovine aorta. *Proc Soc Exp Biol Med* 148, 1101-1105.
63. Dilley RJ, McGeachie JK y Prendergast FJ (1987). A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Atherosclerosis* 63, 99.

64. Dobson DE, Castellot JJ Jr., Spiegelman BM (1985). Angiogenesis stimulated by 3T3-adipocytes is mediated by prostanoid lipids. *J Cell Biol* 101, 109A.
65. Dobson DE, Kambe A, Block E, Dion T, Lu H, Castellot Jr. JJ y Spiegelman BM (1990). 1-Butyrylglycerol: a novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes. *Cell* 61, 223-230.
66. Dvorak HE, Brown LF, Detmar M y Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146, 1029-39.
67. Dvorak HF, Dvorak AF, Manseau EJ, Wiberg L y Churchill WH (1979). Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 62, 1459-72.
68. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonach J y Dvorak AM (1987). Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 57, 673-686.
69. Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT y Dvorak AM (1988). Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 133, 95-109.
70. Edwards IJ y Wagner WD (1988). Distinct synthetic and structural characteristics of proteoglycans produced by cultured artery smooth muscle cells of atherosclerosis-susceptible pigeons. *J Biol Chem* 263(20)- 9612-(20).
71. Eisenstein R (1991). Angiogenesis in arteries: Review. *Pharmac Ther.* 49, 1-19.
72. Eppihimer MJ, Wolitzkv B, Anderson DC, Labow MA y Granger DN (1996). heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res* 79, 560-569.
73. Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Kleppe R, Gospodarowicz D, Bohlen P y Guillemin R (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor

(FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine acidic FGF. Proc Natl Acad Sci USA 82, 6507-6511.

74. Fajardo LF, Kowalski J, Kwan HH, Prionas SD y Allison AC (1988). The disc angiogenesis system. Lab Invest 58, 718-724.
75. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD y Allison AC (1992). Dual role of tumor necrosis factor alpha in angiogenesis. Am J Pathol 140, 539-544.
76. Feder J, Marasa JC y Olander JV (1983). The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro. J Cell Physiol 116, 1-6.
77. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ y Moore MW (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 380, 439-442.
78. Ferrara N y Henzel WJ (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161, 851-859.
79. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF y Vallee BL (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cell. Biochemistry 24, 5480-5486.
80. Findlay JK (1986). Angiogenesis in reproductive tissues. J Endocr 111, 357-366.
81. Flaherty JT, Pierce JE, Ferrans VJ, Patel DJ, Tucker WK y Fry DI (1972). Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. Circ Res 30, 23.
82. Fogelman AM, Berliner JA, Van Lenten BJ, Navab M y Territo M (1988). Lipoprotein receptors and endothelial cells. Semin Thromb Hemost 14(2), 206-9.
83. Folkman J (1971). Tumor angiogenesis. Therapeutic implications. New Engl J Med 285, 1182-1186.
84. Folkman J (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. Ann Surg 175, 409-416.

85. Folkman J (1975). Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43, 175-203.
86. Folkman J (1982). Angiogenesis, Initiation and control. *Ann NY Acad Sci* 401, 212-227.
87. Folkman J (1984). What is the role of endothelial cells in angiogenesis. *Lab Invest* 51, 601-602.
88. Folkman J (1985). In: Important advances in oncology. De Vita VT Jr, Hellman SA, Rosenberg SA (Eds.).
89. Folkman J (1985). Toward an understanding of angiogenesis search and discovery. *Pers Biol Med* 29, 10-36.
90. Folkman J (1985) Tumor Angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43, 175-203
91. Folkman J (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue *Cancer Res.* 46, 467-473.
92. Folkman J (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. *J Natl Cancer Inst* 82, 4-6.
93. Folkman J e Ingber DE (1987). Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action. *Ann Surg* 206, 374-383.
94. Folkman J (1989). Successful treatment of an angiogenic disease. *N Engl J Med* 4 320(18), 1211-2.
95. Folkman J y Haudenschild CC (1980). Angiogenesis in vitro. *Nature* 288, 551-556.
96. Folkman J y Klagsbrun M (1987). Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.
97. Folkman J y Shing Y (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931-10934.
98. Folkman J, Haudenschild CC y Zetter BR (1979). Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 5217-5221.
99. Folkman J, Merler E, Abernathy C y Williams G (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp. Med* 133, 275-288.



100. Folkman J, Weisz PB, Joullie MM, Li WM y Ewing WR (1989). Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. *Science* 243, 1490-1493.
101. Foster JA (1982) Elastin structure and biosynthesis: An overview. *Methods Enzymol* 82(Pta) 559-570.
102. Fournier GA, Luty GA, Watts., Fenselau A y Patz A (1981). A corneal micropocket assay for angiogenesis in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21, 351-354.
103. Frater-Schroeder M, Risau W, Hallmann, R, Gautschi P y Bohlen P (1987). Tumor necrosis factor type-alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 5277-5281.
104. Friedman M y Byers SO (1962). Excess lipid leakage: a property of very young vascular endothelium. *Br J Exp Pathol* 43, 363-372.
105. Fukuyama J, Ichikawa K, Miyazawa K, Hamano S, Shibata N y Ujiie A (1996). Tranilast suppresses intimal hyperplasia in the balloon injury model and cuff treatment model in rabbits. *Jpn J Pharmacol* 70, 321-327.
106. Furcht LT (1986). Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix and growth factors. *Lab Invest* 55, 505-509.
107. Furusato M, Fukunaga M, Kikuchi Y, Yokota S, Joh K, Aizawa S e Ishikawa E (1984). Two- and three dimensional ultrastructural observation of angiogenesis in juvenile hemangioma. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 46, 229-237.
108. Furusato M, Shimoda T, Yokota K, Joh K, Miyazaki H, Inomata I, Takaki K, Aizawa S e Ishikawa E (1985). Angiogenesis of juvenile hemangioma. In: *Microcirculation Annual* (1985). Tsuchiya M, Asano M y Mishima y (Eds.). Elsevier Amsterdam Pp 101-107.
109. Furusato M, Wakui S, Suzuki M, Takagi K, Hori M, Asari M, Kano Y y Ushigome S (1990). Three dimensional ultrastructural distribution of cytoplasmic interdigitation between endothelium and pericyte of capillary in human granulation tissue by serial section reconstruction method. *J Electron Microsc Tokyo* 39, 86-91.

110. Gerrity RG y Cliff WJ (1972). The aortic tunica intima in young and aging rats. *Exp. Mol Pathol* 16, 382-402.
111. Gimbrone MA Jr, Cotran RS y Folkman J (1973). Endothelial regeneration: studies with human endothelial cells in culture. *Ser Haematol* 6, 453-455.
112. Gimbrone MA Jr., Cotran RS, Leapman SB y Folkman J (1974). Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer* 52, 413-427.
113. Glagov S y Zarins CB (1989). Is intimal hyperplasia an adaptative response or a pathologic process? Observations on the nature of nonatherosclerotic intimal thickening. *J Vasc Surg* 10, 571.
114. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 333-337.
115. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad E, Le Beau MM, Leinons RS, Frazier WA y Bouck NP (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 6624-8.
116. Gospodarowicz D (1983). Growth factors and their action in vivo and in vitro. *J Pathol* 141, 201-233.
117. Gospodarowicz D y Cheng J (1986). Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 128, 475-484.
118. Gospodarowicz D, Cheng J, Liu GM, Fujii DK, Baird A y Bohlen P (1985). Fibroblast growth factor in human placenta. *Biochem Biophys Res Com* 128, 554-562.
119. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L y Neufeld G (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8, 95-114.

120. Goto F, Goto K, Weindel K y Folkman J (1993). Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gel. *Lab Invest* 69, 508-517.
121. Greenburg GB y Hunt TK (1978). The proliferative response in vitro of vascular endothelial and smooth muscle cells exposed to wound fluids and macrophages. *J Cell Physiol* 97, 353-360.
122. Gross JL, Moscatelli D y Rifkin DB (1983). Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 2623- 2627.
123. Groszek E, y Grundy SM (1980). The possible role of the arterial microcirculation in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Chronic Dis* 33 679-684.
124. Grotendorst GR, Seppä HE, Kleinman HK, Martin GR (1981). Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 3669-3672.
125. Gullino PM (1981). Angiogenesis factors. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Baserga R (ED). Springer-Verlag New York Pp 427.
126. Haar JL y Ackerman GA (1971). A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse *Anat Rec* 170, 199-224.
127. Hallahan TW, Shapiro R y Vallee BL (1991). Dual site model for the organogenic activity of angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 15, 2222-2226.
128. Hamet P, Hadrava V, Kruppa V y Tremblay J (1991). Transforming growth factor  $\alpha 1$  and effect in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 17, 896-901.
129. Hanson AN y Bentley JP (1983) Quantitation of type I to type III collagen ratios in small samples of human tendon, blood vessels, and atherosclerotic plaque. *Anal Biochem* 130, 32.

130. Haynes WL, Proia AD y Klintworth GK (1989). Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 1588-1593.
131. Hayward IP, Bridle KR, Campbell GR, Underwood PA, Campbell JH (1995). Effect of extracellular matrix proteins on vascular smooth muscle cells phenotype *Cell Biol Int* 19, 727-734.
132. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S y Thyberg J (1988). Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* 107, 307-319.
133. Hedin U, Bottger BA, Luthman J, Johansson S y Thyberg J (1989). A substrate of the cell attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser). is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype *Dev Biol* 133, 489-501.
134. Heimark RL y Schwartz SM (1988). The role of cell-cell interaction in the regulation of endothelial cell growth In: *The molecular and cellular biology and wound repair*. Clark RAF y Henson PH (Eds.). Plenum New York P 359.
135. Henkind P (1978). Ocular neovascularization. The Krill Memorial Lecture *Am J Ophthalmol* 85, 287-301.
136. Herbert JM, Laplace MC y Maffrand JP (1988). Effect of heparin on the angiogenic potency of basic and acidic fibroblast growth factors in the rabbit cornea assay. *Int. J Tissue React* X, 133-139.
137. Hollander W, Colombo MA, Kirkpatrick B y Paddock J (1979). Soluble proteins in the human atherosclerotic plaque with spectral reference to immunoglobulins, c3-complement component, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin. *Atherosclerosis* 34, 391-405.
138. Hosoda Y, Kawano K, Yamasawa F, Ishii T, Shibata T, Inayama S (1984). Age-dependent changes of collagen and elastin content in human aorta and pulmonary artery. *Angiology* 35, 615-621.

139. Hsieh DST, Langer R y Folkman J (1981). Magnetic modulation of release of macromolecules from polymers. *ProcNatl Acad Sci USA* 78, 1863-1867.
140. Hu DE y Fan TPD (1995). Suppression of VEGF-induced angiogenesis by the protein tyrosin kinase inhibitor, lavendustin A. *Br J Pharmacol* 114, 262-268.
141. Imai H, Connell CE, Lee KT, Kim DN y Thomas WA (1985). Differential counts by electron microscopy of cell types in normal intimal cell masses in swine abdominal aortas. *Exp Mol Pathol* 42, 377.
142. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H y Folkman J (1990) Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 348, 555-8.
143. Ingber DE y Folkman J (1988). Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism. *Lab Invest* 59, 44-51.
144. Ingber DE, Madri JA y Folkman J (1986). A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology* 119, 1768-1775.
145. Iruela-Arispe ML, Boriisteiri P y Sige H (1991) Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on tube formation by endothelial cells in vitro. *ProcNatl Acad Sci USA* 88, 5026-30.
146. Iruela-Arispe ML, Porter P, Bornstein P y Sage EH (1996) Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in interstitial cells. *J Clin Invest* 97 403-12.
147. Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, Usuki K, Takaku F, Risau W y Heldin CH (1989). Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338, 557-562.
148. Jaffe EA (1987). Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 18, 234
149. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG y Minick CR (1972). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 51, 46A.

150. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N y Alitalo K (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3). and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15, 290-298.
151. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G y Hansson G (1988). Regional accumulation of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6, 131.
152. Joris I y Majno G (1974). Cellular breakdown within the arterial wall: an ultrastructural study of the coronary artery in young and aging rats. *Virchows Arch [A]* 364, 111-127.
153. Kaminski M, Majewski S, Jablonska S, y Pawinska M (1984). Lowered angiogenic capability of peripheral blood lymphocytes in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Invest Derm* 82, 239-243.
154. Kamio A, Taguchi T, Shiraishi M, Shimatama K, Takebayashi S, Cleveland JC, Kummerov FA (1979). Mast cells in human aorta. *Paroi Arterielle* 5, 125-136.
155. Kato K, Tamai H, Hayakawa H, Yamaguchi T, Kan-Matsuse K, Haze K, Aizawa T, Suzuki S, Takase S, Suzuki T, Nishikawa H, Nakanishi S, Kato O y Nakashima M (1996). clinical evaluation of tranilast on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty, (PTCA). a double-blind placebo-controlled comparative study. *J Clin Ther Med* 12, 65-85.
156. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J y Connolly DT (1989). vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312.
157. Khoo JC, Mahoney Em y Witztum JL (1981). Secretion of lipoprotein lipase by macrophages in culture. *J Biol Chem* 256, 7105-7108.
158. Kim DN, Lee KT, Schmee J y Thomas WA (1984). Quantification of intimal cell masses ad atherosclerotic lesions in coronary arteries of control ad hyperlipidemic swine. *Atherosclerosis* 57, 115-122.

159. Kinsella MG y Wight TN (1988). Structural characterization of heparan sulfate proteoglycan subclasses isolated from bovine aortic endothelial cell cultures. *Biochemistry* 27, 2136.
160. Kizamuki A, Asada Y, Hateyama K, Hayasbi T y Sumiyoshi A (1992). Contribution of the endothelium to intimal thickening in normocholesterolemic and hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 12, 1198-1205
161. Klagsbrun M y D'amore PA (1991). Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 53, 217-239.
162. Klagsbrun M y Folkman J (1991). Angiogenesis. peptide growth factors and their receptors II. Sporn and Roberts (Eds.). Springer-Verlag New York Pp 549-586.
163. Klagsbrun M y Vlodavsky I (1988). Biosynthesis and storage of basic fibroblast growth factor (bFGF). by endothelial cells: implication for the mechanism of action of angiogenesis. In: *Growth factors and other aspects of wound healing: biological and clinical implications*. Riss AR Liss (ED). New York Pp 55-61.
164. Knighton DR, Scheuenstuhl H y Halliday B (1983). Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221, 1283-1285.
165. Kocher O y Gabbiani G (1986). Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. *Hum Pathol* 17, 875.
166. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T y cols. (1988). Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Febs Lett* 238, 249-252.
167. Kubota Y, Kleinman HK Martin GR y Lawley TJ (1982). Role of basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107, 1589-1598.
168. Kull FC Jr., Brent DA, Parikh I y Cuatrecasas P (1987). Chemical identification of a tumor-derived angiogenic factor. *Science* 236, 843-845.
169. Langer R y Folkman J (1976). Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263, 797-800.

170. Langer R, Brem H, Falterman K, Klein M, Folkman J (1976) Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science* 193, 70-2.
171. Lasser A (1983). The mononuclear phagocytic system: A review. *Human Pathol* 14, 108-126.
172. Lee KT, Lee KJ, Lee SK, Imai H y O'Neal RM (1970). Poorly differentiated subendothelial cells in swine aortas. *Exp Mol Pathol* 13, 118-129.
173. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV y Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.
174. Leung DY, Glagov S y Methews MB (1976). Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro. *Science* 191, 475.
175. Leung LLK, Li WX, Megregor JL, Albrecht G y Howard RJ (1992). Cd36 peptides enhance or inhibit cd36-thrombospondin binding. *J Biol Chem* 267, 18244-50.
176. Levesque MJ y Nerem RM (1985). The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear. *J Biomech Eng* 107, 341.
177. Libby P y Hansson GK (1991). Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 64(1) 5-15.
178. Lijnen HR y Collen D (1986). Stimulation by heparin with plasmin-mediated conversion of single-chain to two-chain urokinase-type plasminogen activator. *Thromb Res* 43, 687-690.
179. Ljungqvist A, Tornling G, Unge G, Juhrdahl EB y Larsson B (1984). Capillary growth in the heart and skeletal muscle during dipyridamole treatment and exercise. *Prog Appl Microcirc* 4, 9-15.
180. Low JD, House AK, y Norman PE (1996). Role of cimetidine in the prevention of intimal hyperplasia in rat carotid artery. *Br J Surg* 83, 72-74.
181. Luft JH (1976). The structure and properties of the cell surface coat. *Int. Rev Cytol.* 45, 291.



182. Maciag T (1984). Angiogenesis. *Prog Haemostat. Thromb* 7, 167- 182.
183. Maciag T, Kadish J Wilkins L, Stemerman MB y Weinstein R (1982). Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol* 94, 511-520.
184. Madri JA y Pratt BM (1986). Endothelial cell-matrix interactions: in vitro models of angiogenesis. *J Histochem Cytochem* 34, 85-91.
185. Madri JA y Pratt BM (1988). Angiogenesis. In: *The molecular and cellular biology of wound repair*. Clark RAF y Henson PM (Eds.). Plenum New York P 337
186. Madri JA y Stenn KS (1982). Aortic endothelial cell migration. I Matrix requirements and composition. *Am J Pathol* 106, 180-186.
187. Madri JA, Pratt B y Tucker A (1988). Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 106, 1375-1384.
188. Madri JA, Williams SK, Wyatt T, y Mezzio C (1983). Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol* 97, 153-165.
189. Madtes DK, Raines EW, Sakariassen KS, Assoian RK, Sporn MB, Bell GI y Ross R (1988). Induction and transforming growth factor- $\alpha$  in activated human alveolar macrophages. *Cell* 53, 285-293.
190. Maglione D, Guerriero Y, Viglietto G, Dell-Bovi P y Persico MG (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9267-71.
191. Mainardi CL, Seyer JM y Kang AH (1980). Type-specific collagenolysis: a type V collagen-degrading enzyme from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 97, 1108-1115.
192. Majewski S, Tigalnowa M, Jablonska S, Polakowski I y Janczura E (1987). Serum samples from patients with active psoriasis enhance lymphocyte-induced angiogenesis and modulate endothelial cell proliferation. *Arch Derm* 123, 221-225.

193. Manderson JA, Mosse PR, Safstrom JA, Young SB, Campbell GR (1989). Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. Changes in smooth muscle phenotype. *Arteriosclerosis* 9(3) 289-98.
194. Martin BM, Gimbrone MA Jr, Unanue ER y Cotran RS (1981). Stimulation of nonlymphoid mesenchymal cell proliferation by a macrophage-derived growth factor. *J Immunol* 126, 1510-1515.
195. Masferrer JL, Rimarachin JA, Gerritsen ME, Falck JR, Yadagiri P, Dunn MW y Laniado SM (1991). Hydroxyeicosatrienoic acid, a potent chemotactic and angiogenic factor produced by the cornea. *Exp Eye Res* 52, 417-424.
196. Mc Cracken JS, Burger PC y Klintworth GK (1979). Morphologic observations on experimental corneal vascularization in the rat. *Lab Invest* 41, 519-530.
197. Mckinney RV y Panner BJ (1972). Regenerating capillary basement membrane in skeletal muscle wounds. *Lab Invest* 26, 100- 113.
198. Milan N, Umemura, K, Kondo. K y Nakashima, M, (1997). Effects Pemirolast and Tranilast on intimal thickening after arterial injury in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 157-162.
199. Miller EJ y Gay S (1982). Collagen: An overview. *Methods Enzymol* 82(Pt A) 3-32.
200. Miyazono K, Okabe T, Urabe A, Takaku F y Heldin CH (1987). Purification and properties of an endothelial cell mitogen from human platelets. *J Biol Chem.* 262, 4098-4103.
201. Montesano R y Orci L (1985). Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis "in vitro". *Cell* 42, 469-477.
202. Montesano R, Orci L y Vassalli P (1983). In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol* 97, 1648-1652.
203. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R y Orci L (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 7297-7301.

204. Morton LF y Barnes MJ (1982). Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall: investigation of collagen types I, III and V. *Atherosclerosis* 42, 41.
205. Moscatelli D, Gross JL y Rifkin DB (1981). Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 91, 201A (Abstr.).
206. Moscatelli D, Presta M y Rifkin DB (1986). Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, dna synthesis, and migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 2091-2095.
207. Murata K, Motayama T y Kotake C (1986). Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*. 60, 251.
208. Murray JB, Brown L, Langer R y Klagsbrun M (1983). A microsustained release system for epidermal growth factor. *In Vitro*. 19, 743-748.
209. Muthukkaruppan V y Auerbach R (1979). Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* 205, 1416-1418.
210. Nguyen M, Folkman J Bischoff J (1992). 1-Deoxymannojirimycin inhibits capillary tube formation in vitro. Analysis of n-linked oligosaccharides in bovine capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 267, 26157-26165.
211. Nicosia RF y Ottinetti A (1990). Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta a quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 63, 115-122.
212. Nicosia, R.F., Villaschi, S. (1995). Rat Aortic Smooth Muscle Cells Become Pericytes During Angiogenesis In Vitro. *Lab. Invest* 73, 658.
213. Nikkai ST, Järveläinen HT, Wight TN, Ferguson M y Clowes AW (1994). Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol* 144, 1348-1356.
214. Norrby K, Jakobsson A y Sorbo J (1990a). Quantitative angiogenesis in spreads of intact rat mesenteric windows. *Microvasc Res* 39, 341-348.

215. Norrby K, Jakobsson A y Sorbo J (1990b). On mast-cell mediated angiogenesis in the rat mesenteric window assay. *Agents Actions*. 30,231-233.
216. Norrby K,, Jakobsson A y Sorbo J (1986). Mast-cell-mediated angiogenesis : a novel experimental model using the rat mesentery. *Virchows Arch (B)* 52, 195-206.
217. Obeso JL y Auerbach R (1984). A new microtechnique for quantitating cell movement in vitro using polystyrene bead monolayers. *J Immunol Meth* 70, 141-152.
218. Oikawa T, Suganuma M, Ashino-Fuse H y Shimamura M (1992). Okadaic acid is a potent angiogenesis inductor. *Jpn. J Cancer Res* 83, 6-9.
219. Okamura K, Sato Y, Matsuda T, Hamanaka R, Ono M, Kohno K y Kuwano M (1991). Endogenous basic fibroblast growth factor-dependent induction of collagenase y interleukin-6 in tumor necrosis factor-treated human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 266, 19162-19165.
220. Oisawa LL, Kaiiai M, Noike H, Uchi T, Yoshinuiia M, Mincoka K, Hitsuinoto T, Tomioka H, Fujii T, Siono N, Sliztjki N, Tokuliiro K, (1995). Effects of pemirolast potassium en prevention of iingigraphic estenosis after percutaneous trañisluminal coroiary angiopiasty. *Jpn Circ J* 59, 390-391.
221. Olivo M, Bhardwaj R, Schulze-Osthoff K, Sorg C, Jacob HJ y Flamme I (1992). A comparative study on the effects of tumor necrosis factor alpha (tnff-alpha), human angiogenic factor (h-af)and basic fibroblast growth factor (bfgf) on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Anat Rec* 234, 105-115.
222. Ooshima A (1981). Collagen alpha B chain: Increased proportion in human Atherosclerosis. *Science* 213, 666.
223. Ordlidge A y D'amore PA (1988). Endothelial cell-pericyte co- cultures produce activated tgf-beta inhibits endothelial growth. *Arvo Abstracts Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, (Suppl.) 109-119.

224. O'Reilly MS, Boehni T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E y Birkhead JR, Olsen BR y Folkman J (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis y tumor growth. *Cell* 88, 277-285.
225. O'Reilly MS, Hoimgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Meses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH y Folkman J (1994). Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-28.
226. Orledge A y D'amore PA (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes y smooth muscle cells. *J Cell Biol* 105, 1455-1462.
227. Palade GE (1987). The microvascular endothelium revisited, In Simionescu N, Simionescu M (Eds). *Endothelial Cell Biology*. New York Plenum Publishing Corp, Pp 3-22.
228. Passaniti AP, Taylor AM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS y Martin GR (1992). A simple, quantitative method for assesing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 67, 519-528.
229. Paweletz N y Knierim M (1989). Tumor-related angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 9, 197-242.
230. Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L y Vassalli JD (1990). Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 111, 743-755.
231. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1992). Potent synergism between vascular endotelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 902-906.
232. Pepper MS, Spray DC, Chanson M, Montesano R, Orci L y Meda P (1989). Junctional communication is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 109, 3027-3038.
233. Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R y Orci L (1987). Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105, 2535-2541.

234. Pflieger H y Goertler K (1970). Konstrktionsprinzipien der Aortenwand im Ursprungsbereich der interkostalen, intestinalen und renalen Aortenäste. Arch Kreislaufforsch 62, 223.
235. Plunkett ML y Hailey JA (1990). An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. Lab Invest 62, 510-517.
236. Polverini PJ, Cotran RS y Sholley MM (1977a). Endothelial proliferation in the delayed hypersensitivity reaction: An autoradiographic study. J Immunol 118, 529.
237. Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. y Unanue ER (1977b). Activated macrophages induce vascular proliferation. Nature 269, 804-806.
238. Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J y Rifkin DB (1986). Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, dna synthesis, and migration. Mol Cell Biol 6, 4060-4066.
239. Proia AD, Chandler DB, Haynes WL, Smith CF, Suvarnamani C, Erkel FH y Klintworth GK (1988). Quantitation of corneal neovascularization using computerized image analysis. Lab Invest 58, 473-479.
240. Raju KS, Alessandri G y Gullino PM (1984). Characterization of a chemoattractant for endothelium induced by angiogenesis effectors. Cancer Res 44, 1579-1584.
241. Rastineja F, Polverini PJ y Bolick NP (1989). Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. Cell 56, 345-55.
242. Register TC y Wagner WD (1990). Heterogeneity in glycosilation of dermatan sulfate proteoglycan core proteins isolated from human aorta. Connect Tissue Res 25, 35-48.
243. Rhine W, Hsieh DST y Langer R (1980). Polymers for sustained macromolecule release: procedures to fabricate reproducible delivery systems and control release kinetics. J Pharm Sci 69, 265-270.

244. Richardson M, Hatton MW y Moore S (1988). Proteoglycan distribution in the intima ad media of the aortas of young ad aging rabbits: An ultrastructural study. *Atherosclerosis* 71, 243-256.
245. Richardson RL, Hausman GJ y Campion DR (1982). Response of pericytes to thermal lesion in the inguinal fat pad of 10 day rats. *Acta Anat* 114, 41.
246. Rifkin DB, y Moscatelli B (1989). Recents development in cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell. Biol* 109, 1.
247. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NJ, Wakefield LM, Heine UI, Liotta IA, Falanga V, Kehrl JH y Fauci AS (1986). Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4167- 4171.
248. Robertson NE, Discapani CM, Downs EC, Hailey JA, Sarre O, Runkle RL Jr., Popper TL y Plunkett ML (1991). A quantitative in vivo mouse model used to assay inhibitors of tumor-induced angiogenesis. *Cancer Res* 51, 1339-1344.
249. Robinson RW, Likar IN y Likar NJ (1978). Mast cells in normal, aged ad diseased arteries. *Monogr Stheroscler* 8, 73-114.
250. Rosenbruch M (1989). Granulation tissue in the chick embryo yolk sac blood vessel system. *J Comp Path* 101, 363-373.
251. Rucker RB y Tinker D (1977). Structure ad metabolism of arterial elastin. *Int Rev Exp Pathol* 17, 1-47.
252. Ryan US (ED) (1988). Endothelial cells. Crc Press Boca Raton. Los Angeles.
253. Sage H, Crouch E y Bornstein P (1979). Collagen synthesis by bovine aortic endothelial cells in culture. *Biochemistry* 18, 5433.
254. Sage H, Pritzl P y Bornstein P (1981). Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: comparison of aortic, venous, capillary and corneal endothelium. *Arteriosclerosis* 1, 427.
255. Sandberg LB (1976). Elastin structure in health and disease. *Int Rev Connect Tissue Res* 7, 159-210.

256. Sankey EA, Bown FE, Morton LF, Scott DM y Barnes MJ (1981). Analysis of the collagen types synthesized by bovine corneal endothelial cells in culture. *Biochem J* 198, 707.
257. Sato N Sawasaki Y, Senoo A, Fuse Y, Hirano Y y Goto T (1987). Development of capillary networks from rat microvascular fragments in vitro: The role of myofibroblastic cells. *Microvasc Res* 33, 194-210.
258. Sato N, Beitz JG, Kato J, Yamamoto M, Clark JW, Calabresi P y Frackelton AR Jr. (1993). Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 142, 1119-1130.
259. Sato Y y Rifkin DB (1988). Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and dna synthesis. *J Cell Biol* 107, 1199-1205.
260. Sato Y y Rifkin DB (1989). Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-b1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 109, 309-315.
261. Saunders NA y Grant ME (1985). The secretion of tropoelastin by chick-embryo artery cells. *Biochem J* 230, 217-225
262. Schor AM y Schor SL (1983). Tumour Angiogenesis. *Br J Pathol* 141, 385-413.
263. Schreiber AB, Winkler ME y Derynck R (1986). Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic factor than epidermal growth factor. *Science* 232, 1250-1253.
264. Schwartz SM y Benditt EP (1972). Studies on aortic intima: I Structure ad permeability of rat thoracic aortic intima. *Am J Pathol* 66, 241-264.
265. Schwartz SM, Gajdusek CM y Owens GK (1982). Vessel wall growth control. in: pathobiology of the endothelial cells. Nossel HL y Vogel HJ (Eds.) Academic Press Inc New York Pp 63-78.



266. Schweigerer L, Malerstein B y Gospodarowicz D (1987). Tumor necrosis factor inhibits the proliferation of cultured capillary endothelial cells. *Biophys. Res Comm* 143, 997-1004.
267. Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC y Gospodarowicz D (1987). Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325, 257-9.
268. Seiger DR, Perruzzi CA, Feder J y Dvorak HF (1986). A Highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 46, 5629-32.
269. Senger D, Van De Water L, Brown L, Nagy J, Yeo K-T, Yeo T-K, Berse B, Jackman R, Dvorak A y Dvorak H (1993). Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12, 303-24.
270. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Idelson GL, Koteliansky VE y Rukosuev VS (1987). Relative Distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis* 67, 9-16.
271. Shepro D (1988). Endothelial cells, inflammatory edema, and the microvascular barrier: comments by a "free radical". *Microvasc Res* 35, 247-264.
272. Shing Y, Folkman J, Haudenschild C, Lund D, Crum R y Klagsbrun M (1985). Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *J Cell Biochem* 29, 275-287.
273. Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, Montuor JL y Wilson JD (1984). Mechanisms of neovascularization. vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest* 51, 624-634.
274. Simionescu N y Simionescu M (1988). (Eds.) *Endothelial cell biology in health and disease* Plenum Press. New York.
275. Simionescu N y Simionescu M (1991). *Endothelial cell dysfunction*. Plenum Press. New York.

276. Simionescu N, Heltianu C, Antohe F y Simionescu M (1982). Endothelial cell receptors for histamine. *Ann NY Acad Sci* 401, 132-49.
277. Simionescu N, Simiomescu M y Palade GE (1981). Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium: I Preferencial distribution of anionic sites. *J Cell Biol* 90, 605-613.
278. Sjölund M, Hedin U, Sejersen T, Heldin CH y Thyberg J (1988). Arterial smooth muscle cells express platelet-derived growth factor (PDGF) a chain mRNA, secrete a PDGF-like mitogen, and bind exogenous PDGF in a phenotype- and growth state-dependent manner. *J Cell Biol* 106, 403-413.
279. Smith EB (1974). The relationship between plasma ad tissue lipids in human atherosclerosis. *Adv Lipid Res* 12, 1-49.
280. Smith EB y Slater RS (1972). Relationship between low-density lipoprotein in aortic intima and serum-lipid levels. *Lancet* 748, 463-9.
281. Smith EB y Staples EM (1982). Intimal and medial plasma protein concentrations and endothelial function. *Atherosclerosis* 41 (2-3), 295-308.
282. Smith EB, Alexander KM y Massie IB (1976). Insoluble "fibrin" in human aortic intima quantitative studies on the relationship between insoluble "fibrin", soluble fibrinogen and low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 23, 19-39.
283. Snider R, Faris B, Verbitzki V, Moscaritolo R, Salcedo LL y Franzblau C (1981). Elastin biosynthesis ad cross-link formation in rabbit aortic smooth muscle cell cultures. *Biochemistry* 20, 2614-2618.
284. Soma M, Corsini A y Paoletti R (1992). Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicol Lett* 64-65, 1-15.
285. Sorgente N, Kuettner KE, Soble LW y Eisenstein R (1975). The resistance of certain tissues to invasion. Evidence for extractable factors in cartilage which inhibit invasion by vascularized mesenchyme. *Lab Invest* 32, 217-222.

286. Sottiurai VS, Kollros P, Glagov S, Zarins CK y Mathews MB (1983). Morphologic alteration of cultured arterial smooth muscle cells by cyclic stretching. *J Surg Res* 35(6) 490-7.
287. Spring PM y Hoff HE (1989). LDL accumulation in the grossly normal human iliac bifurcation and common iliac arteries. *Exp. Mol. Pathol* 51, 179-185.
288. Stary HC (1974). Proliferation of arterial cells in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 43, 59-81.
289. Stary HC (1977). Arterial cell injury and cell death in hypercholesterolemia and after reduction of high serum cholesterol levels. *Prog Biochem Pharmacol* 13, 241-247.
290. Stary HC (1987). Macrophages, macrophage foam cells, ad eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis* 64, 91-108.
291. Stary HC (1990). The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J* 11 (Suppl. E), 3.
292. Stary HC y Malinow MR (1982). Ultrastructure of experimental coronary artery arterosclerosis in cynomolgus macaques: a comparison with the lesions of other primates. *Atherosclerosis* 43, 151-175.
293. Stary HC y Mcmillan GC (1970). Kinetics of cellular proliferation in experimental atherosclerosis: radioautography with grain counts in cholesterol-fed rabbits. *Arch Pathol* 89, 173.
294. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Richardson M, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD y Wissler R (1992). A definition of human arteries of its atherosclerosis-prone regions. *Circulation* 85, 391-405.
295. Stastny J, Fossielien y Robertson AL Jr. (1986). Human aortic intima protein composition during initial stages of atherogenesis. *Atherosclerosis* 60, 131.
296. Stehbens WE y Ludatscher RM (1973). Ultrastructure of the renal arterial bifurcation of rabbits. *Exp Mol. Pathol* 18, 50.

297. Stemerman MB y Ross R (1972). Experimental arteriosclerosis. Fibrous plaque formation in primates, an electron microscope study. *J Exp Med* 136, 769-789.
298. Stender S y Zilversmit DB (1981). Transfer of plasma lipoprotein components and of plasma proteins into aortas of cholesterol-fed-rabbits: molecular size as a determinant of plasma lipoprotein influence *Arteriosclerosis* 1, 38-49.
299. Stokes CL, Rupnick MA, Williams SK y Laffenburger DA (1990). Chemotaxis of human microvessel endothelial cells in response to acidic fibroblast growth factor. *Lab Invest* 63, 657- 668.
300. Strasser T (1980). Primary prevention: the role of the world health organization. In: Lauer Rm, Shekelle Rb (Eds). *Childhood prevention of atherosclerosis and hypertension*. Raven Press, New York Pp 473-476.
301. Sueishi K, Yasunaga C, Nakashima Y, Tsutsui H e Ishii Y (1989) Endothelium-fibrinolysis system interaction. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 52(8), 1350-8.
302. Suri C, Jones P, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davies S, Sato TN y Yancopoulos GD (1996) Requisite role of angiopoietin 1, a ligand for the tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171-80.
303. Szalay J y Pappas GD (1970). Fine structure of rat corneal vessels in advanced stages of wound healing. *Invest Ophthalmol* 9, 354-365.
304. Takigawa M, Enomoto M, Nishida Y, Pan HO, Kinoshita A y Suzuki F (1990). Tumor angiogenesis and polyamines: difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits b16 melanoma-induced angiogenesis in ovo and the proliferation of vascular endothelial cells in vitro. *Cancer Res.* 50, 4134-4138.
305. Takigawa M, Nishida Y, Suzuki F, Kishi J, Yamashita K y Hayakawa T (1990). Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2) *Biochem Biophys Res Commun* 171, 1264-1271.

306. Tanaka K Honda, M, Kuramochi, T y Morioka, S (1994). Prominent inhibitory effects of tranilast in migration and proliferation of collagen synthesis by vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 107, 179-185.
307. Tano Y, Chandler DB y Machener R (1981). Vascular casts of experimental retinal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 92, 110-118.
308. Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA y Giavazzi R (1990). Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 111, 765-772.
309. Taylor S y Folkman J (1982). Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297, 307-312.
310. The TREAT Study Investigators (1994). The impact of tranilast on restenosis following coronary angioplasty: The tranilast restenosis following angioplasty trial (TREAT). *Circulation* 90, 1-652.
311. Thomas K, Rios Candelore M, GimenezGallego G, Di Salvo J, Bennet C, Rodkey J y Fitzpatrick S (1985). Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 6409-6413.
312. Thorgeirsson G y Robertson AL Jr (1978). The vascular endothelium-pathobiologic significance. *Am J Pathol* 93, 804-848
313. Toselli P, Salcedo LL, Oliver P y Franzblau C (1981). Formation of elastic fibers and elastin in rabbit aortic smooth muscle cell cultures. *Connect Tissue Res* 8, 231-239
314. Tseung S, Savion N, Stern R y Gospodarowicz D (1982). Fibroblast growth factor modulates synthesis of collagen in cultured vascular endothelial cells. *Eur J Biochem* 122, 355-362.
315. Tsuboi R, Sato Y y Rifkin DB (1990). Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteínase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J Cell Biol* 110, 511-517.

316. Velican C y Velican D (1977). Studies on human coronary arteries. I: Branch pads or cushions. *Acta Anat* 99, 377.
317. Velican C y Velican D (1980). The precursors of coronary atherosclerotic plaques in subjects up to 40 years old. *Atherosclerosis* 37, 33.
318. Vesela D, Vesely y Jelinek R (1994). Embriotoxicity in chick embryo of thalidomid hydrolysis products following metabolic activation by rat liver homogenate. *Funct Dev Morphol* 4, 313-316
319. Vlodayvsky I y Gospodarowicz D (1979). Structural and functional alterations in the surface of vascular endothelial cells associated with the formation of a confluent cell monolayer and with the withdrawal of fibroblast growth factor. *J Supramol. Struct.* 12 (Suppl. 1), 73-114.
320. Völker W, Schmidt A y Buddecke E (1987). Mapping of proteoglycans in human arterial tissue. *Eur J Cell Biol* 45, 72-79.
321. Wagner DD y Marder J (1984). Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J Cell-Biol* 99(6) 2123-30.
322. Wang-Iverson P y Brown WV (1982). Interaction of lipoprotein lipase with cultured endothelial cells. *Ann NY Acad Sci* 401, 92-101.
323. Warren BA (1979a). The vascular morphology of tumors. In: *Tumor blood circulation*. Peterson HI (ED) Crc Press Boca Raton. Pp 1- 47.
324. Warren BA (1979b). Tumor angiogenesis. In: *Angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors*. Peterson HI (ED) Crc Press Boca Raton.
325. Warren BA, Greenblatt M y Kommineni VRC (1972). Tumor angiogenesis: ultrastructure of endothelial cells in mitosis. *Br J Exp Pathol* 53, 216-224.
326. Watt SL y Auerbach R (1986). A mitogenic factor for endothelial cells obtained from mouse secondary mixed leukocyte cultures. *J Immunol.* 136, 197-202.

327. Weidner N, Semple JP, Welch WR y Folkman J (1991). Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl J Med* 324, 1-8.
328. Weinstein DB, Carew TE y Steinberg D (1976). Uptake and degradation of low density lipoprotein by swine arterial smooth muscle cells with inhibition of cholesterol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 424, 404-421.
329. Werb Z (1983). How the macrophage regulates its extracellular environment. *Am J Anat* 166, 237-256.
330. Werb Z y Chin JR (1983). Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycollate-elicited macrophages but not by pyran copolymer or bacillus calmette-guerin-activated macrophages. *J Exp Med* 158, 1272-1293.
331. Werb Z y Gordon S (1975a). Elastase secretion by stimulated macrophages: characterisation and regulation. *J Exp Med* 142, 361-377.
332. Werb Z y Gordon S (1975b). Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J Exp Med* 142, 346-360.
333. West D.C., Hampson I.N., Arnold F. and Kumar S. (1985). Angiogenesis Induced By Degradation Products of Hyaluronic Acid. *Science* 228, 1324-1326.
334. Wight TN y Hascall VC (1983) Proteoglycans in primate arteries. III Characterization of the proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in culture. *J Cell Biol* 96(1) 167-76.
335. Wight TN y Ross R (1975). Proteoglycans in primate arteries. I Ultrastructural localization and distribution in the intima. *J Cell Biol* 67, 660-674.
336. Williams RJ, Robertson D y Davies AJ (1989). Identification of vascular endothelial cells in murine omentum using the lectin, dolichos biflorus agglutinin: possible applications in the study of angiogenesis. *Histochem. J* 21, 271-278.
337. Williams S (1993). Angiogenesis in three-dimensional cultures. *Lab Invest* 69, 491-493.

338. Winkles JA, Friesel R, Burgess WH, Howk R, Mehlman T, Weinstein R y Moeiag T (1987). Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding growth factor 1 (Endothelial Cell Growth Factor). *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7124-7128.
339. Yamagami I (1970). Electronmicroscopic study on the cornea I The mechanism of experimental new vessel formation. *Jpn J Ophthalmol* 14, 41-58.
340. Yang EY y Moses HL (1990). Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 111, 731-41.
341. Ylä-Herttuala S, Sumuvuori H, Karkola K, Möttönen M y Nikkari T (1986). Glycosaminoglycans in normal and atherosclerotic human coronary arteries. *Lab Invest* 54, 402.
342. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai, Mabon RF y Glagov S (1983). Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res* 53, 502.
343. Zetter BR (1988). Angiogenesis. state of the art. *Chest* 93, 159s- 166s.
344. Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI y Higgins G (1993). Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 143, 164-172.
345. Ziada AMAR, Hudlická O, Tyler KR y Wright AJA (1984). The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res* 18, 724-732.
346. Ziche M, Alessandri G y Gullino PM (1989). Gangliosides promote the angiogenic response. *Lab Invest* 61, 629-634.
347. Ziche M, Jones J y Gullino PM (1982). Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 69, 475-482.
348. Ziche M, Morbidelli L, Alessandri G y Gullino PM (1992). Angiogenesis can be stimulated or repressed in vivo by a change in gm3:gd3 ganglioside ratio. *Lab Invest* 67, 711-715.



349. Ziche M, Ruggiero M, Pasquali F y Chiarugi VP (1985). Effects of cortisone with and without heparin on angiogenesis induced by prostaglandin E1 and by S180 cells, and on growth of murine transplantable tumours. *Int. J Cancer* 35, 549-552.