

# REMODELACIÓN VASCULAR POR ENZIMAS PROTEOLÍTICOS Y FACTORES VASOACTIVOS EN MODELOS DE PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

---

TESIS DOCTORAL, BEGOÑA LAVIN PLAZA, 2013

---

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS



Universidad de Alcalá

UNIVERSIDAD  DE ALCALÁ



*TESIS DOCTORAL*

**REMODELACIÓN VASCULAR POR ENZIMAS PROTEOLÍTICOS  
Y FACTORES VASOACTIVOS EN MODELOS DE PATOLOGÍA  
CARDIOVASCULAR**

**Begoña Lavin Plaza**

Alcalá de Henares, Junio 2013





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



**cnic**

El abajo firmante, **Dr. Carlos Zaragoza Sánchez**, jefe del grupo de “Remodelación de la pared vascular y enfermedad cardiovascular” del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

**CERTIFICA,**

Que la Memoria presentada por **Dña. Begoña Lavin Plaza**, con el título **“REMODELACIÓN VASCULAR POR ENZIMAS PROTEOLÍTICOS Y FACTORES VASOACTIVOS EN MODELOS DE PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR”** ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Epidemiología, Aterotrombosis e Imagen del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), y a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Y para que conste, firma el presente certificado.

Madrid, Junio de 2013

Fdo. Carlos Zaragoza Sánchez





DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS

FACULTAD DE  
MEDICINA Y CIENCIAS  
DE LA SALUD  
Campus Universitario  
28871 Alcalá de Henares (Madrid)  
Teléfonos: 91 885 45 13/48 86 Fax:  
91 885 45 85  
[Depto.biosistemas@uah.es](mailto:Depto.biosistemas@uah.es)

El **Dr. Antonio Jiménez Ruiz**, Director del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá,

**CERTIFICA,**

Que **Dña. Begoña Lavin Plaza**, Licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado en el Departamento de Epidemiología, Aterotrombosis e Imagen del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) bajo la dirección del **Dr. Carlos Zaragoza Sánchez** el trabajo experimental recogido en la presente Memoria y titulado “**REMODELACIÓN VASCULAR POR ENZIMAS PROTEOLÍTICOS Y FACTORES VASOACTIVOS EN MODELOS DE PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR**” y a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Alcalá de Henares, Junio de 2013

Fdo. Antonio Jiménez Ruiz



*A mi familia*



*Antes de comenzar, quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido o influido a lo largo de todo este tiempo a conseguir que mi tesis doctoral se hiciera posible.*

*En primer lugar, quisiera dar las gracias a mi director de tesis, Carlos Zaragoza, la posibilidad de realizar la tesis doctoral en un sitio tan impresionante como el CNIC y por haber confiado en mi para poder llevar a cabo este trabajo. Por supuesto quiero agradecerle la oportunidad que me has dado de trabajar con gente tan increíble y con tanta experiencia, de los que he aprendido prácticamente todo lo que sé en investigación.*

*Antes de empezar con la gente que ha trabajado conmigo en el laboratorio, quiero remontarme al principio de los tiempos...cuando todavía estaba en 5º de Biología y ya tenía claro que quería hacer la tesis. Ana, muchísimas gracias por estar siempre ahí, ayudándome a buscar con quien hacer la tesis (todavía me acuerdo del personaje de la pipa que me hacía preguntas sobre el Greco...), dándome recomendaciones para las presentaciones, corregirme cosas de la tesis y sobre todo por ayudarme a crecer como persona, diciéndome siempre claramente las cosas y sin rodeos y enseñándome aspectos tan fundamentales en el trabajo como son la disciplina, la seriedad y el esfuerzo.*

*A mis compañeros de laboratorio, gracias y mil veces gracias por haberme enseñado tantísimas cosas y ser siempre tan buenos conmigo. Tarín, tu me diste mi primer protocolo (como aislar DNA de cola de ratón), y confiaste en mi algunos de tus experimentos cuando sabías que todavía estaba muy "verde" y que podía fallar. Quiero agradecerle no sólo tu confianza en mi, sino todo lo que me has enseñado en el tiempo que compartimos juntos. Después llegó Bea...esa persona que para orientarse miraba al sol, y trajo la alegría al laboratorio, aunque los primeros días con el jet-lag se nos quedara dormida por todas partes. De ti aprendí muchísimas cosas (entre otras a pronunciar aorta en inglés...jeje). Muchas gracias por ayudarme en todas las presentaciones, por saber aportarme ese puntito de paciencia y tranquilidad del que normalmente carezco y por ayudarme tanto con mis experimentos cuando no sabía cómo seguir. Espero que pronto encuentres algo que realmente te guste y motive, porque creo que eres una persona muy trabajadora y que todo lo que haces siempre es con tu mayor empeño y esfuerzo y es algo que no todo el mundo tiene. Sabes que te deseo todo lo mejor y sobre todo que aproveches al máximo tu nueva etapa de mamá. A lo largo estos casi cinco años siempre ha estado ahí Moni. Muchas gracias por haberme ayudado tantísimo con las mil y una técnicas y operaciones. Tenerte en el laboratorio ha sido una de las mejores cosas que me llevo, ya no sólo a nivel de trabajo, donde creo que no debe haber mucha gente que te supere, sino también a nivel personal.*

No quiero olvidarme de algunas de las personas que han pasado por el laboratorio y que por supuesto han dejado su huella. Del que primero me acuerdo es de ese médico de Alicante que vino sin saber ni pipetear y en dos meses sabía hacer de todo y además nos dió a conocer al increíble Akinator!! En ti creo que todos pudimos ver lo importante que es querer aprender cosas nuevas y que con esfuerzo todo es posible. Cómo ya sabes, padawan, de ti no me llevo un compañero de trabajo, me llevo un gran amigo y quiero agradecerte no sólo toda tu ayuda en la parte experimental, sino en apoyarme tanto en la parte de la escritura y por supuesto por esa frase tan buena que queda de maravilla en esta tesis, jeje. Yvonne, tu fuiste otro ejemplo de esfuerzo. Tenerte en el laboratorio durante 6 meses fue increíble porque no sólo aprendiste cosas nuevas, sino que también me enseñaste cosas a mí, fue un verdadero placer trabajar contigo y estoy segura que serás una enfermera magnífica. Fernando, coincidimos, a pena un mes, pero en ti aprendí que frente a la adversidad no hay otra solución que ser fuerte y mirar hacia delante. Te deseo todo el éxito como médico. Hace poco más de un año llegó al laboratorio Jos y con ella, la experiencia, la entrega y la motivación. Aunque yo me marché y no hemos podido coincidir mucho en la parte experimental, quiero agradecerte el darme ese primer repaso a la introducción y toda tu ayuda. Ojalá pronto podamos celebrar el artículo que sé que a ti también te vendrá genial para tu trabajo. Por último quiero acordarme de Mari Carmen e Irene, las últimas en llegar, que aunque coincidimos poquito siempre es un placer trabajar y hablar con vosotras.

Quiero agradecer a toda la gente del Departamento de Epidemiología Aterotrombosis e Imagen del CNIC la ayuda y el cariño que siempre me ha mostrado. En este punto quiero recalcar la ayuda de Vinatha. Gracias por el café de ese día y toda tu ayuda sobre todo con el inglés. Eeva, por estar siempre ahí ayudándome a rellenar los documentos, buscarnos viajes, alojamientos, la verdad es que no sé qué hubiera hecho sin tu ayuda. Gracias por tu disposición siempre. Alba, eres simplemente genial. Siempre es una alegría tener gente como tu cerca, ya que aportas felicidad e ilusión. Muchas gracias por ayudarme con algunos de los experimentos. Te deseo toda la suerte del mundo en tu nueva aventura en Munich, aunque estoy segura que vas a sacar una tesis perfecta. Inés y Vir, muchas gracias por cuidarme mis animalitos y Vir por cuidar a nuestro subnormalito (q pena cuando nos dejó...). Sé que con vosotras a veces he sido exigente pero ya sabéis que adoro a mis ratoncitos y siempre en medida de lo posible he intentado que estuvieran bien. Quiero disculpas si alguna vez he sido demasiado pesada. Javi, muchas gracias por tu ayuda sobre todo para resolverme mis duda de moles y gramos y por tener ese punto de fanfarrón que alegra la vida del laboratorio. Bueno y aunque al resto de compañeros no os nombre (no quiero dejarme a nadie) quiero daros las gracias a los que todavía estáis y a los que ya se marcharon y desearos toda la suerte del mundo.

*Quiero dedicar un párrafo a la persona que más me ha ayudado a lo largo de mi tesis. Óscar, quiero agradecerte (bueno de esto no estoy segura) que me hayas enseñado el complejísimo mundo de los macrófagos donde cada uno se polariza a donde quiere (¿dentro de unos años cuantos M2 habrá?). Gracias por mandarme los PowerPoint explicándome los posibles próximos experimentos, por ayudarme a entender los resultados, por enseñarme técnicas nuevas, por el apoyo moral, tus consejos, por todo. Creo que sin ti todo habría sido mucho más complicado y habría muchas cosas que no hubiera aprendido. Te deseo que en tu nueva etapa londinense tengas toda la suerte del mundo y que sigas siendo tan motivado de la ciencia como hasta ahora. Sinceramente creo que gente como tú es la que deseas encontrar cuando llegas a un sitio nuevo, gente agradable, comprometida con su trabajo y sobre todo ver como disfruta con lo que hace. Muchas gracias.*

*Y cuando parecía que el final empezaba a estar cerca llegó Londres y con ello la revolución. Este apartado voy a escribir (o al menos intentarlo) en inglés, ya que mucha de la gente con la que tuve la suerte de trabajar no habla español. London has been the most amazing experience of my life. The beginning was complicated, since I didn't understand anybody. But I did meet fantastic people there. First of all, I want to say thanks to René, because you have been an example of sacrifice and a source of motivation to me. Thanks for giving me the opportunity to work in your fantastic lab filled with amazing people. You were always available when we needed help or when we celebrated a great result. I am grateful to you for your patience with my English and I'm sorry if I couldn't understand some parts of our conversations. Siloia! my mum in London. What would I have done without you? Thanks for everything; for your time, the translations, your help with the experiments, for those amazing ten days in London when you knew I felt sad, for the coffee time (I miss this time in Spain...), for sending me the tube schedule every week, etc...I wish you good luck in all your endeavors in life, because you are this kind of person that is complicated to find and I have been very lucky to meet you. Alk!...the first and the only person that I have met from Cyprus... hmmm... are you ready to throw flowers in my thesis? Remember that is very typical in Spain, as Silvia told you, xaxaxa. I know that I was your worst nightmare asking you like a baby all the time: why is this?... why do we do this?... why do we need this?... Thank for all your help, for your patience and for taking me to all the cool places in London. I think that you are another example of motivation and I sure that you are going to succeed in everything that you do because you are really hard working and above all, an amazing person. Andy, Andy, Andy...what can I say about you? You are one of the craziest people that I have ever met in my life, xaxaxa. Thanks for teaching me new words in English, for the Vespa trips, for your super-interesting conversations and for your help and advice with my experiments and my personal life. It has been a pleasure to meet people like you,*

*who seem happy all the time. Thanks for the ping-pong, the coffee time and for organizing the dinners, drinks and skype sessions. Silvia, Alk and Andy thanks to you all for the amazing time in London and I hope to see you soon!*

*Fuera del laboratorio, no puedo olvidarme del comité de sabios y los grandes y siempre interesantísimos debates que tenemos, sobre todo intentado arreglar el mundo. Gracias por esas cervezas en Guada y Alcalá y por los magníficos viajes que hemos compartido. Muchas gracias a todos vosotros por apoyarme en los buenos y malos momentos. Con amigos como vosotros me siento la persona más afortunada del mundo. Quiero hacer una mención especial a Txomin, mi amigo desde pequeños. Si todo va bien, eres el próximo en leer tu tesis y como ya sabes tus carabidos han creado expectación. ¡Mucho ánimo y a por ella! Si lo ves necesario, te podemos pintar una bandera de Japón y cantar “se masca la tragedia” cuando vayas a entrar a leer para que te sientas como en todos los exámenes que hemos hecho juntos, jeje. No quiero olvidarme del petit comité, chicos una palabra os define a los cuatro: FANTÁSTICOS (esto parece sacado de Marvel, ¿verdad Rafa?)*

*Por otro lado, y no por ello menos importantes, dedico esta tesis a mis chicas, por esos grandísimos momentos que hemos pasado, lo bien que lo hemos pasado siempre juntas. No puedo olvidarme de los increíbles viajes a Salou, Segovia, Zaragoza,... donde lo hemos pasado siempre genial y que espero que se repitan muchos más. Muchas gracias por el apoyo en todo momento y en este caso Lucys muchas gracias por esa portada tan bonita que me has hecho! Chicas muchas gracias por todos esos buenos momentos que han hecho que me sienta tan afortunada de teneros cerca, aunque a veces sea un poco desastre en las quedadas...jeje.*

*A las personas más importantes de mi vida, mis padres. Vosotros siempre habéis estado al pie del cañón, apoyándome en todas mis decisiones y siempre dispuestos a darlo todo. El día de la tesis, como en la graduación de la carrera, sé que os vais a sentir muy felices, pero quiero que sepáis que esto habría sido totalmente imposible sin vosotros. No puedo olvidarme de Félix, eres una persona muy especial en mi vida y aunque a veces me das mucha guerra y me enfado mucho contigo, sabes que te quiero muchísimo y siempre busco lo mejor para ti. Al resto de mi familia: primos y tíos por apoyarme y ayudarme siempre que ha sido posible, muchas gracias.*

*Para terminar, quiero dedicar esta memoria a la persona que más he querido en mi vida y que siempre tengo presente en todo lo que hago. Basi, por todos esos buenos y malos momentos que hemos vivido, y por ser la primera persona que me dijo una de las mayores verdades acerca de mi trabajo (“hija tantos años estudiando para andar entre ratones”) Si el día de la lectura voy a echar a alguien especialmente de menos, esa vas a ser tu.*

**GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

<b>Arg</b>	<u>A</u> rginase
<b>ATP</b>	<u>A</u> denosine 5'- <u>t</u> riphosphate
<b>BH4</b>	Tetra <u>h</u> idro <u>b</u> iopterin
<b>BMDM</b>	<u>B</u> one <u>M</u> arrow <u>d</u> erived <u>M</u> acrophages
<b>BSA</b>	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<u>C</u> alcio
<b>Ca-CaM</b>	<u>C</u> alcium <u>C</u> almodulin Complex
<b>CAD</b>	<u>C</u> oronary <u>a</u> rtery <u>d</u> isease
<b>CaM</b>	<u>C</u> almodulin
<b>cAMP</b>	<u>C</u> yclic <u>A</u> denosine <u>M</u> onophosphate
<b>cCMP</b>	<u>C</u> yclic <u>C</u> ytidine <u>M</u> onophosphate
<b>CD11</b>	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation <u>11</u>
<b>CD31</b>	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation <u>31</u>
<b>CD44</b>	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation <u>44</u>
<b>CD68</b>	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation <u>68</u>
<b>cDNA</b>	<u>C</u> omplementary <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
<b>CFSE</b>	<u>C</u> arboxyfluorescein Diacetate <u>S</u> uccinimidyl <u>E</u> ster
<b>cGMP</b>	<u>C</u> yclic <u>G</u> uanosine <u>M</u> onophosphate
<b>Cy3</b>	<u>C</u> yanine <u>3</u>

## *Abreviaturas*

---

<b>DAB</b>	3'- <u>D</u> iamino <u>b</u> enzidine
<b>DE</b>	<u>D</u> elayed <u>e</u> nhancement
<b>DETA-NO</b>	<u>D</u> iethylen <u>e</u> triamine- <u>N</u> itric <u>O</u> xide
<b>DNA</b>	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
<b>EB</b>	<u>E</u> vans <u>B</u> lue
<b>EBM-2</b>	<u>E</u> ndothelial <u>B</u> asal <u>M</u> edium - <u>2</u>
<b>ECM</b>	<u>E</u> xtracelular <u>M</u> atrix
<b>EDRF</b>	<u>E</u> ndothelial <u>D</u> erived <u>R</u> elaxing <u>F</u> actor
<b>EGF</b>	<u>E</u> pidermal growth <u>f</u> actor
<b>eNOS</b>	<u>E</u> ndotelial <u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase
<b>EPC</b>	<u>E</u> ndothelial <u>P</u> rogenitor <u>C</u> ell
<b>ERK1/2</b>	<u>E</u> xtracellular <u>s</u> ignal <u>r</u> egulated <u>k</u> inases <u>1/2</u>
<b>ET-1</b>	<u>E</u> ndothelin- <u>1</u>
<b>ET<sub>B</sub></b>	<u>E</u> ndothelin <u>r</u> eceptor type <u>B</u>
<b>FAD</b>	<u>F</u> lavin <u>A</u> denine <u>D</u> inucleotide
<b>FBS</b>	<u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum
<b>FGF-2</b>	<u>F</u> ibroblast growth <u>f</u> actor- <u>2</u>
<b>FITC</b>	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocyana <u>t</u> e
<b>Flk-1</b>	<u>F</u> etal <u>L</u> iver <u>K</u> inase <u>1</u>
<b>FMN</b>	<u>F</u> lavin <u>M</u> ono <u>n</u> ucleotide
<b>FOV</b>	<u>F</u> ield <u>o</u> f <u>v</u> iew

<b>GAPDH</b>	<u>G</u> lyc <u>e</u> ral <u>d</u> ehyde 3-phosphate <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase
<b>GM-CSF</b>	<u>G</u> ranulocyte <u>M</u> acrophage <u>C</u> olony- <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
<b>GMP</b>	<u>G</u> uanosine <u>M</u> onophosphate
<b>Gy</b>	<u>G</u> ray
<b>h</b>	<u>H</u> ora
<b>H-E</b>	<u>H</u> ematoxilina- <u>E</u> osina
<b>i.p.</b>	<u>I</u> ntraperitoneal
<b>i.v.</b>	<u>I</u> ntravenoso
<b>ICAM-2</b>	<u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule- <u>2</u>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<u>I</u> nter <u>f</u> eron <u>G</u> amma
<b>IGF</b>	<u>I</u> nsulin-like growth <u>f</u> actor
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>1</u> $\beta$
<b>IL-4</b>	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>4</u>
<b>IL-5</b>	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin- <u>5</u>
<b>IL-6</b>	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin- <u>6</u>
<b>IL-10</b>	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>10</u>
<b>IL-13</b>	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>13</u>
<b>iNOS</b>	<u>I</u> nducible <u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase
<b>IR</b>	<u>I</u> nversión/ <u>R</u> ecuperación
<b>kg</b>	<u>K</u> ilogramo
<b>KO</b>	<u>K</u> nock <u>o</u> t, deficientes

## *Abreviaturas*

---

<b>LDL</b>	<u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein
<b>Lin</b>	<u>L</u> ineage
<b>L-NAME</b>	<u>L</u> - <u>N</u> itro <u>a</u> rginine <u>M</u> ethyl <u>E</u> ster
<b>LPS</b>	<u>L</u> ipopolysaccharide
<b>LSK</b>	<u>L</u> in <sup>-</sup> <u>S</u> ca1 <sup>+</sup> <u>kit</u> <sup>+</sup>
<b>m</b>	<u>M</u> etro
<b>M</b>	<u>M</u> olar
<b>M1</b>	<u>M</u> acrophage type <u>1</u>
<b>M2</b>	<u>M</u> acrophage type <u>2</u>
<b>MAEC</b>	<u>M</u> ouse <u>A</u> ortic <u>E</u> ndothelial <u>C</u> ell
<b>MAPK</b>	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inases
<b>MCP-1</b>	<u>M</u> onocyte chemotactic protein- <u>1</u>
<b>M-CSF</b>	<u>M</u> acrophage <u>C</u> olony- <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
<b>µg</b>	<u>M</u> icrogramo
<b>mg</b>	<u>M</u> iligramo
<b>µm</b>	<u>M</u> icrometro
<b>min</b>	<u>M</u> inuto
<b>mi-RNA</b>	<u>M</u> icro <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
<b>mL</b>	<u>M</u> ililitros
<b>mm</b>	<u>M</u> ilimetro
<b>mM</b>	<u>M</u> ili <u>M</u> olar

<b>mmHg</b>	<u>M</u> ilim <u>e</u> tros de <u>m</u> ercurio
<b>mmol</b>	<u>M</u> ilimol
<b>MMP</b>	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase
<b>MMP-1</b>	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase-1
<b>MMP-2</b>	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase-2
<b>MMP-9</b>	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase-9
<b>MMP-11</b>	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase-11
<b>MMP-13</b>	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase-13
<b>MMP-23</b>	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase-23
<b>mRNA</b>	<u>M</u> essenger <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
<b>ms</b>	<u>M</u> ilise <u>g</u> undo
<b>mT</b>	<u>M</u> ilitesla
<b>MT-MMP</b>	<u>M</u> embrane-type <u>m</u> atrix <u>m</u> etalloproteinases
<b>NADP</b>	<u>N</u> icotinamide <u>A</u> denine <u>D</u> inucleotide <u>P</u> hosphate
<b>NADPH</b>	<u>N</u> icotinamide <u>A</u> denine <u>D</u> inucleotide <u>P</u> hosphate-oxidase
<b>NAP110</b>	<u>N</u> OS2- <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein <u>110</u> kD
<b>NF-κB</b>	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor <u>κ</u> <u>B</u>
<b>ng</b>	<u>N</u> anogramos
<b>NK</b>	<u>N</u> atural <u>K</u> iller
<b>nm</b>	<u>N</u> anó <u>m</u> etros
<b>nNOS</b>	<u>N</u> euronal <u>N</u> itric Oxide <u>S</u> ynthase

## *Abreviaturas*

---

<b>NO</b>	<u>N</u> itric <u>O</u> xide
<b>NOS</b>	<u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase
<b>NOS1</b>	<u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase <u>1</u>
<b>NOS2</b>	<u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase <u>2</u>
<b>NOS3</b>	<u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase <u>3</u>
<b>NSF</b>	<u>N</u> -Ethilmaleimide-sensitive <u>f</u> actor
<b>°C</b>	Grado <u>C</u> elsius
<b>p</b>	<u>P</u> robabilidad
<b>PBS</b>	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
<b>PCR</b>	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
<b>PECAM-1</b>	<u>P</u> latelet <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule- <u>1</u>
<b>PE-Cy7</b>	<u>P</u> hycoerythrin- <u>Cy7</u>
<b>PKA</b>	<u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>A</u>
<b>PKC</b>	<u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>C</u>
<b>PKG</b>	<u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>G</u>
<b>qPCR</b>	<u>Q</u> uantitative <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
<b>r<sub>1</sub></b>	<u>R</u> elaxividad longitudinal
<b>R<sub>1</sub></b>	Tasa de <u>r</u> elajación
<b>RMN</b>	<u>R</u> esonancia <u>M</u> agnética <u>N</u> uclear
<b>RNS</b>	<u>R</u> eactive <u>N</u> itrogen <u>S</u> pecies
<b>ROS</b>	<u>R</u> eactive <u>o</u> xxygen <u>s</u> pecies

<b>RPMI</b>	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute medium
<b>s</b>	<u>S</u> egundos
<b>Sca-1</b>	<u>S</u> tem <u>c</u> ell <u>a</u> ntigen- <u>1</u>
<b>SD</b>	<u>S</u> tandard <u>d</u> eviation
<b>sGC</b>	<u>S</u> oluble <u>G</u> uanylate <u>C</u> yclase
<b>SMC</b>	<u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ells
<b>SNAP</b>	<u>S</u> - <u>N</u> itroso- <u>N</u> - <u>a</u> cetylpenicillamine
<b>SNP</b>	<u>S</u> odium <u>N</u> itroprusside
<b>STAT</b>	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransduction and <u>A</u> ctivation of <u>T</u> ranscription
<b>STAT-1<math>\alpha</math></b>	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransduction and <u>A</u> ctivation of <u>T</u> ranscription <u>1a</u>
<b>T<sub>1</sub></b>	<u>T</u> iempo de relajación longitudinal
<b>TE</b>	<u>T</u> iempo de <u>E</u> co
<b>TEM</b>	<u>T</u> ransmission <u>e</u> lectron <u>m</u> icroscopy
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>b</u> eta
<b>Th1</b>	<u>T</u> helper type <u>1</u>
<b>Th2</b>	<u>T</u> helper type <u>2</u>
<b>TI</b>	<u>T</u> iempo de <u>i</u> nversión
<b>TIMP</b>	<u>T</u> issue <u>I</u> nhibitor of <u>M</u> etalloproteinases
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>a</u> lpha
<b>TR</b>	<u>T</u> iempo de <u>r</u> epetición
<b>UTR</b>	<u>U</u> ntranslated <u>R</u> egions

## *Abreviaturas*

---

<b>VE</b>	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial
<b>VEGF</b>	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
<b>VEGF-1</b>	<u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- <u>1</u>
<b>VEGFR2</b>	<u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor <u>2</u>
<b>VSMC</b>	<u>V</u> ascular <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ell
<b>WT</b>	<u>W</u> ild <u>T</u> ype, salvajes
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<u>Z</u> inc
<b>ZO-1</b>	<u>Z</u> onula <u>O</u> ccludens- <u>1</u>
<b>ZO-2</b>	<u>Z</u> onula <u>O</u> ccludens- <u>2</u>

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>HIPÓTESIS</b> .....	9
<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. Remodelación de la pared vascular .....	18
2. Endotelio vascular .....	21
3. La disfunción endotelial y la permeabilidad vascular .....	23
4. El Óxido Nítrico en el sistema cardiovascular .....	31
4.1. Producción de NO: Las Óxido Nítrico Sintetas .....	32
4.1.1. Regulación de las isoformas de la NOS .....	33
4.2. Funciones del NO .....	36
5. La matriz extracelular .....	40
5.1. Metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) .....	42
5.1.1. Estructura de las MMPs .....	43
5.1.2. Clasificación de las MMPs .....	44

5.1.3. Regulación de las MMPs .....	47
6. El sistema inmunitario en la enfermedad cardiovascular .....	49
6.1. Los macrófagos en el desarrollo de la enfermedad vascular .....	50
6.1.1. Polarización de los macrófagos .....	51

## **MATERIALES Y MÉTODOS** ..... 57

### **RESULTADOS**

1. La pérdida de NOS3 promueve la formación de neoíntima .....	79
2. La pérdida de NOS3 dificulta la recuperación de la capa endotelial .....	81
3. El trasplante de médula ayuda en la recuperación del vaso dañado .....	83
4. El fenotipo de los macrófagos se ve afectado en ausencia de NOS3 después del protocolo de denudado endotelial .....	87
5. La pérdida de NOS3 induce la repolarización de macrófagos reparadores M2 hacia el fenotipo de macrófagos inflamatorios M1 .....	89
6. Los macrófagos estimulan la migración de las células endoteliales que expresan NOS3 .....	95
7. La generación de un ambiente inflamatorio estimula la proliferación y migración de las VSMC .....	97
8. El NO dirige la expresión y actividad de MMP-13 en la regeneración vascular y la hiperplasia .....	98

9. La captación de gadofosveset se correlaciona con la permeabilidad vascular generada después del protocolo de denudado endotelial en la aorta abdominal .....	108
<b>DISCUSIÓN</b> .....	121
<b>CONCLUSIONES</b> .....	137
<b>CONCLUSIONS</b> .....	139





La hiperplasia de la neoíntima, es un efecto no deseado que surge ante diversas circunstancias como resultado de la disrupción de la cubierta endotelial de las arterias, incluyendo los procedimientos quirúrgicos encaminados a la restauración del diámetro de la luz de los vasos sanguíneos ocluidos. Como consecuencia de este procedimiento, normalmente se produce de forma mecánica el denudado del endotelio, por lo que el estudio de la génesis y monitorización de estos pacientes después del protocolo quirúrgico son cruciales para aportarles el tratamiento más adecuado y conseguir mejorar su calidad de vida.

En modelos murinos, la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3) ha sido relacionada con una mejor reendotelización y un significativo descenso en la formación de neoíntima, pero todavía existen lagunas sobre los mecanismos que dirigen este fenómeno. Mediante el uso de un modelo de denudado aórtico en ratón, nosotros hallamos una re-endotelización más lenta y una mayor formación de neoíntima en los animales que carecen de NOS3. Se ha relacionado el crecimiento anormal de la neoíntima con una respuesta inflamatoria descontrolada. A este respecto, constatamos que la ausencia de NOS3 tiene como consecuencia una respuesta inmune frente al denudado endotelial diferente, promoviendo la infiltración y acumulación de macrófagos pro-inflamatorios (M1) frente a los resolutivos (M2) de forma sostenida en el tiempo. Además de este efecto, revelamos que en el ambiente creado en ausencia de óxido nítrico procedente del endotelio, los macrófagos M2, sufren, en gran medida, un proceso de repolarización hacia el estado M1, contribuyendo de esta forma al desequilibrio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria. Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, hemos podido detectar en ausencia de NOS3 elevados niveles de las citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias IL-5, IL-6, GM-CSF, MCP1, IFN $\gamma$  y VEGF, lo que explica la repolarización de los macrófagos M2 hacia el fenotipo M1, al ser moléculas directamente implicadas en el reclutamiento y polarización celular hacia

## ***Resumen***

---

el estado pro-inflamatorio. Este ambiente pro-inflamatorio generado contribuye a una mayor proliferación de las células musculares lisas vasculares (VSMC) y a la activación de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) como MMP-13, que favorecen significativamente la migración de las VSMC, contribuyendo al desarrollo de hiperplasia de la neoíntima en el vaso dañado. De hecho proponemos a MMP-13 como una de las dianas de NOS3 en el proceso, al observar que en su ausencia, el efecto deletéreo de la falta de NO endotelial se revierte hacia el fenotipo de los animales que si expresan este enzima. Por último y teniendo en cuenta que la monitorización de los pacientes es clave en su tratamiento y recuperación, aportamos un procedimiento de detección no invasiva mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), evaluando el efecto de una agente de contraste como herramienta para la detección y cuantificación de la regeneración del endotelio dañado.

En resumen podemos concluir que la presente tesis doctoral ha contribuido de forma significativa a aclarar a nivel molecular los mecanismos por los que el NO interviene de forma decisiva en la prevención de la hiperplasia de la neoíntima. Asimismo, hemos establecido un protocolo de seguimiento de la evolución del vaso dañado después del procedimiento quirúrgico mediante imagen molecular no invasiva por RMN.

Vascular neointimal hyperplasia is a significant clinical problem. It happens under certain circumstances, including those surgical procedures involved in the re-opening of occluded arteries by mechanical stress. Therefore, investigation towards the onset, progression, and monitoring of endothelial regeneration, and prevention of neointima formation, is crucial to provide adequate treatments and to improve life quality in this set of patients.

By using animal models of endothelial denudation, we and others found that NOS3 inhibits neointima formation, and prompts a better endothelial recovery, although the precise mechanisms elicited by NO are poorly understood. In NOS3 null mice, we found extensive neointima formation, and a significant delay of endothelial recovery. These mice also exhibited sustained inflammation, showing a significant accumulation of pro-inflammatory M1 macrophages overtime. Likewise, we also found that in the absence of NOS3, resolving M2 macrophages repolarized into M1 pro-inflammatory cells, thereby preserving a sustained pro-inflammatory environment long after the procedure. In order to shed light about the mechanisms elicited by NO, we detected high levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines IL-5, IL-6, GM-CSF, MCP1, IFN $\gamma$  and VEGF, involved in macrophage recruitment and polarization to M1 phenotype in the absence of NOS3. This pro-inflammatory environment contributed to increase the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and to induce the expression and activation of several matrix metalloproteinases, including MMP-13. We propose MMP-13 as one key target of NOS3 during this process, since lack of MMP-13 does not have any effect on neointima formation, but the neointimal layer of double NOS3/MMP-13 mice was reverted to the phenotype exhibited by NOS3 expressing animals.

## *Abstract*

---

Finally, and having the relevance of monitoring vascular regeneration in patients, and that non invasively methods have been yet provided, we developed a non invasive molecular imaging MRI procedure with a specific contrast agent to track endothelial regeneration, providing with a brand new tool for future interventions in humans.

This doctoral thesis contributes to shed light about the molecular mechanisms by which Nitric Oxide prevents neointimal hyperplasia, and provides with new technical procedures for non invasively follow-up the evolution of endothelial regeneration in damaged vessels by means of molecular Magnetic Resonance Imaging.

Tras un proceso de daño endotelial, como el que ocurre tras una angioplastia o un trasplante de tejidos, la rápida y correcta reparación de la capa íntima es crucial para restaurar la correcta funcionabilidad del vaso y evitar de esta forma la aparición de eventos patológicos asociados como la aterosclerosis o los aneurismas. En estos procesos la correcta movilización del endotelio al punto de reparación es de vital importancia y se encuentra mediada por distintos factores entre los que cabe destacar de forma especial el NO. Sin embargo, las rutas de señalización que controlan el proceso no son del todo conocidas, así como el efecto que el NO ejerce sobre la respuesta inflamatoria desarrollada tras este tipo de procedimientos.

En esta tesis, como continuación de los trabajos de nuestro laboratorio se propone que el NO controla la migración de las células endoteliales hacia la zona dañada, a través de la activación de distintas metaloproteinasas de matriz extracelular, destacando la participación primordial de MMP-13, favoreciendo la vuelta rápida y precisa hacia el estado fisiológico del vaso que ha sufrido el denudado endotelial.

Además, nos preguntamos cómo la deficiencia NO producido por la isoforma endotelial va a afectar a la respuesta inflamatoria generada tras el protocolo de denudado endotelial y como va a afectar en la expresión de diferentes citoquinas y quimiocinas.

Por último y cómo principal interés del proyecto queremos buscar una posible aplicabilidad de los resultados obtenidos, con el fin de poder desarrollar una nueva herramienta de diagnóstico no invasiva con aplicación clínica que nos permita detectar zonas con daño endotelial, convirtiéndose el denudado endotelial en un marcador precoz de enfermedades como la aterosclerosis.



## **Objetivos**

---

La remodelación de los vasos sanguíneos es un fenómeno que tiene lugar durante el desarrollo normal de los seres vivos, como en la angiogénesis, pero también puede surgir como resultado de determinadas condiciones patológicas como es el caso de la enfermedad aterosclerótica o la hipertensión. El óxido nítrico es el principal factor vasoactivo y ejerce un importante papel en el proceso de remodelación. En esta tesis hemos profundizado en el conocimiento de los mecanismos de acción dirigidos por el NO producido a través de la óxido nítrico sintasa endotelial, que se manifiestan en el proceso de remodelación vascular en situaciones patológicas. Para ello nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Elucidar el efecto del NO en el fenómeno de remodelación vascular tras el procedimiento quirúrgico de denudado endotelial en la aorta abdominal.
2. Efecto del NO en la respuesta inflamatoria y más específicamente sobre el efecto de la polarización de los macrófagos hacia M1 o M2 tras el denudado del endotelio de la aorta abdominal.
3. Estudio del micro-ambiente pro-inflamatorio generado tras el procedimiento de daño endotelial en ausencia del NO mediante el estudio de la expresión de diversas citoquinas y quimiocinas.
4. Determinación del efecto de los macrófagos M1 y M2 sobre la migración y proliferación de las células endoteliales y las células musculares lisas (VSMC: Vascular smooth muscle cells).
5. Evaluación del efecto de las metaloproteasas y más específicamente MMP-13 en el contexto de la regeneración vascular tras el denudado endotelial.

6. Estudio de gadofosveset como posible agente de contraste para la detección de la recuperación endotelial después del procedimiento de daño mediante de Resonancia Magnética Nuclear.
7. Análisis de la ultraestructura de la pared vascular en ausencia del NO producido por NOS3 después del denudado endotelial.

## *Introducción*

---

Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo una de las principales causas de muerte en el mundo a pesar de los avances en el conocimiento, prevención y tratamiento de las mismas. Por ello, el desarrollo de nuevas terapias para conseguir aumentar significativamente la esperanza y calidad de vida de los pacientes constituye uno de los principales objetivos de la investigación actual.

De entre todas las complicaciones cardiovasculares, merecen especial atención aquellas que inducen remodelado de la pared vascular, ya que pueden ser origen de otras patologías. Se desconoce la génesis de este fenómeno de forma precisa, pero está descrita la implicación de factores vasoactivos, la matriz extracelular y la respuesta inflamatoria después de procedimientos como la eliminación mecánica de la placa o durante el infarto de miocardio.

## **1. Remodelación de la pared vascular**

La remodelación de la pared de los vasos sanguíneos es un fenómeno dinámico que tiene lugar durante el desarrollo fisiológico de los seres vivos, aunque también surge como consecuencia de diversas situaciones patológicas, entre las que cabe destacar la hipertensión arterial y la aterosclerosis. La hipertensión arterial es uno de los factores más importantes en la etiología de las enfermedades coronarias y cerebro vasculares siendo la segunda causa de mortalidad en el mundo occidental al estar directamente asociada con la aparición de procesos de disfunción renal<sup>1,2</sup> y fallo cardiaco.<sup>3,4,5,6</sup>

La pared vascular está continuamente expuesta a fuerzas hemodinámicas como la presión luminal y las fuerzas de cizalla (*shear stress*), condicionando el tipo de flujo de sangre que pasa a través del vaso. Alteraciones en estas fuerzas y/o modificaciones estructurales en la pared vascular producen generalmente cambios en los componentes celulares y estructurales de la pared<sup>7</sup>, pudiendo aparecer diferentes fenómenos como el aumento del crecimiento y migración de las células musculares lisas (SMC: Smooth

---

<sup>1</sup>Textor, S.C. & McKusick, M.A. « Renal Artery Stenosis.» *Curr. Treat. Options. Cardiovasc. Med.* 3 (2001): 187-194.

<sup>2</sup>Ito, S. «Kidney and hypertension: role of the juxtaglomerular apparatus.» *J. Exp. Med.* 181 (1997): 411-429.

<sup>3</sup>Knowles, J.W., et al. « Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment.» *J. Clin. Invest.* 105 (2000): 451-458.

<sup>4</sup>Shesely, E.G., et al. « Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93 (1996): 13176-13181.

<sup>5</sup>Zaragoza, C., et al. «The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95 (1998): 2469-2474.

<sup>6</sup>Zaragoza, C., et al. «Inducible nitric oxide synthase protection against coxsackievirus pancreatitis.» *J. Immunol.* 163 (1999): 5497-5504.

<sup>7</sup>Hacking, W.J., VanBavel, E. & Spaan. «Shear stress is not sufficient to control growth of vascular networks: a model study.» *J.A. Am. J. Physiol.* 270 (1996): 364-375.

## ***Introducción***

---

Muscle Cells)<sup>8</sup>, síntesis y/o degradación de matriz extracelular,<sup>9</sup> inflamación<sup>10</sup> y/o disfunción endotelial.<sup>11</sup>

En función de los cambios producidos en el diámetro y grosor de la pared vascular, el remodelado puede ser positivo o negativo (**Figura 1**). Se dice que el remodelado es positivo cuando aumenta el grosor de la pared, manteniendo el diámetro del lumen, como mecanismo adaptativo inicial ante un cambio. Este fenómeno, que en principio es beneficioso, puede convertirse en perjudicial cuando los mecanismos reguladores se descompensan. Este evento surge como consecuencia de un exceso de proliferación de la musculatura (hiperplasia de la neointima), produciéndose una estenosis o estrechamiento del lumen. Se considera remodelado negativo, el que tiene lugar cuando el diámetro de la luz del vaso disminuye o incluso llega a completa oclusión, produciéndose el cese de flujo sanguíneo de la zona afectada.<sup>12</sup>

---

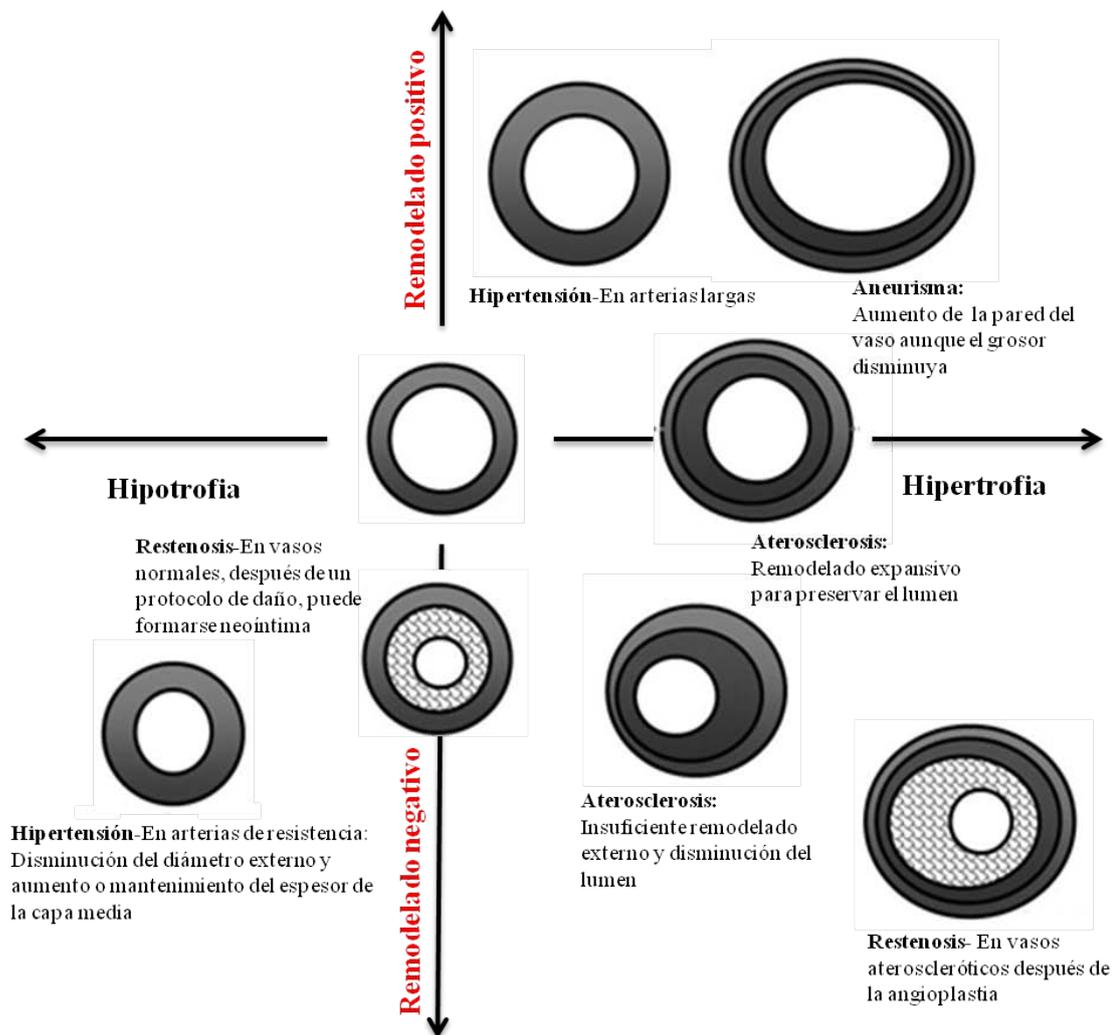
<sup>8</sup> Durán-Prado, M, et al. «Cortistatin Inhibits Migration and Proliferation of Human Vascular Smooth Muscle Cells and Decreases Neointimal Formation upon Carotid Artery Ligation. » *Circulation Research*. (2013). In press.

<sup>9</sup> Pasterkamp, G., Galis, Z.S. & de Kleijn, D.P. « Expansive arterial remodeling: location, location, location.» *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004): 650-657.

<sup>10</sup> Mantovani, A., et al. «Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling.» *J. Pathol.* 229 (2013): 176-185.

<sup>11</sup> Goligorsky. «Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. » *M.S. Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 288 (2005): F871-880.

<sup>12</sup> Ward, M.R., Pasterkamp, G., Yeung, A.C. & Borst, C. «Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications.» *Circulation.* 102 (2000): 1186-1191.



**Figura 1. Tipos de remodelado vascular.** Adaptado de Ward, M.R., Pasterkamp, G., Yeung, A.C. & Borst, C. «Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications.» *Circulation*. 102 (2000): 1186-1191.

### **2. Endotelio vascular**

El endotelio vascular está constituido por una monocapa de células aplanadas conectadas entre sí mediante un sistema de uniones intercelulares estrechas, adherentes, desmosómicas y de hendidura (gap).<sup>13</sup> Esta monocapa tapiza el interior de los vasos sanguíneos, y reposa directamente sobre una matriz extracelular de tejido conectivo formando la lámina basal. El conjunto del endotelio y la lámina basal se denomina túnica íntima del vaso.<sup>14,15</sup> Adicionalmente, dentro de los tipos celulares que pueden contribuir en el mantenimiento de la capa endotelial se encuentran las células progenitoras endoteliales (EPC: Endothelial Progenitor Cells) o angioblastos, descritas por T. Asahara y cols, cuya presencia en áreas donde se produce angiogénesis puede sugerir su implicación en el remodelado vascular.<sup>16</sup>

Tradicionalmente se pensaba, que la función del endotelio era la de actuar como frontera o barrera frente al medio extracelular. Sin embargo, hoy día se sabe que la función primordial del endotelio, es separar el medio exterior del intersticio tisular, cumpliendo una función protectora a nivel del tegumento mucocutáneo, del pulmón, del tracto gastrointestinal y del sistema cardiovascular. Además, el endotelio interviene en procesos inflamatorios, siendo esencial para una correcta embrio-, histo- y

---

<sup>13</sup> Tarbell, J.M. «Shear stress and the endothelial transport barrier.» *Cardiovasc. Res.* 87 (2010): 320-330.

<sup>14</sup> Cines, D.B., et al. «Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.» *Blood.* 91 (1998): 3527-3561.

<sup>15</sup> Brodsky, S.V. & Goligorsky. « Endothelium under stress: local and systemic messages.» *M.S.Semin. Nephrol.* 32 (2012): 192-198.

<sup>16</sup> Asahara, T., et al. « Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.» *Science.* 275 (1997): 964-967.

organogénesis. Su papel en cicatrización es crucial, así como su participación durante la angiogénesis en procesos de metástasis.<sup>14, 17</sup>

El endotelio actúa como sensor ante cambios hemodinámicos en respuesta a cualquier alteración en el flujo. Las células endoteliales presentan en la membrana celular una serie de receptores específicos que detectan estos cambios, transmitiendo señales como respuesta a los mismos.<sup>18</sup> El endotelio produce moléculas vasoactivas de dos tipos: sustancias vasodilatadoras como la prostaciclina, el Óxido Nítrico (NO: Nitric Oxide) y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio o sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-1, la angiotensina II y el tromboxano A<sub>2</sub>.<sup>19</sup> Este conjunto de moléculas junto con un grupo específico de proteínas trans-membrana denominadas integrinas alertan al endotelio de cualquier variación fisiológica y/o patológica, para elaborar una respuesta adecuada en cada momento.<sup>20</sup> En condiciones normales, el tono vascular se mantiene gracias a un equilibrio de factores vasorrelajantes, cuya expresión y liberación evitan la contracción de las fibras musculares del vaso, manteniendo de esta forma el tono y los valores de presión arterial adecuados.<sup>19</sup>

Por lo expuesto anteriormente, se puede concluir que la integridad de la capa endotelial es crucial en el desarrollo (positivo o negativo) del remodelado vascular. Los factores de riesgo cardiovascular habituales como la hipertensión, hipercolesterolemia,

---

<sup>14</sup> Cines, D.B., et al. «Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.» *Blood*. 91 (1998): 3527-3561.

<sup>17</sup> Goligorsky. «Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. » *M.S. Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288 (2005): F871-880.

<sup>18</sup> Rudic, R.D. & Sessa. «Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links.» *W.C. Am. J. Hum. Genet.* 64, (1999): 673-677.

<sup>19</sup> Gibbons, G.H. «Vasculoprotective and cardioprotective mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibition: the homeostatic balance between angiotensin II and nitric oxide.» *Clin. Cardiol.* 20 (1997): II-18-25.

<sup>20</sup> Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E. «Integrin signaling.» *Science*. 285 (1999): 1028-1032.

## ***Introducción***

---

diabetes o el tabaquismo, entre otros, inciden sobre la integridad y función del endotelio y se asocian con el fenómeno de disfunción endotelial.<sup>21</sup>

### **3. La disfunción endotelial y la permeabilidad vascular**

La disfunción endotelial, de forma genérica, se define como la pérdida de la capacidad vasorrelajante del endotelio vascular. Una de las primeras dianas afectadas es el músculo liso de los vasos, produciéndose alteraciones significativas en la dilatación/contracción de las arterias. Por tanto, la disfunción endotelial es un proceso directamente relacionado con patologías vasculares.<sup>22</sup>

Las alteraciones funcionales que produce la disfunción del endotelio son entre otras: incremento de la permeabilidad a lipoproteínas plasmáticas (con su consiguiente modificación oxidativa), hiper-adherencia de los leucocitos sanguíneos, desequilibrio funcional de los factores locales pro y anti-trombóticos, alteración en los inhibidores y estimuladores del crecimiento, alteración de sustancias vasoactivas (dilatadoras y constrictoras), aumento del espesor de la pared vascular debido al crecimiento de las células musculares lisas y/o fibroblastos y depósito de matriz extracelular (**Figura 2**).<sup>22,23</sup> El estudio de la permeabilidad vascular como consecuencia del daño mecánico que surge tras el denudado endotelial, es origen de múltiples alteraciones vasculares. La detección temprana de la permeabilidad en estas patologías podría ser una herramienta de gran utilidad a la hora de concretar el tratamiento de las mismas. Por ello, la

---

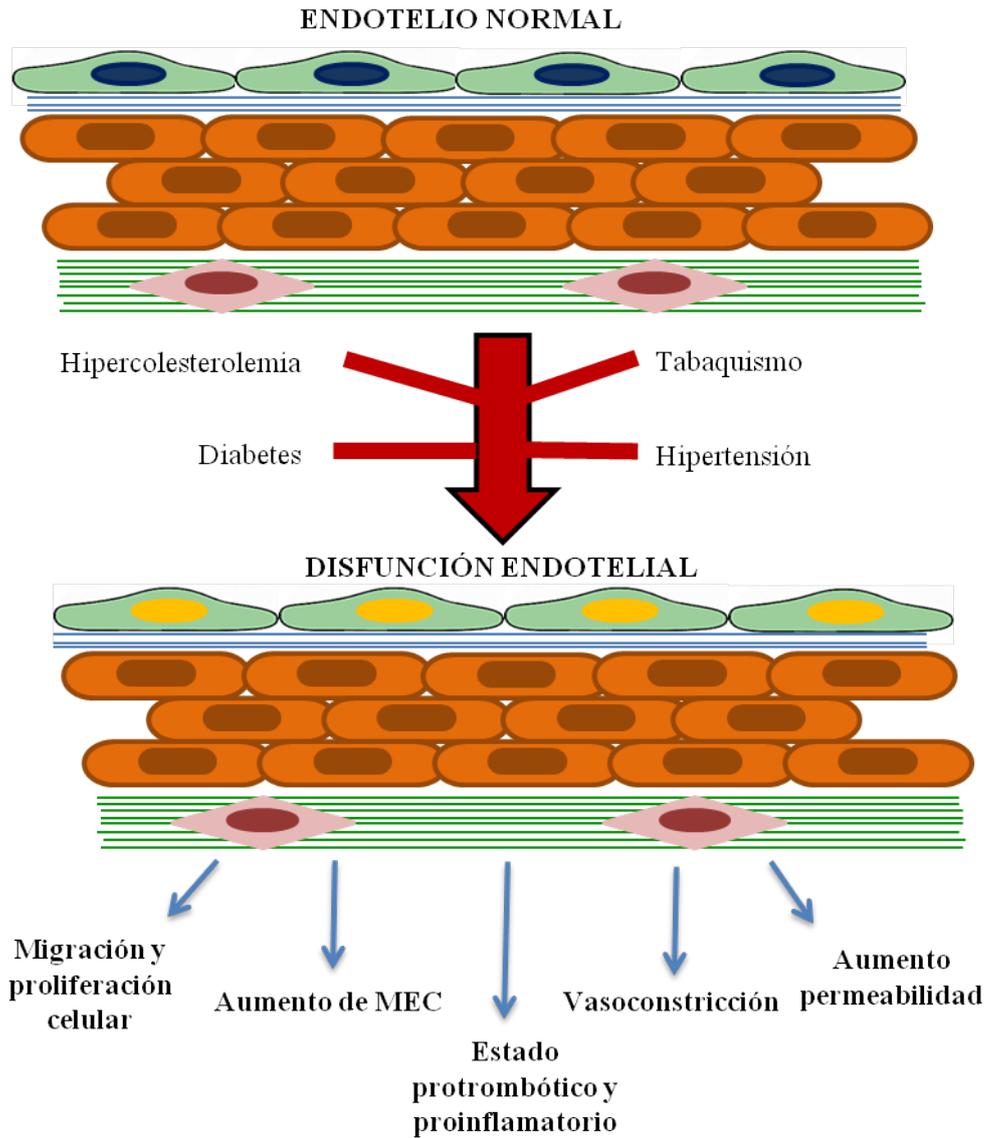
<sup>21</sup> Vita, J.A. & Keaney, J.F., Jr. «Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?» *Circulation*. 106 (2002): 640-642.

<sup>22</sup> Le Brocq, M., Leslie, S.J., Milliken, P. & Megson, I.L. «Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities.» *Antioxid. Redox. Signal*. 10 (2008): 1631-1674.

<sup>23</sup> Widlansky, M.E., Gokce, N., Keaney, J.F., Jr. & Vita, J.A. «The clinical implications of endothelial dysfunction.» *J. Am. Coll. Cardiol*. 42 (2003): 1149-1160.

detección de la permeabilidad vascular mediante la utilización de técnicas no invasivas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ha sido uno de los objetivos en la presente tesis doctoral.

## Introducción



**Figura 2. Alteraciones funcionales asociadas a la disfunción endotelial.** Adaptado de Widlansky, M.E., Gokce, N., Keaney, J.F., Jr. & Vita, J.A. «The clinical implications of endothelial dysfunction.» *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (2003): 1149-1160.

La permeabilidad vascular es un mecanismo que ocurre en situaciones fisiológicas normales, permitiendo el transporte de determinados solutos a través del endotelio de forma selectiva y muy controlada. No obstante, este fenómeno, también ocurre en situaciones patológicas como por ejemplo después de una angioplastia, donde de forma mecánica se produce la eliminación de la capa endotelial del vaso, que conlleva a una situación descontrolada y no selectiva de un flujo rico en proteínas desde la sangre hacia los tejidos. Existen diferentes vías para atravesar el endotelio siendo las más importantes, las uniones intercelulares adherentes, las roturas en las uniones adherentes, las vesículas y las fugas en el endotelio o *leaky junctions*. Las primeras ocurren en situaciones fisiológicas normales, mientras que la última ocurre exclusivamente en condiciones patológicas.<sup>13</sup> Aunque estas son las variantes más habituales, en determinadas zonas muy específicas como la barrera hemato-encefálica y los capilares fenestrados del glomérulo renal se van a encontrar sistemas ligeramente diferentes.<sup>24,25</sup>

Las uniones adherentes apicales están formadas por varios componentes proteicos de las familias de la Claudina y la Ocludina, con un papel fundamental en el sellado de la unión y las proteínas Zonula Occludens (ZO-1 y ZO-2) que conectan la unión y los filamentos de actina del citoesqueleto, entre otros,<sup>26</sup> impidiendo el transporte de moléculas solubles en agua con un tamaño mayor de 2 nm de diámetro.

Las roturas en las uniones adherentes permiten el transporte de moléculas solubles en agua de mayor tamaño (aproximadamente 20 nm) y el transporte de un flujo

---

<sup>13</sup> Tarbell, J.M. «Shear stress and the endothelial transport barrier.» *Cardiovasc. Res.* 87 (2010): 320-330.

<sup>24</sup> Hausmann, R., Grepl, M., Knecht, V. & Moeller, M.J. «The glomerular filtration barrier function: new concepts.» *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 21 (2012): 441-449.

<sup>25</sup> Liu, S., Agalliu, D., Yu, C. & Fisher, M. «The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke.» *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012): 3653-3662.

<sup>26</sup> Anderson, J.M. «Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport.» *News. Physiol. Sci.* 16 (2001): 126-130.

## ***Introducción***

---

de agua. Las uniones adherentes son uniones adhesivas célula-célula, que mantienen a las células unidas y conectadas a la membrana plasmática a través de componentes del citoesqueleto como la actina. Los componentes adhesivos de las uniones adherentes están formados por cadherinas de tipo II (proteínas adhesivas  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes) donde el subtipo más abundante es la VE cadherina.<sup>26</sup>

Las vesículas implicadas en el transporte a través de la capa endotelial están cubiertas por clatrina y forman parte del proceso de captación endocítico, en el que macromoléculas específicas de la sangre son reconocidas por los receptores del endotelio. Los solutos disueltos en sangre también pueden atravesar la barrera endotelial a través de este sistema, aunque cabe destacar que este tipo de transporte es altamente específico y depende principalmente de los receptores de membrana existentes en las células endoteliales que componen la capa íntima del vaso.<sup>27</sup>

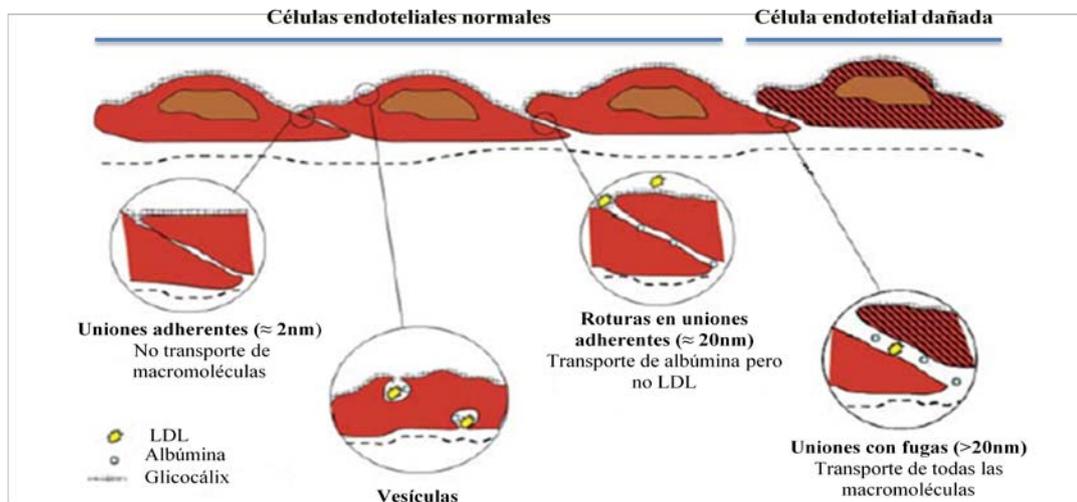
Como hemos comentado anteriormente las uniones intercelulares no permiten el paso de moléculas de gran tamaño como las LDL (Low-density lipoprotein) (23nm de diámetro), ya que el diámetro es superior al permitido por las roturas en las uniones adherentes,<sup>28</sup> sin embargo, en situaciones patológicas, como en procesos asociados a muerte celular o bajo número de células en división, se generan grandes poros entre las células endoteliales, permitiendo el acceso de todo tipo de solutos y flujo de agua a través de la capa íntima de los vasos sanguíneos (**Figura 3**).

---

<sup>26</sup> Anderson, J.M. «Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport.» *News. Physiol. Sci.* 16 (2001): 126-130.

<sup>27</sup> Minshall, R.D. & Malik, A.B. « Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability.» *Handb. Exp. Pharmacol.* (2006): 107-144.

<sup>28</sup> Weinbaum, S., Tarbell, J.M. & Damiano, E.R. «The structure and function of the endothelial glycocalyx layer.» *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9 (2007): 121-167.



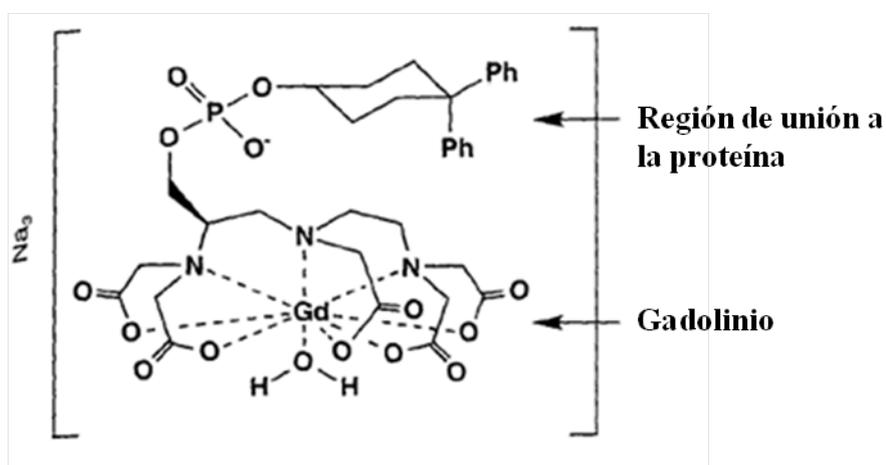
**Figura 3. Principales vías de transporte a través del endotelio vascular.** Adaptado de Tarbell, J.M. «Shear stress and the endothelial transport barrier.» *Cardiovasc. Res.* 87 (2010): 320-330.

La disfunción endotelial es uno de los primeros eventos en la enfermedad vascular, siendo la permeabilidad del vaso un signo claro de disfunción del endotelio. Por ello, es muy importante el desarrollo de herramientas no invasivas que permitan determinar el daño del endotelio. Una de las técnicas no invasivas más empleadas en clínica es la RMN, donde de forma habitual, se emplean agentes que permiten el realce de la señal de resonancia en la región de interés. De entre los distintos reactivos con potencial uso en clínica, el gadofosveset (vasovist) es un agente de contraste de gadolinio clínicamente aprobado para su uso en humanos, con una elevada capacidad para discriminar diferencias en la permeabilidad de los vasos sanguíneos en procesos como la aterosclerosis<sup>29</sup> o la angiogénesis.<sup>30</sup>

<sup>29</sup> Phinikaridou, A., et al. «Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent.» *Circulation.* 126 (2012): 707-719.

## Introducción

Una de las principales características de gadofosveset es su unión de forma estable y reversible a la albúmina del plasma en un 75%, junto con una relaxividad (alteración de la relajación de los átomos de hidrógeno) significativamente superior cuando se encuentra unido a albúmina en comparación con la forma no unida,<sup>31,32</sup> lo que hace que sea una herramienta con un elevado potencial para la evaluación objetiva del remodelado vascular (Figura 4).



**Figura 4. Estructura del agente de contraste gadofosveset.** Adaptado de *Lauffer, R.B., et al. «MS-325: a small-molecule vascular imaging agent for magnetic resonance imaging.» Acad. Radiol. 3 Suppl 2 (1996): S356-358.*

<sup>30</sup> Pedersen, S.F., et al. «CMR assessment of endothelial damage and angiogenesis in porcine coronary arteries using gadofosveset.» *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 13 (2011): 10.

<sup>31</sup> Caravan, P., et al. «The interaction of MS-325 with human serum albumin and its effect on proton relaxation rates.» *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002): 3152-3162.

<sup>32</sup> Lauffer, R.B., et al. «MS-325: a small-molecule vascular imaging agent for magnetic resonance imaging.» *Acad. Radiol. 3 Suppl 2 (1996): S356-358.*

Como hemos citado anteriormente, la disfunción endotelial, tiene como origen la pérdida de la función vasorrelajante del endotelio vascular, debido normalmente al fallo en la producción de Óxido Nítrico (NO) por parte de la sintasa de NO endotelial (NOS3).<sup>33,34</sup> Podemos afirmar que el NO en el endotelio es uno de los efectores clave en el mantenimiento del tono vascular, inhibiendo la proliferación del músculo liso de capas inferiores, la adhesión plaquetaria y leucocitaria a las paredes del vaso y favoreciendo la migración de las células endoteliales.<sup>14,15,23</sup> En definitiva, el NO ejerce un papel fundamental en la prevención de la disfunción endotelial, favoreciendo la regeneración del endotelio dañado y previniendo de esta forma el proceso que constituye el ámbito fundamental de esta tesis doctoral: la formación de neoíntima a partir de la proliferación incontrolada del músculo liso proveniente de la túnica media. El estudio del efecto que el NO ejerce sobre la formación de neoíntima es de gran interés, ya que todavía existen lagunas sobre las bases moleculares que lo desencadenan y además porque las claves del proceso pueden ser especialmente relevantes de cara a la aplicación de los resultados en clínica.

---

<sup>14</sup> Cines, D.B., et al. «Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.» *Blood*. 91 (1998): 3527-3561.

<sup>15</sup> Brodsky, S.V. & Goligorsky. « Endothelium under stress: local and systemic messages.» *M.S.Semin. Nephrol.* 32 (2012): 192-198.

<sup>23</sup> Widlansky, M.E., Gokce, N., Keaney, J.F., Jr. & Vita, J.A. «The clinical implications of endothelial dysfunction.» *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (2003): 1149-1160.

<sup>33</sup> Peters, K., Unger, R.E., Brunner, J. & Kirkpatrick, C.J. «Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis.» *Cardiovasc. Res.* 60 (2003): 49-57.

<sup>34</sup> Thomas, S.R., Witting, P.K. & Drummond, G.R. «Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities.» *Antioxid. Redox. Signal.* 10 (2008): 1713-1765.

### **4. El Óxido Nítrico en el sistema cardiovascular**

En 1998, Furchgott, Ignarro y Murad, recibieron el Premio Nobel de Medicina por sus trabajos, de forma independiente, en el descubrimiento, composición y función del factor de relajación endotelial. Concretamente Furchgott, describió por primera vez en 1980, la existencia de una sustancia liberada por el endotelio que respondía a la acetilcolina y producía vasodilatación, denominándola factor vasodilatador derivado del endotelio (EDRF: Endothelial Derived Relaxing Factor).<sup>35</sup> Posteriormente Ignarro, por medio de estudios espectrales en reacciones del EDRF con la hemoglobina, confirmó que esta sustancia era capaz de generar metahemoglobina como el óxido nítrico y la identificó como este último.<sup>36</sup> Por último, Murad burbujeando NO gas en tejidos que contenían la enzima guanilato ciclasa soluble observó un aumento consecutivo de las concentraciones de GMP cíclico, postulando esta vía como la responsable del efecto vasodilatador del NO en el músculo liso.<sup>37</sup>

El NO es un gas, soluble, altamente reactivo y de vida media corta, entre 3 y 30 s. Es una molécula altamente lipófila capaz de difundir a través de las membranas en ambos sentidos, sin necesidad de ningún transportador. El NO se produce y actúa principalmente en los sistemas cardiovascular, inmune y nervioso, debido a la localización principal de las tres isoformas enzimáticas que lo producen.

Hasta el momento se han descrito tres isoformas distintas de la NOS, codificadas por genes con diferente localización cromosómica y regulación de su expresión. Estas

---

<sup>35</sup> Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. «The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.» *Nature*. 288 (1980): 373-376.

<sup>36</sup> Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. & Chaudhuri, G. «Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 84 (1987): 9265-9269.

<sup>37</sup> Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S. & Murad, F. «Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 74 (1977): 3203-3207.

isoformas se denominan: óxido nítrico sintasa neuronal (NOS1 ó nNOS), óxido nítrico sintasa inducible (NOS2 ó iNOS) y óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3 ó eNOS).<sup>38,39</sup>

### **4.1. Producción de NO: Las Óxido Nítrico Sintetas**

La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) se encarga de la producción del NO. La NOS es una oxidorreductasa que cataliza su reacción empleando el átomo terminal de nitrógeno de la *L*-arginina, NADPH y O<sub>2</sub>, para generar *L*-citrulina, NADP y NO como coproducto de la reacción, sin consumo de energía en forma de ATP. La NOS requiere como cofactores FAD, FMN, el grupo hemo, tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y calmodulina (CaM).<sup>40,41</sup>

Las distintas isoformas de esta enzima tienen una estructura homodimérica, compuesta por dos dominios. En su extremo amino-terminal, el dominio oxigenasa, presenta el sitio de unión a la *L*-arginina, los sitios de unión para el grupo hemo y la BH<sub>4</sub> y un sitio de reconocimiento de CaM. En el extremo carboxilo-terminal se encuentra el dominio reductasa, que posee los sitios de unión para FAD, FMN y NADPH (**Figura 5**).<sup>38</sup>

---

<sup>38</sup> Daff, S. «NO synthase: structures and mechanisms.» *Nitric Oxide*. 23 (2010): 1-11.

<sup>39</sup> Alderton, W.K., Cooper, C.E. & Knowles, R.G. «Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.» *Biochem. J.* 357 (2001): 593-615.

<sup>40</sup> Stuehr, D.J., et al. «N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine.» *J. Biol. Chem.* 266 (1991): 6259-6263.

<sup>41</sup> Li, H. & Forstermann, U. «Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease.» *J. Pathol.* 190 (2000): 244-254.

## Introducción

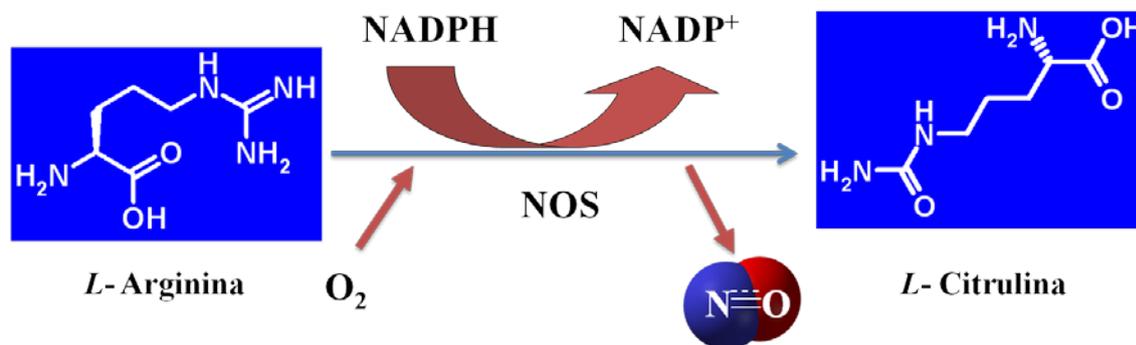


Figura 5. Esquema de la producción del NO a partir de las NOS.

Las isoformas tanto endotelial como neuronal fueron descritas como enzimas constitutivamente expresadas, localizándose en el endotelio vascular y el tejido nervioso respectivamente.<sup>38</sup> Por el contrario, la isoforma inducible fue descrita como no constitutiva y se localizó en diferentes tipos celulares en respuesta a diferentes estímulos, en general con marcado carácter pro-inflamatorio.<sup>42,43</sup>

### 4.1.1. Regulación de las isoformas de la NOS

Las NOS constitutivas (eNOS y nNOS) se transcriben bajo la forma de monómeros no interactivos. Cuando el grupo hemo, la  $BH_4$  y el sustrato L-arginina se acoplan al enzima en sus respectivos sitios de unión, se produce un cambio

<sup>38</sup> Daff, S. «NO synthase: structures and mechanisms.» *Nitric Oxide*. 23 (2010): 1-11.

<sup>42</sup> Pautz, A., et al. «Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase.» *Nitric Oxide*. 23 (2010): 75-93.

<sup>43</sup> Radomski, M.W., Palmer, R.M. & Moncada, S. «An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 87 (1990): 5193-5197.

conformacional que conduce a la dimerización de la enzima. Este paso se requiere para generar la forma enzimáticamente activa, que surge tras la unión al sitio alostérico del complejo Ca-calmodulina (Ca-CaM), momento en el que se genera NO en una concentración baja y de forma intermitente. La base molecular de la activación enzimática reside en que en su forma inactiva, NOS se localiza unida a una proteína de la membrana plasmática (caveolina), que compite por el sitio alostérico con el complejo Ca-CaM. Cuando se acoplan cuatro cationes  $\text{Ca}^{2+}$  a la CaM, la afinidad del complejo Ca-CaM por el sitio alostérico de la NOS es muy superior al de caveolina, desacoplándose la enzima de la membrana plasmática, siendo biológicamente activa. Además, estas isoformas presentan secuencias consenso reconocidas y fosforiladas por la quinasa dependiente de cAMP (PKA: Protein Kinase A), contribuyendo a un mecanismo de activación de la NOS  $\text{Ca}^{2+}$  independiente. Adicionalmente, nNOS también puede ser fosforilada por la quinasa dependiente de cCMP (PKC: Protein Kinase C), por PKG y por la proteína quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina, contribuyendo en este caso a la inactivación del enzima.<sup>38,44</sup>

La iNOS, también es expresada como monómeros inactivos capaces de unir complejos de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina incluso en condiciones de muy bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las formas monoméricas de iNOS son inactivas, requiriendo la unión del grupo hemo, la  $\text{BH}_4$  y la *L*-arginina para la dimerización y activación biológica de la enzima. Al ser una isoforma inducible, en condiciones basales, la enzima no se encuentra expresada en ningún tipo celular, siendo como hemos citado anteriormente, la generación de estímulos pro-inflamatorios, los agentes desencadenantes de la inducción

---

<sup>38</sup> Daff, S. «NO synthase: structures and mechanisms.» *Nitric Oxide*. 23 (2010): 1-11.

<sup>44</sup> Alderton, W.K., Cooper, C.E. & Knowles, R.G. «Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.» *Biochem. J.* 357 (2001): 593-615.

## ***Introducción***

---

de su expresión génica. A diferencia de las isoformas constitutivamente activas, iNOS no requiere la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  para ser biológicamente activa.<sup>38,42</sup>

El NO generado por iNOS es un potente bactericida, antiviral y antiparasitario, aunque también está implicado en mecanismos antitumorales e inmunomoduladores. La inducción de la expresión de iNOS está relacionada con numerosas situaciones patológicas y enfermedades en humanos,<sup>45,46</sup> por lo que su regulación debe estar muy controlada. Los mecanismos reguladores más importantes de esta enzima son a nivel transcripcional y post-transcripcional, siendo la unión al promotor de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, IRS-1 y STAT-1 $\alpha$ , un paso esencial para la inducción de iNOS. Adicionalmente, han sido identificadas algunas proteínas que interactúan con iNOS y regulan su actividad, como por ejemplo, en macrófagos de ratón donde la proteína de 110 kDa NAP110 interacciona en la región N-terminal de iNOS evitando la formación del dímero y por lo tanto la activación de la enzima. Además, en los últimos años, han sido descritos diferentes polimorfismos en la secuencia humana del promotor. Un ejemplo de ello, lo encontramos en la posición -2,5kb del promotor, donde aparece un polimorfismo en el pentanucleótido CCTTT(n), donde ha sido descrita una correlación entre el número de repeticiones de esta secuencia y algunas enfermedades como la diabetes tipo I, la enfermedad celiaca, la malaria o la artritis reumatoide, entre otras.<sup>44</sup>

---

<sup>38</sup> Daff, S. «NO synthase: structures and mechanisms.» *Nitric Oxide*. 23 (2010): 1-11.

<sup>42</sup> Pautz, A., et al. «Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase.» *Nitric Oxide*. 23 (2010): 75-93.

<sup>44</sup> Kroncke, K.D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen. «Inducible nitric oxide synthase in human diseases.» *Clin. Exp. Immunol.* 113 (1998): 147-156.

<sup>45</sup> Kroncke, K.D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen. «Inducible nitric oxide synthase in human diseases.» *Clin. Exp. Immunol.* 113 (1998): 147-156.

<sup>46</sup> Lechner, M., Lirk, P. & Rieder, J. «Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin.» *Semin. Cancer. Biol.* 15 (2005): 277-289.

La correcta regulación de las isoformas de la NOS va a estar relacionada con la producción de NO y la función que éste va a desempeñar en los diferentes sistemas en los que actúa.

### **4.2. Funciones del NO**

El NO está implicado en numerosos procesos, tanto fisiológicos como patológicos y sus principales acciones se centran en los sistemas cardiovascular, inmune y nervioso, ya que es la localización de las tres isoformas enzimáticas que lo producen.

En el sistema vascular, el NO es sintetizado en las células endoteliales de forma constitutiva por la isoforma eNOS, que requiere cationes de calcio intracelular para ejercer su función. En 1986, Rubany comprobó que el principal factor responsable de la liberación del NO por el endotelio era el roce producido por la sangre sobre esta capa de células, señalando por primera vez "que el aumento de la velocidad o pulso del flujo sanguíneo, producía vasorrelajación dependiente de la liberación de NO por las células endoteliales".<sup>47</sup> En este proceso, el NO difunde a las células musculares, uniéndose al grupo hemo del enzima guanilato ciclasa soluble (sGC: soluble Guanylate Cyclase), activando la producción de guanosina monofosfato cíclico (cGMP: cyclic Guanosine MonoPhosphate).<sup>48</sup> El cGMP es necesario para la activación de la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG: Protein Kinase G) que fosforila diferentes sustratos, incluyendo aquellos implicados en el tránsito de cationes de calcio necesarios para la contracción muscular, provocando de esta manera la relajación de las células musculares lisas<sup>47</sup>. Esta función llevada a cabo a través de la vía de señalización de la

---

<sup>47</sup> Rubanyi, G.M., Romero, J.C. & Vanhoutte, P.M. «Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor.» *Am. J. Physiol.* 250 (1986): H1145-1149.

<sup>48</sup> Murad, F., et al. «EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells.» *Adv. Second. Messenger. Phosphoprotein. Res.* 24 (1990): 441-448.

## Introducción

---

PKG, es fundamental para mantener el tono vascular de los vasos y por tanto una correcta regulación de la presión sanguínea.<sup>49,50,51,52</sup> Otras funciones asociadas a esta vía de señalización son la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición de la adhesión leucocitaria y la regulación de la proliferación y migración de las células musculares lisas (**Figura 6**).<sup>53,54</sup>

En el sistema inmune, el NO participa en la respuesta inmune primaria. Es sintetizado por células dendríticas, células NK (Natural Killer), mastocitos, y células fagocíticas como los monocitos, macrófagos, células de la microglía, células de Kupffer, células mesangiales, eosinófilos y neutrófilos.<sup>55</sup> En este caso, el NO es producido por la isoforma iNOS, cuya actividad es del orden de mil veces superior a la constitutivamente expresada en el endotelio de los vasos. Su función es actuar como un potente agente bactericida, antiviral y tumoricida, ya que la concentración de NO en macrófagos se ve aumentada en el caso de infecciones (**Figura 6**).<sup>56,57</sup>

En el sistema nervioso central se han encontrado neuronas capaces de producir NO en el hipocampo, región relacionada con el aprendizaje y la memoria.

---

<sup>49</sup> Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. «Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication.» *Biochem. Pharmacol.* 38 (1989): 1709-1715.

<sup>50</sup> Furchgott, R.F. «Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor.» *Acta. Physiol. Scand.* 139 (1990): 257-270.

<sup>51</sup> Ignarro, L.J. «Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide.» *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30 (1990): 535-560.

<sup>52</sup> Vane, J.R., Anggard, E.E. & Botting, R.M. «Regulatory functions of the vascular endothelium.» *N. Engl. J. Med.* 323 (1990): 27-36.

<sup>53</sup> Sarkar, R., Meinberg, E.G., Stanley, J.C., Gordon, D. & Webb, R.C. «Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells.» *Circ. Res.* 78 (1996): 225-230.

<sup>54</sup> Brown, C., Pan, X. & Hassid, A. «Nitric oxide and C-type atrial natriuretic peptide stimulate primary aortic smooth muscle cell migration via a cGMP-dependent mechanism: relationship to microfilament dissociation and altered cell morphology.» *Circ. Res.* 84 (1999): 655-667.

<sup>55</sup> Bogdan, C. «Nitric oxide and the immune response.» *Nat. Immunol.* 2 (2001): 907-916.

<sup>56</sup> Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z. & Rachlin, E.M. «Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule.» *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157 (1988): 87-94.

<sup>57</sup> Hajri, A., et al. «Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies.» *Br. J. Cancer.* 78 (1998): 841-849.

Posteriormente, se detectó la producción de NO en otras regiones del cerebro, como las áreas visual y olfativa, siendo el NO también importante en la percepción sensorial.<sup>58,59,60</sup> En la década de 1990, se descubrió que las células del sistema nervioso periférico también producían NO, como por ejemplo a través de las neuronas que inervan el músculo liso del sistema vascular, el tejido endotelial del estómago y los pulmones.<sup>61,62</sup> Al igual que en el endotelio vascular, la isoforma que produce NO en el sistema nervioso (nNOS, NOS1) se encuentra constitutivamente expresada y requiere  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad (**Figura 6**).

Además de lo anteriormente citado, el NO es una molécula altamente reactiva, pudiéndose combinar con el oxígeno, generando diversos compuestos como nitritos y nitratos, o con especies reactivas de oxígeno, produciendo especies reactivas de nitrógeno (RNS: Reactive Nitrogen Species).<sup>63</sup> Estas especies derivadas, producen modificaciones postraduccionales beneficiosas o perjudiciales en proteínas tales como, la nitración de residuos de tirosina,<sup>64</sup> la nitrosilación de los grupos tioles de residuos de cisteína o la peroxidación de lípidos como en el caso del peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Entre todas las alteraciones que pueden producirse, cabe destacar el efecto beneficioso que éstas tienen permitiendo al NO llevar a cabo su función citotóxica, siendo capaz de

---

<sup>58</sup> Estall, L.B., Grant, S.J. & Cicala, G.A. «Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat.» *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46 (1993): 959-962.

<sup>59</sup> Bohme, G.A., et al. «Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90 (1993): 9191-9194.

<sup>60</sup> Luo, C.X. & Zhu, D.Y. «Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase.» *Neurosci. Bull.* 27 (2011): 23-35.

<sup>61</sup> Rand, M.J. «Nitrergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission.» *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19 (1992): 147-169.

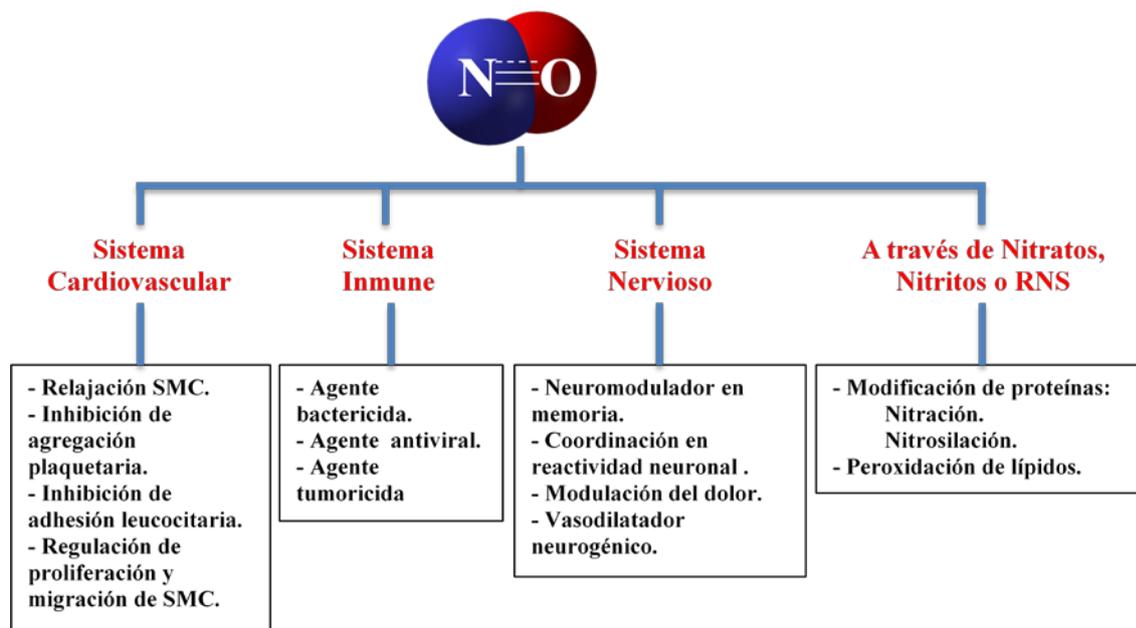
<sup>62</sup> de Rada, O.D., et al. «Nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in human and porcine respiratory tract.» *Neurosci. Lett.* 162 (1993): 121-124.

<sup>63</sup> Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. & Freeman, B.A. «Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87 (1990): 1620-1624.

<sup>64</sup> Saura, M., et al. «An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease.» *Immunity.* 10 (1999): 21-28.

## Introducción

eliminar o reducir la replicación de agentes infecciosos y células tumorales (**figura 6**).<sup>65,66</sup>



**Figura 6. Esquema de las funciones del NO.**

En resumen, el papel del NO en relación con la disfunción y la reparación endotelial durante el remodelado es decisivo. Asociado a la remodelación de los vasos, se encuentran las alteraciones que sufre la matriz extracelular, motivada fundamentalmente por la expresión, secreción y activación de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs: Matrix Metalloproteinases). En este contexto, nuestro grupo

<sup>65</sup> Richter, C. «Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes.» *Chem. Phys. Lipids*. 44 (1987): 175-189.

<sup>66</sup> Alvarez, B. & Radi, R. «Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins.» *Amino. Acids*. 25 (2003): 295-311.

de investigación ha puesto de manifiesto la estrecha relación que el NO ejerce sobre la expresión de las MMPs en la migración y recuperación endotelial.<sup>67</sup>

### **5. La matriz extracelular**

La matriz extracelular (ECM: Extracelular Matrix) es un entramado de moléculas, proteínas y carbohidratos que se disponen en el espacio intercelular y es sintetizado y secretado por las células (**Figura 7**).<sup>68</sup> La cantidad, composición y disposición de la matriz extracelular depende del tipo de tejido.<sup>69</sup> En particular, la ECM que constituye los vasos sanguíneos está formada por una compleja mezcla de proteínas, principalmente colágeno tipo IV, aunque también se puede encontrar colágeno de tipo I y III (especialmente en situaciones patológicas), elastina, glicoproteínas, proteoglicanos y diferentes factores solubles que van a controlar procesos tan importantes como la proliferación, la migración y la supervivencia de las células que componen el vaso.<sup>70</sup>

Las funciones primordiales de la matriz son aportar propiedades mecánicas a los tejidos, mantener la arquitectura celular y permitir la adhesión de las células para formar y mantener los tejidos. Además, su papel en la comunicación intercelular, diferenciación y fisiología celular, entre otras muchas funciones es fundamental.<sup>71</sup> En cuanto a su composición y estructura se encuentra en un constante balance entre síntesis y degradación a través de una serie de proteínas con actividad enzimática, de las cuales un

---

<sup>67</sup> Lizarbe, T.R., et al. J. «Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair.» *FASEB*. 22 (2008): 3207-3215.

<sup>68</sup> Huxley-Jones, J., et al. « Drug discovery in the extracellular matrix». *Drug Discovery Today*. 13(2008): 685-694.

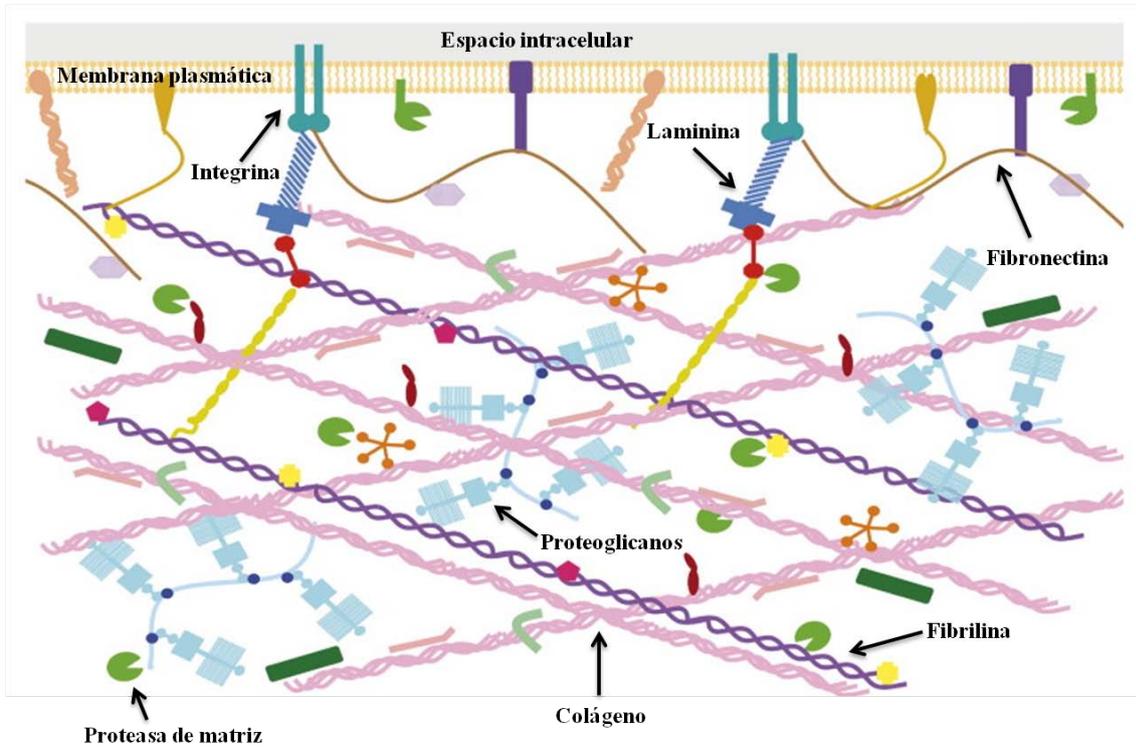
<sup>69</sup> Tanzer, M.L. «Current concepts of extracellular matrix.» *J. Orthop. Sci.* 11 (2006): 326-331.

<sup>70</sup> Kramer, J.M. «Basement membranes.» *WormBook*. (2005): 1-15 .

<sup>71</sup> Boudreau, N.J. & Jones, P.L. «Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come.» *Biochem. J.* 339 (1999): 481-488.

## Introducción

grupo de ellas han sido fundamentales para el desarrollo del presente trabajo y que se denominan metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs: Matrix Metalloproteinases).



**Figura 7. Esquema de la composición de la matriz extracelular.** Adaptado de Huxley-Jones, J., et al. « Drug discovery in the extracellular matrix». *Drug Discovery Today*. 13(2008): 685-694.

### **5.1. Metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs)**

Las MMPs (también llamadas matrixinas) son una familia de endoproteasas neutras dependientes de  $Zn^{2+}$ , capaces de degradar todos los componentes de la ECM. Fueron descritas por primera vez por Gross y Lapiere en el año 1962, como colagenasas intersticiales en la metamorfosis del renacuajo.<sup>72</sup> Años más tarde, el propio Gross purificó esta enzima de la piel humana y comprobó que se sintetizaba en forma de zimógeno, o proteína con actividad proteolítica inactiva.<sup>73,74</sup> Hasta la fecha, han sido identificados en vertebrados 25 miembros diferentes, 24 de los cuales están presentes en humanos, incluyendo la MMP-23 que presenta dos isoformas codificadas por dos genes diferentes.<sup>75</sup>

La actividad proteolítica de las MMPs tiene una influencia esencial en procesos biológicos implicados en la proliferación, migración y adhesión celular, lo que determina su especial relevancia en procesos fisiológicos como el remodelado tisular, la angiogénesis, el desarrollo óseo o la involución del útero y el tejido mamario,<sup>76,77</sup> aunque también están asociadas con multitud de patologías.<sup>78,79</sup> Concretamente, la sobreexpresión de MMPs está directamente relacionada con múltiples enfermedades

---

<sup>72</sup> Gross, J. & Lapiere, C.M. «Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 48 (1962): 1014-1022.

<sup>73</sup> Gross, J. & Bruschi, A.B. «The pattern of collagen degradation in cultured tadpole tissues.» *Dev. Biol.* 26 (1971): 36-41.

<sup>74</sup> Harper, E., Bloch, K.J. & Gross, J. «The zymogen of tadpole collagenase.» *Biochemistry.* 10 (1971): 3035-3041.

<sup>75</sup> Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M. & Lopez-Otin, C. «Human and mouse proteases: a comparative genomic approach.» *Nat. Rev. Genet.* 4 (2003): 544-558.

<sup>76</sup> Page-McCaw, A., Ewald, A.J. & Werb, Z. «Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.» *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 (2007): 221-233.

<sup>77</sup> Rowe, R.G. & Weiss, S.J. «Breaching the basement membrane: who, when and how?» *Trends. Cell. Biol.* 18 (2008): 560-574.

<sup>78</sup> Lopez-Otin, C. & Matrisian, L.M. «Emerging roles of proteases in tumour suppression.» *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007): 800-808.

<sup>79</sup> Hu, J., Van den Steen, P.E., Sang, Q.X. & Opdenakker, G. «Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases.» *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6 (2007): 480-498.

## ***Introducción***

---

cardiovasculares, procesos cancerígenos, metástasis tumoral y determinadas patologías inflamatorias como la osteoartritis o la artritis reumatoide entre otras. Por ello, es esencial una precisa regulación espacio-temporal de las mismas, para mantener la correcta homeostasis del ambiente extracelular y pericelular.

Hoy día el concepto de metaloproteasa como proteína encargada exclusivamente de la degradación de la ECM está siendo revisado por la comunidad científica. Cada vez existen más evidencias que ponen de manifiesto la capacidad de las MMPs para la inducción de otras enzimas o sustratos como la prolactina,<sup>80</sup> las proteínas de adhesión celular, las citoquinas e incluso la inducción o resolución de procesos inflamatorios.<sup>81</sup>

### **5.1.1. Estructura de las MMPs**

Las MMPs o matrixinas son sintetizadas como zimógenos o precursores inactivos, manteniendo en su estructura primaria un péptido señal en el extremo amino terminal, indicador de translocación a la membrana plasmática, para su posterior secreción al exterior de la célula o su anclaje a la membrana plasmática en el caso de las denominadas MT-MMPs (Membrane-type matrix metalloproteinases). Recientemente se ha descubierto que algunos miembros de la familia como MMP-1, MMP-2, MMP-11 y MMP-13 pueden presentarse como proteínas intercelulares, aunque su función en este entorno no ha sido todavía desvelada.<sup>82</sup>

---

<sup>80</sup> Reuwer, A.Q., et al. «Prolactin fragmentation by trophoblastic matrix metalloproteinases as a possible contributor to peripartum cardiomyopathy and pre-eclampsia.» *Med. Hypotheses.* 74 (2010):348-52.

<sup>81</sup> Imanaka-Yoshida K. «Tenascin-C in cardiovascular tissue remodeling: from development to inflammation and repair.» *Circ. J.* 76 (2012):2513-20.

<sup>82</sup> Fanjul-Fernandez, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S. & Lopez-Otin, C. «Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models.» *Biochim. Biophys. Acta.* 1803 (2010): 3-19.

La arquitectura de las MMPs, además del péptido señal, consiste en un dominio propeptídico, compuesto por unos 80 aminoácidos y un motivo cisteína denominado interruptor (*cistein-switch*) que se encarga de mantener inactiva la endopeptidasa al quelar el  $Zn^{2+}$  que requiere el centro catalítico para activarse. El dominio catalítico, consta de unos 170 aminoácidos y presenta una secuencia consenso HEXXHXXGXXH en la que las tres histidinas se unen al resto de  $Zn^{2+}$  formando el centro catalítico del enzima junto con otro catión de  $Zn^{2+}$  y dos cationes de  $Ca^{2+}$  que tienen papel estructural.<sup>83</sup> Todas las MMPs se caracterizan por la presencia de un átomo de zinc en el centro activo, seguido de un residuo de metionina. A continuación del dominio catalítico se encuentra una región denominada bisagra, caracterizada por su flexibilidad y riqueza en prolina, cuya función primordial consiste en unir el dominio catalítico con la región del extremo carboxilo terminal, semejante al dominio hemopexina. Este dominio, de unos 200 aminoácidos, se encuentra presente en todas las MMPs excepto en las matrilisinas y de manera general, su función consiste en mediar en la especificidad de sustrato, la interacción con otras proteínas, incluyendo los inhibidores endógenos de metaloproteinasas (TIMPs: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) y actuar como dominio transmembranario en el caso de que se ancle a membrana (**Figura 8**).<sup>84</sup>

### 5.1.2. Clasificación de las MMPs

Las MMPs se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios como la estructura o la especificidad de sustrato. Basándonos en la organización de los dominios que presentan, podemos dividir esta familia de endoproteasas en cuatro grupos: MMPs

---

<sup>83</sup> Hutter, R., et al. «Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury.» *Circulation*. 110 (2004): 2430-2435.

<sup>84</sup> Ra, H.J. & Parks, W.C. «Control of matrix metalloproteinase catalytic activity.» *Matrix. Biol.* 26 (2007): 587-596.

## ***Introducción***

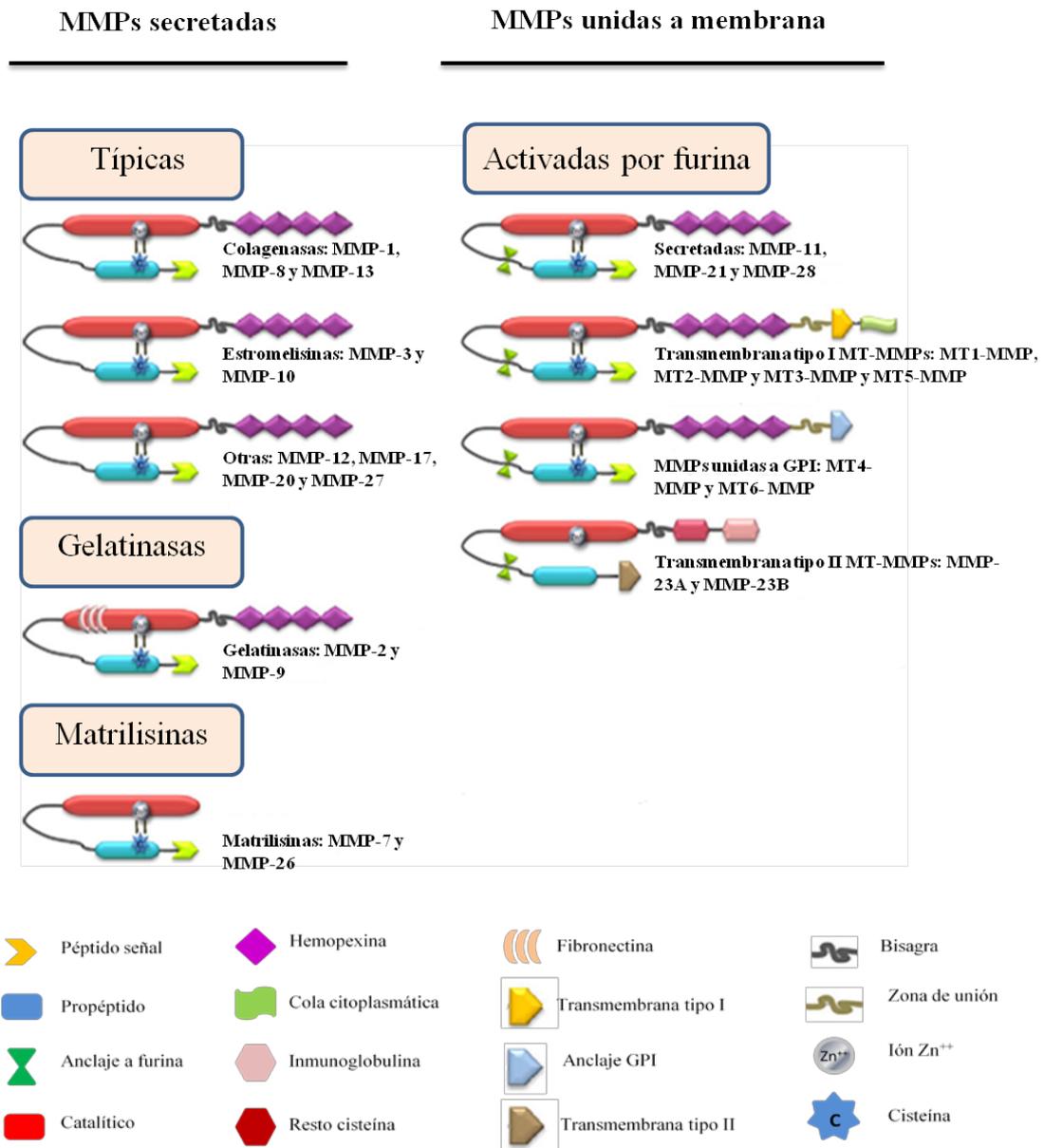
---

típicas, Gelatinasas, Matrilisinas y MMPs activadas por un grupo furina. Todas las MMPs son secretadas, aunque pueden localizarse en la membrana celular uniéndose a integrinas, a CD44, mediante interacciones con proteoglicanos, heparán sulfato o colágeno tipo IV. Adicionalmente, algunos de los miembros activados por el grupo furina se anclan covalentemente a la membrana (MT-MMPs) (**Figura 8**)<sup>82</sup> En referencia a este último aspecto, nuestro grupo de investigación ha profundizado en los mecanismos por los que MMP-13 es secretada a la matriz extracelular, habiendo descrito su unión a caveolina-1 a través del dominio hemopexina. La proteína caveolina-1 interacciona con NOS3 en la membrana en su forma inactiva, pero una vez activa genera NO que rompe el complejo MMP-13/caveolina-1 mediante la nitración específica de un residuo de la enzima, promoviendo así su liberación al medio extracelular.<sup>85</sup>

---

<sup>82</sup> Fanjul-Fernandez, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S. & Lopez-Otin, C. «Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models.» *Biochim. Biophys. Acta.* 1803 (2010): 3-19.

<sup>85</sup> Lopez-Rivera, E., et al. «Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102 (2005): 3685-3690.



**Figura 8. Clasificación de las MMPs.** Adaptado de Fanjul-Fernandez, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S. & Lopez-Otin, C. «Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models.» *Biochim. Biophys. Acta.* 1803 (2010): 3-19.

## ***Introducción***

---

### **5.1.3. Regulación de las MMPs**

La expresión de las MMPs está regulada en primera instancia a nivel transcripcional, lo que se traduce en niveles basales de estas proteínas en una situación fisiológica. Muchos de los miembros de la familia de las MMPs comparten elementos cis en sus secuencias promotoras, lo que permite un control en la especificidad celular. Las MMPs suelen co-expresarse o co-reprimirse en respuesta a múltiples estímulos, incluyendo citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, glucocorticoides o retinoides.<sup>86</sup> Concretamente se han descrito varios factores de transcripción que se unen a los promotores de las MMPs como NF-kB, MAPK, STAT o proteínas de la familia Smad. Estos intermediarios pueden ser activados por una gran variedad de ligandos como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y oncostatin M habiéndose comprobado que el bloqueo de estas vías de señalización puede reprimir la expresión de los genes MMP.<sup>87</sup> En particular, nuestro grupo puso de manifiesto el efecto del NO sobre la regulación de la expresión de MMP-13 en el endotelio vascular a través de la cascada de señalización ERK1/2, mediada por PKG,<sup>88</sup> y el efecto *in vivo* que el NO ejerce de forma negativa sobre la expresión de MMP13 en cardiomiocitos a través del sitio de unión E2F.<sup>89</sup>

Además del efecto sobre la transcripción génica, recientemente se ha descrito un efecto epigenético sobre la regulación de la expresión de estas enzimas. Concretamente en células tumorales y peritumorales, han sido descritas la metilación del DNA y la

---

<sup>86</sup> Yan, C. & Boyd, D.D. «Regulation of matrix metalloproteinase gene expression.» *J. Cell. Physiol.* 211 (2007): 19-26.

<sup>87</sup> Vincenti, M.P. & Brinckerhoff, C.E. «Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you?» *J. Cell. Physiol.* 213 (2007): 355-364.

<sup>88</sup> Zaragoza, C., et al. «Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells.» *Mol. Pharmacol.* 62 (2002): 927-935.

<sup>89</sup> Tarin, C., et al. «The extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN is a target of nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion.» *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011): 387-395.

acetilación de las histonas, como moduladores de la activación o represión de sus genes. Un ejemplo de ello es la metilación del promotor de MMP-9 en células de linfoma.<sup>90</sup>

Se han descrito una serie de eventos post-transcripcionales relevantes en el mecanismo de regulación de las MMP. Un ejemplo de ello son los puntos potenciales de modificación en las regiones 5'-3' no traducidas (UTRs: Untranslated Regions) donde se pueden unir factores que estabilicen o desestabilicen el RNA mensajero (mRNA: Messenger Ribonucleic Acid).<sup>91,92</sup>

Finalmente, recientes trabajos demuestran como los micro-RNA (mi-RNA: Micro Ribonucleic Acid) pueden participar también en la regulación de las MMPs. Un ejemplo de ello es el caso de MMP-13 que es modulado por el micro-RNA mir-9 en procesos de osteoartritis en humanos.<sup>93</sup> A este respecto, y tal y como hemos hallado en el presente trabajo, el papel del sistema inmunitario tiene una función clave en el remodelado patológico de los vasos, donde la implicación de las MMPs ejerce un papel fundamental.

---

<sup>90</sup> Chicoine, E., et al. «Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression.» *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002): 765-772.

<sup>91</sup> Akool el, S., et al. «Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR.» *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003): 4901-4916.

<sup>92</sup> Rydzziel, S., Delany, A.M. & Canalis, E. «AU-rich elements in the collagenase 3 mRNA mediate stabilization of the transcript by cortisol in osteoblasts.» *J. Biol. Chem.* 279 (2004): 5397-5404.

<sup>93</sup> Jones, S.W., et al. «The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13.» *Osteoarthritis Cartilage.* 17 (2009): 464-472.

### **6. El sistema inmunitario en la enfermedad cardiovascular**

El sistema inmunitario está constituido por un conjunto de mecanismos de defensa desarrollados para minimizar el efecto de un daño en el organismo. En vertebrados, el sistema inmunitario está dividido en dos grandes bloques denominados inmunidad innata o no adaptativa e inmunidad adaptativa, adquirida o específica.

La inmunidad innata es la primera en actuar ante una situación de peligro. A grandes rasgos, se caracteriza por presentar una respuesta rápida pero inespecífica y no va a conferir una inmunidad duradera ante el daño generado. Los distintos tipos de celulares que actúan durante esta respuesta son los macrófagos, células endoteliales, células dendríticas, células NK y neutrófilos.<sup>94</sup>

La inmunidad adaptativa se desencadena cuando los demás elementos del sistema inmune no son totalmente eficaces. Esta respuesta se caracteriza por ser específica, por la producción de anticuerpos y por presentar memoria inmunológica. En este caso, los componentes celulares implicados son los linfocitos B y T.<sup>95</sup>

La inflamación es un proceso que juega un papel fundamental en la progresión de las enfermedades cardiovasculares. Las células inmunes e inflamatorias como los macrófagos y los linfocitos, así como otros leucocitos, van a tener un papel crucial en la modulación del remodelado de la pared de los vasos.<sup>10</sup> Dentro de las distintas enfermedades cardiovasculares, podemos encontrar eventos que van a estimular la respuesta inflamatoria, como son el incremento de la expresión de moléculas de

---

<sup>10</sup> Mantovani, A., et al. «Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling.» *J. Pathol.* 229 (2013): 176-185.

<sup>94</sup> Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. & Ezekowitz, R.A. «Phylogenetic perspectives in innate immunity.» *Science.* 284 (1999): 1313-1318.

<sup>95</sup> Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. «Innate immune recognition and control of adaptive immune responses.» *Semin. Immunol.* 10 (1998): 351-353.

adhesión y sus ligandos, extravasación leucocitaria, activación de células inmunes, mayor producción de citoquinas y de sus receptores o el incremento del estrés oxidativo.

En esta tesis doctoral hemos centrado nuestros estudios en los macrófagos, ya que son un componente esencial de la inmunidad innata y participan de forma crucial en la inflamación y la defensa del organismo.

### **6.1. Los macrófagos en el desarrollo de la enfermedad vascular**

Los macrófagos son una forma madura de los monocitos de la sangre periférica una vez infiltran los tejidos/órganos. Los monocitos están presentes en mamíferos, aves, anfibios y peces. Además, en moscas se ha detectado una población relacionada que se denominan plasmatocitos.<sup>96</sup> En vertebrados adultos, una vez formados en la médula ósea fluyen al tejido sanguíneo donde tienen una vida media relativamente corta (24-72 h).<sup>97</sup> En ratón, los monocitos representan aproximadamente un 4% de las células de sangre periférica mientras que en humanos constituyen aproximadamente el 10%.<sup>98</sup> Su principal función es la de reemplazar a los macrófagos y células dendríticas residentes en los tejidos.<sup>99</sup>

En condiciones homeostáticas, los tejidos producen M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), citoquina que induce la maduración de los monocitos hacia

---

<sup>96</sup> Auffray, C., Sieweke, M.H. & Geissmann, F. «Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells.» *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009): 669-692.

<sup>97</sup> Whitelaw, D.M. «Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling.» *Cell. Tissue. Kinet.* 5 (1972): 311-317.

<sup>98</sup> Auffray, C., Sieweke, M.H. & Geissmann, F. «Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells.» *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009): 669-692.

<sup>99</sup> Tacke, F. & Randolph, G.J. «Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets.» *Immunobiology.* 211 (2006): 609-618.

## ***Introducción***

---

la formación de macrófagos.<sup>100</sup> Ya en el tejido, los macrófagos se caracterizan por ser células con alta capacidad fagocítica, y están implicados en múltiples procesos, tanto en homeostasis como durante la respuesta inmune inducida por daño tisular o la exposición a patógenos. Además, en función del microambiente en el que se encuentren van a adquirir fenotipos especializados para responder de una forma más precisa al estímulo recibido. Esta plasticidad en el fenotipo se conoce como polarización de los macrófagos.

### **6.1.1. Polarización de los macrófagos**

Actualmente se considera que la activación con IFN $\gamma$  (Interferon  $\Gamma$ ), sólo o en combinación con señales derivadas de patógenos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS: Lipopolysaccharide), promueve la denominada activación clásica de los macrófagos, también denominados M1. Estas células participan en la respuesta inmune pro-inflamatoria tipo 1<sup>101</sup> teniendo elevada capacidad citotóxica, microbicida y anti-proliferativa. La adquisición de estas propiedades es debida a la producción de mediadores tóxicos (ROS, RNS) y citoquinas pro-inflamatorias.<sup>102</sup>

Tradicionalmente, las funciones inflamatorias y citotóxicas de los macrófagos activados por la vía clásica hicieron postular que sólo las citoquinas Th1 promovían la activación de los macrófagos, mientras que las citoquinas Th2 las bloqueaban o desactivaban.<sup>103</sup> En los últimos años, sin embargo, se ha demostrado que las citoquinas Th2, además de inhibir las Th1, provocaban un aumento en funciones como

---

<sup>100</sup> Smith, J.D., et al. «Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, (1995): 8264-8268 .

<sup>101</sup> Gordon, S. «Alternative activation of macrophages.» *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003): 23-35.

<sup>102</sup> Nathan, C.F., Murray, H.W. & Cohn, Z.A. «The macrophage as an effector cell.» *N. Engl. J. Med.* 303 (1980): 622-626.

<sup>103</sup> Martinez, F.O., Helming, L. & Gordon, S. «Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.» *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009): 451-483.

presentación de antígeno, reparación tisular o capacidad endocítica. Debido a esta dicotomía Th1/Th2, se acuñó el término “activación alternativa” o macrófagos M2 para describir todos los macrófagos activados en ausencia de citoquinas tipo 1. Estos macrófagos son por tanto activados con citoquinas Th2 y varios estímulos anti-inflamatorios como las interleucinas IL-4, IL-13, IL-10, el TGF $\beta$ , inmunocomplejos y glucocorticoides.<sup>100,104,105</sup>

Aunque el término M2 fue inicialmente propuesto para definir aquellos macrófagos activados por IL-4/IL-13<sup>100</sup>, la gran variedad de estímulos anti-inflamatorios, combinado con la heterogeneidad y plasticidad de los macrófagos hizo que rápidamente fuera necesario subclasificar los macrófagos M2 en función del estímulo inductor. De esta manera, los macrófagos activados con IL-4 o IL-13 se denominaron M2a, los activados con IL-10 fueron denominados M2b y finalmente los macrófagos activados por glucocorticoides o inmunocomplejos se denominaron M2c (**Figura 9**).<sup>106</sup>

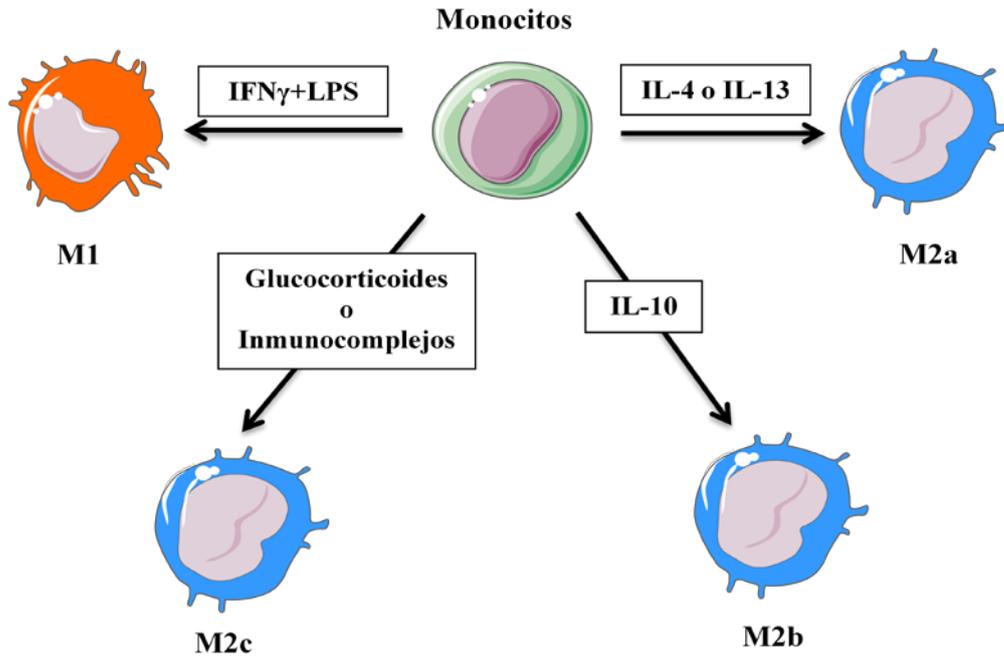
---

<sup>100</sup> Gordon, S. «Alternative activation of macrophages.» *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003): 23-35.

<sup>104</sup> Gordon, S. & Martinez, F.O. «Alternative activation of macrophages: mechanism and functions.» *Immunity.* 32 (2010): 593-604.

<sup>105</sup> Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. «Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression.» *J. Immunol.* 177 (2006): 7303-7311.

<sup>106</sup> Mantovani, A., et al. «The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.» *Trends Immunol.* 25 (2004): 677-686.



**Figura 9.** Esquema de la polarización de los macrófagos.

Recientemente, Kald y colaboradores, han propuesto la existencia de un nuevo subtipo de macrófagos, que está directamente asociado con un microambiente rico en LDL oxidadas como el que encontramos en la aterosclerosis. Este subtipo se ha denominado Mox, y se desarrollan a través de la vía de expresión regulada por el factor de transcripción Nrf2, en respuesta a fosfolípidos aterogénicos. Estos macrófagos se caracterizan por tener una baja capacidad fagocítica y quimiotáctica comparado con los macrófagos M1 y M2.<sup>107</sup>

<sup>107</sup> Kadl, A., et al. «Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2.» *Circ. Res.* 107 (2010): 737-746.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, y más específicamente en el contexto de las enfermedades cardiovasculares donde podemos encontrar multitud de estímulos diferentes, es preciso remarcar que dentro de todos estos grupos es posible definir numerosos estadios funcionales intermedios, lo que aumenta los posibles estados de activación de los macrófagos y por lo tanto la complejidad de este sistema.

El trabajo realizado en esta tesis doctoral ha estudiado en profundidad *por qué* la deficiencia en la producción de NO a través de NOS3, después de un proceso de denudado del endotelio, produce una proliferación y migración diferencial de las células endoteliales y musculares hacia la zona dañada, ocasionando un remodelado anómalo de la ECM, problema significativo y subyacente de todo proceso en el que la cateterización ha de ser una herramienta clave.

En este trabajo hemos desvelado cómo la respuesta inflamatoria generada es un factor crucial en el desarrollo de hiperplasia de la neoíntima en el vaso dañado, ya que dependiendo de la respuesta generada se producirán señales específicas encaminadas a una reparación correcta, si la respuesta inflamatoria generada es normal o una reparación anómala si la respuesta generada está alterada.

Por último y con el fin de encontrar una aplicabilidad en clínica de los resultados obtenidos, empleamos la técnica de RMN para detectar y sobre todo monitorizar la diferente permeabilidad en función de la producción de NO por parte del endotelio.

## **Materiales**

Los medios de cultivo generales proceden de BD Biosciences (España), el suero fetal era de BioWhittaker (Verviers, Bélgica), el medio EBM-2 (Lonza, San Diego, EEUU), BD cell recovery solution (MatriSpere), la solución de matrigel GFR proceden de Becton Dickinson (NJ, USA) y la gelatina para cultivo celular, junto con la tripsina, los antibióticos, IFN $\gamma$ , IL-4, LPS, Hematoxilina, Eosina, y el CFSE provienen de Sigma (España). Los anticuerpos primarios fueron obtenidos a partir de las siguientes fuentes: el anticuerpo frente a MMP13 murino proviene de Calbiochem (CN Biosciences, Reino Unido), los anticuerpos frente a MMP13 humano y el anticuerpo frente a la iNOS murina proceden de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU), el anticuerpo frente a GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) es de Chemicon (Millipore, Ibérica, España), el anticuerpo anti CD68 procede de Serotec (Düsseldorf, Alemania) el anticuerpo PECAM-1 de BD Pharmigen (NJ, EEUU), el anticuerpo frente a c-Myc de Millipore (Darmstadt, Alemania) y los anticuerpos frente a Sca1-FITC, c-Kit-PE-Cy7 y el Cócktel “biotin mouse lineage” (Lin-) proceden de BD Pharmigen (NJ, USA). El panel de 20 citoquinas de ratón y el Trizol son de Invitrogen (Madrid, España). El kit

## ***Materiales y Métodos***

---

miRNeasy es de Quiagen (Düsseldorf, Alemania). El kit de alta capacidad de cDNA es de Applied Biosystems (Madrid, España). Los compuestos L-NAME, 1400W y DETA-NO proceden de Enzo Life Sciences (NY, EEUU) y el sistema DAB con sustrato cromogénico es de Dako (Glostrup, Dinamarca).

### **Animales**

Nuestros animales fueron alojados en el animalario del CNIC en habitaciones aisladas. Todos los procedimientos animales han sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación del CNIC (Certificado PA-227/2) y conforme a la Directiva de la UE 86/609/EEC y Recomendación 2007/526/EC que atiende a la protección de los animales empleados en procedimientos experimentales y otros supuestos científicos, y al Real Decreto RD 1201/2005.

Los animales de genotipo salvaje de la cepa C57BL/6 (WT del inglés, wild type), los animales C57BL/6 KO (del inglés, knock ot) para NOS3 y los animales C57BL/6 KO para iNOS fueron adquiridos en Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EEUU). Los ratones C57BL/6 KO para MMP13 fueron donados por el Dr. Carlos López Otín (Universidad de Oviedo, España). Los ratones C57BL/6 dobles KO para NOS3 y MMP-13 fueron generados en nuestro laboratorio, mediante series de cruzamientos entre animales C57BL/6 KO en NOS3 con C57BL/6 KO para MMP-13. La primera generación fue cruzada entre ellos y la segunda generación fue genotipada por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos cebadores:

WT-NOS3-que se une a 5' (F): 5'-AGGGGAACAAGCCCAGTAGT-3'

NOS3- que se une a 3' (R): 5'-AATTCGCCAATGACAAGACG-3'

KO-NOS3-(F): 5'-CTTGTCCCCTAGGCACCTCT-3'

WT-MMP-13-(F): 5'-CCATATGGCTGATTCTGGATC-3'

KO-MMP13-(F): 5'-ATAGCCGAATAGCCTCTCCAC-3'

MMP-13-(R): 5'-CTACCCAGACAAGCAGTTTGC-3'

## **Células**

Las células endoteliales procedentes de aorta de ratón (MAEC: Mouse aortic endothelial cells) fueron crecidas en gelatina tal como fue descrito previamente.<sup>108</sup> Para su obtención, los ratones fueron sacrificados y aisladas sus aortas, las cuales fueron cortadas en secciones de 1 cm de longitud aproximadamente y puestas en cultivo con matrigel (gelatina compuesta por proteínas estructurales como laminina, entactina y colágeno, que aporta a las células endoteliales un ambiente similar al que poseen de forma natural) para favorecer el crecimiento y salida de las células de la aorta, a la matriz de la placa. Tras alcanzar la confluencia celular, se procedió a eliminar los restos de tejido, transfiriendo el matrigel (con las células) a una solución comercial (*Cell Recovery Solution*) para el aislamiento de las células alojadas en la matriz. Para ello, la muestra fue incubada durante 1 h a 4°C, favoreciendo el retorno de la solución al estado líquido original. A continuación, las células fueron separadas del matrigel mediante centrifugación a 600 g, 4°C durante 5 min, resuspendiendo el *pellet* de células resultante con el medio de cultivo endotelial. Las células fueron sembradas en una matriz de gelatina al 0.1% para estimular su anclaje y proliferación en la placa de cultivo. Una vez

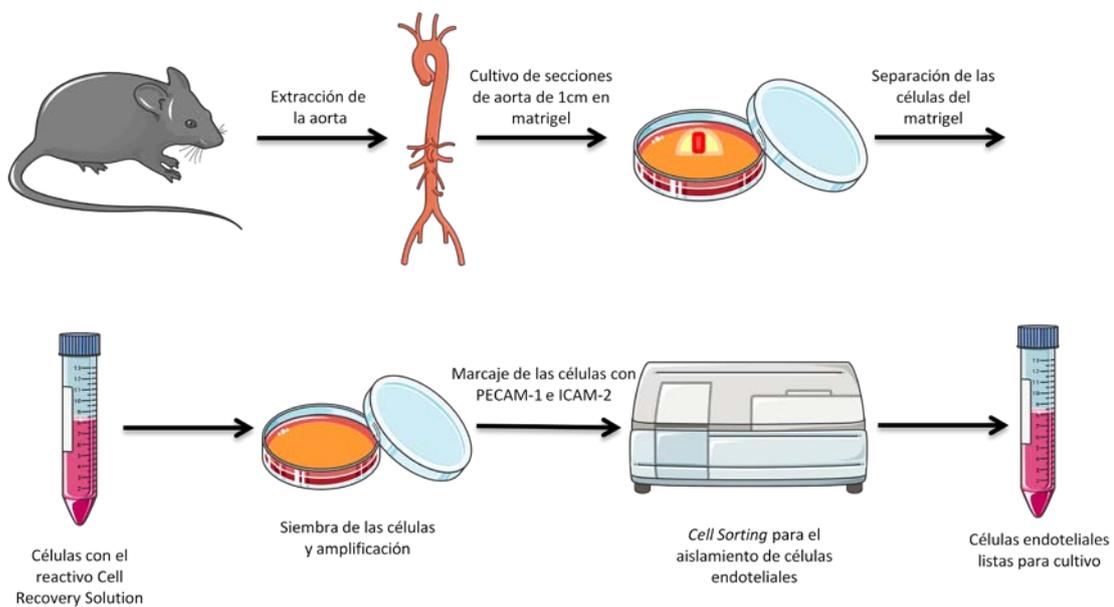
---

<sup>108</sup> López-Rivera, E., et al. «Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration.» *P.N.A.S.* 102 (2005): 3685-90.

## ***Materiales y Métodos***

---

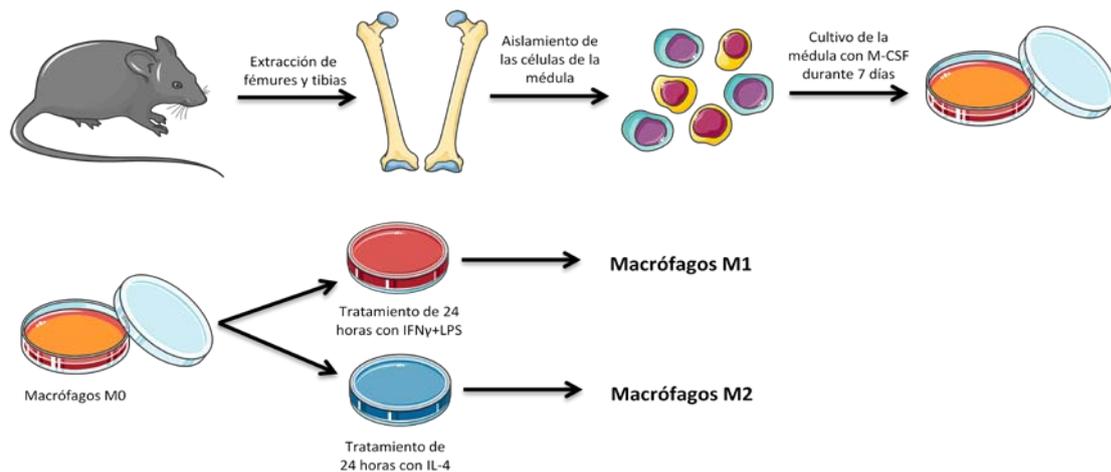
alcanzaron un nivel de confluencia significativo, procedimos a la selección de las mismas, empleando los anticuerpos PECAM-1 e ICAM-2 como marcajes específicos del endotelio y separando de forma selectiva las células con marcaje empleando separación celular por citometría de flujo o *Cell Sorting*. Este procedimiento se basa en la separación física de partículas en base a la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por técnicas de citometría de flujo analítica (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema del aislamiento de las MAEC.

Los macrófagos derivados de la médula ósea (BMDMs: Bone Marrow derived macrophages) fueron obtenidos mediante la extracción de la médula de tibias y fémures con tampón PBS frío y pasando las células a través de un filtro (70  $\mu$ m de diámetro de 60

poro). Las células ( $7 \times 10^6$ ) fueron sembradas en placas de 100 x 20 mm con 10 mL de medio RPMI 1640, suplementado con 10% de medio condicionado de las células L929, como fuente del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor). Las células fueron incubadas a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días para obtener un 95% de células derivadas de médula ósea CD11<sup>+</sup>. La mitad de las células fueron tratadas con 20 ng/mL de IFN $\gamma$  ( Interferon  $\gamma$ ) y 100 ng/mL de LPS (Lipopolisacárido) durante 24 h, como medio de obtención de macrófagos pro-inflamatorios M1, mientras que el resto se trató con 20 ng/mL de IL-4 ( Interleucina-4) durante 24 h para obtener macrófagos M2, tal y como fue descrito (Figura 2).<sup>109</sup>



**Figura 2.** Esquema del aislamiento de macrófagos derivados de médula ósea.

<sup>109</sup> Pello, O.M., et al. «Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology.» *Blood*. 119 (2012): 411-21.

## ***Materiales y Métodos***

---

Las células musculares lisas (VSMC del inglés, Vascular Smooth Muscle Cells) fueron donadas por el laboratorio del Dr. Vicente Andrés.

### **Denudado endotelial en ratón**

Con el fin de eliminar el endotelio vascular de la región abdominal de las aortas, utilizamos ratones de entre 8 y 12 semanas, los cuales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg). Tras la anestesia, los animales fueron laparomizados de forma vertical practicando una sección abdominal de 2 cm de longitud. A continuación, y con la ayuda de un microscopio quirúrgico (Leica, Wetzlar, Alemania), procedimos al aislamiento y oclusión temporal de la aorta abdominal entre las arterias renales y la bifurcación de las iliacas, creando una incisión en la misma con una aguja de 30G de grosor. El orificio creado fue utilizado para insuflar 1mL suero fisiológico bajo presión de 100 mmHg, eliminando de esta forma las células endoteliales. Una vez realizado el procedimiento, la incisión fue sellada, se eliminó la oclusión arterial y se verificó el retorno de flujo sanguíneo a través de la aorta abdominal, proceso tras el cual se suturó la musculatura y la piel y los animales fueron aislados para su completa recuperación y posterior experimentación (**Figura 3**).

Los animales de experimentación, tanto los respectivos controles como los sometidos al procedimiento quirúrgico, fueron analizados tanto en el momento del proceso, a los 7 días, a los 15 días y a los 30 días tras el denudado endotelial.

En el caso de los estudios de imagen molecular, las aortas fueron analizadas por resonancia magnética nuclear (RMN) a lo largo de 7, 15 y 30 días tras el denudado endotelial. Después de la obtención de la imágenes correspondientes, los tejidos fueron

utilizados para llevar a cabo análisis adicionales, que serán explicados detalladamente en la sección de resultados. Todos los procedimientos utilizados para este estudio fueron realizados de acuerdo con la legislación vigente en el Reino Unido.



***Figura 3.** Imágenes del protocolo quirúrgico de denudado endotelial.*

### **Análisis histológico**

Para realizar el estudio de los cambios producidos en el grosor de la pared vascular, sacrificamos los animales y extrajimos y fijamos las aortas con formaldehído al 10% a 4°C durante 48 h. Pasado ese tiempo, el tejido fue procesado e incluido en bloques de parafina, utilizados para el corte de la aorta en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor. La estructura y morfología de la aorta fue evaluada empleando la tinción de Hematoxilina-Eosina. Para ello, las muestras fueron calentadas a 65°C durante 15 min y

## ***Materiales y Métodos***

---

a continuación fueron introducidas 15 min en xileno e hidratadas con pases decrecientes de etanol de 5 min cada uno. Las preparaciones listas para su tinción fueron introducidas en la solución Hematoxilina durante 10 min, lavando el exceso de tinción con agua destilada durante 5 min, para posteriormente ser incubadas en la solución de Eosina durante 30 s aproximadamente. Finalmente las muestras fueron montadas para su posterior evaluación por microscopía de campo claro.

Para analizar el número de células endoteliales presentes en la región denudada a los distintos tiempos, procedimos a visualizar las mismas empleando la técnica de inmunofluorescencia mediante microscopia confocal SP5 (Leica, Wetzlar, Alemania), utilizando anti-PECAM-1. Este marcador de endotelio nos permitió evaluar la recuperación endotelial a lo largo de los días posteriores al procedimiento quirúrgico.

### **Microscopía confocal**

Las proteínas fueron detectadas por microscopia confocal en secciones de tejidos embebidos en parafina. Para ello, las muestras se calentaron a 60°C durante 10-15 min y se introdujeron primero en xileno 10 min y posteriormente en pases decrecientes de etanol de 5 min cada uno, para hidratar el tejido. A continuación, se realizó el desenmascaramiento antigénico introduciendo las muestras en agua destilada calentada hasta su ebullición, ya que la mayoría de los epítomos antigénicos están enmascarados por el formaldehído. Tras este paso las muestras se incubaron durante 7 min con agua oxigenada al 3% para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, lavándose posteriormente durante 15 min con PBS. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, incubamos las preparaciones con suero no inmune BSA al 1% durante 20 min en cámara húmeda, proceso tras el cual, incubamos las mismas con los

correspondientes anticuerpos primarios durante 16 h a 4°C. Al día siguiente, lavamos las muestras con PBS durante 15 min y las incubamos a temperatura ambiente durante 2 h en cámara húmeda con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo específico, para su posterior detección por microscopía confocal. Pasado ese tiempo, se lavaron las muestras de nuevo con PBS y se incubaron con Hoechst durante 1 h para teñir los núcleos de las células. Por último, se montaron con una solución de glicerol/ citifluor al 50%.

### **Inmunofluorescencia *en face* para la detección de macrófagos**

La detección de macrófagos tanto inflamatorios (M1), como resolutivos (M2) se llevó a cabo *ex vivo* en las aortas abdominales de los animales de experimentación. Las aortas fueron extraídas de los animales y cortadas de forma longitudinal para su incubación con los anticuerpos anti-CD68, anti-iNOS o anti-c-Myc, que reconocen macrófagos totales, macrófagos M1 y macrófagos M2 respectivamente. Tras la incubación, los segmentos fueron lavados tres veces con PBS, y a continuación se visualizaron en preparaciones *en face* mediante microscopía confocal. Las imágenes de fluorescencia fueron capturadas a una aumento x10. Tras su adquisición, la intensidad de señal correspondiente fue analizada utilizando el software de análisis de imágenes “Imaris x64 7.3.1” (Bitplane, Zurich, Suiza), evaluando al menos cinco campos completos por cada sección analizada. Gracias a esta técnica pudimos evaluar en una gran sección de la aorta focos de inflamación completos discriminando células doblemente positivas que expresan CD68/iNOS (M1), de las que expresan CD68/c-Myc (M2).

### **Inmunohistoquímica**

Los tejidos procedentes tanto de las aortas de ratón como de las biopsias humanas, fueron embebidos en parafina para ser seccionados en cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de grosor. La morfología del vaso fue monitorizada mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina y visualizada mediante microscopía de campo claro. La expresión de las distintas proteínas fue evaluada mediante la incubación de las secciones histológicas con suero pre-inmune, lavadas 5 min con tampón PBS, y posteriormente incubadas durante 16 h con el correspondiente anticuerpo primario. Al día siguiente, las secciones se lavaron con tampón PBS y fueron incubados con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa. Los complejos inmunoreactivos fueron detectados utilizando como sustrato la enzima fosfatasa alcalina.

### **Aislamiento de RNA y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)**

Para llevar a cabo el aislamiento del RNA total procedente tanto tejidos como de los cultivos celulares, se utilizó el método del Trizol como previamente fue descrito.<sup>110</sup> Empleando 1  $\mu\text{g}$  del RNA aislado llevamos a cabo la reacción de retrotranscripción para sintetizar el correspondiente cDNA en una mezcla total de reacción de 20  $\mu\text{L}$  empleando el kit de alta capacidad de cDNA, según las instrucciones recomendadas por el fabricante. El cDNA una vez sintetizado fue utilizado como molde en reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR del inglés, quantitative polymerase chain reaction) utilizando los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

---

<sup>110</sup> Pello, O.M., et al. «In vivo inhibition of c-MYC in myeloid cells impairs tumor-associated macrophage maturation and pro-tumoral activities.» *PLoS One*. 7 (2012): e45399.

Arg1-(F): 5' - CAGAAGAATGGAAGAGTCAG -3'

Arg1-(R): 5' - CAGATATGCAGGGAGTCACC -3'

NOS2-(F): 5' - TGCATGGACCAGTATAAGGCA -3'

NOS2-(R): 5' - GCTTCTGGTCGATGTCATGAG -3'

MMP-13-(F): 5' - TGATGGCACTGCTGACATCAT -3'

MMP-13-(R): 5' - TGTAGCCTTTGGAACTGCTT- 3'

c-Myc- (F): 5' - GAGCTGTTTGAAGGCTGGATTT- 3'

c-Myc- (R): 5' - TCCTGTTGGTGAAGTTCACGTT- 3'

Cada condición experimental fue evaluada por triplicado y estadísticamente analizada mediante el test estadístico t-de Student con dos colas. Todos los datos fueron normalizados utilizando el gen control GAPDH. Los resultados obtenidos fueron expresados en unidades arbitrarias.

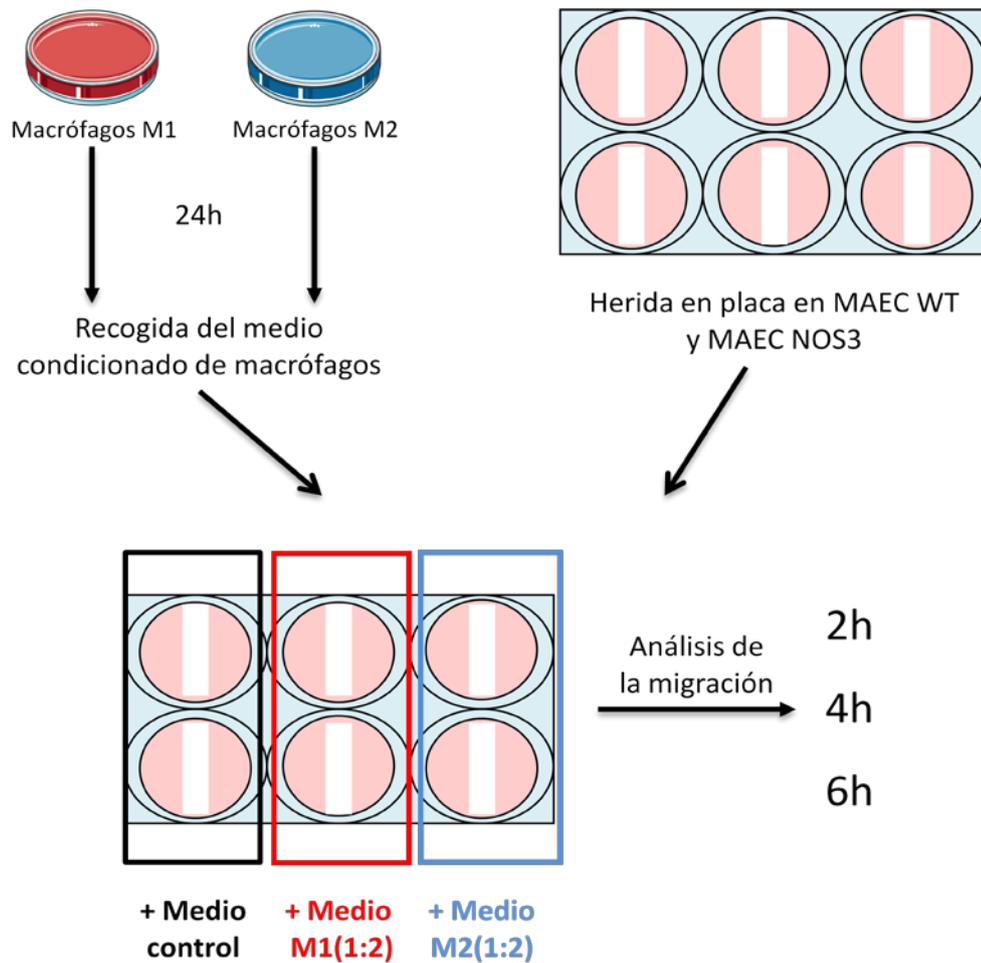
## **Ensayos de migración y proliferación**

Para los ensayos de migración y proliferación de las células endoteliales de ratón (MAEC), utilizamos medio condicionado de macrófagos M1 y M2, aislados y polarizados como hemos descrito previamente en esta sección. Tras su crecimiento, el medio de cultivo original fue descartado y las placas de cultivo lavadas dos veces con tampón PBS. Cada placa fue suplementada con 2 mL de medio fresco de cultivo el cual, tras 24 h de incubación con los macrófagos, fue utilizado como medio condicionado de macrófagos para los ensayos de migración y proliferación endoteliales. Para los ensayos

## ***Materiales y Métodos***

---

de migración, las MAEC fueron crecidas en placas de 24 pocillos y las correspondientes monocapas celulares, una vez confluentes, fueron seccionadas con una hoja de un bisturí, e incubadas con medio fresco de cultivo (grupo control) o con medio condicionado de macrófagos M1 o M2. La migración celular fue monitorizada mediante la adquisición de imágenes microscópicas a tiempos regulares de 30 min mediante el uso de un microscopio Nikon *Time Lapse* Eclipse Ti (Melville, EEUU) con placa automatizada y calefactada, cuantificando la velocidad de migración mediante el uso del software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU) (**Figura 4**).



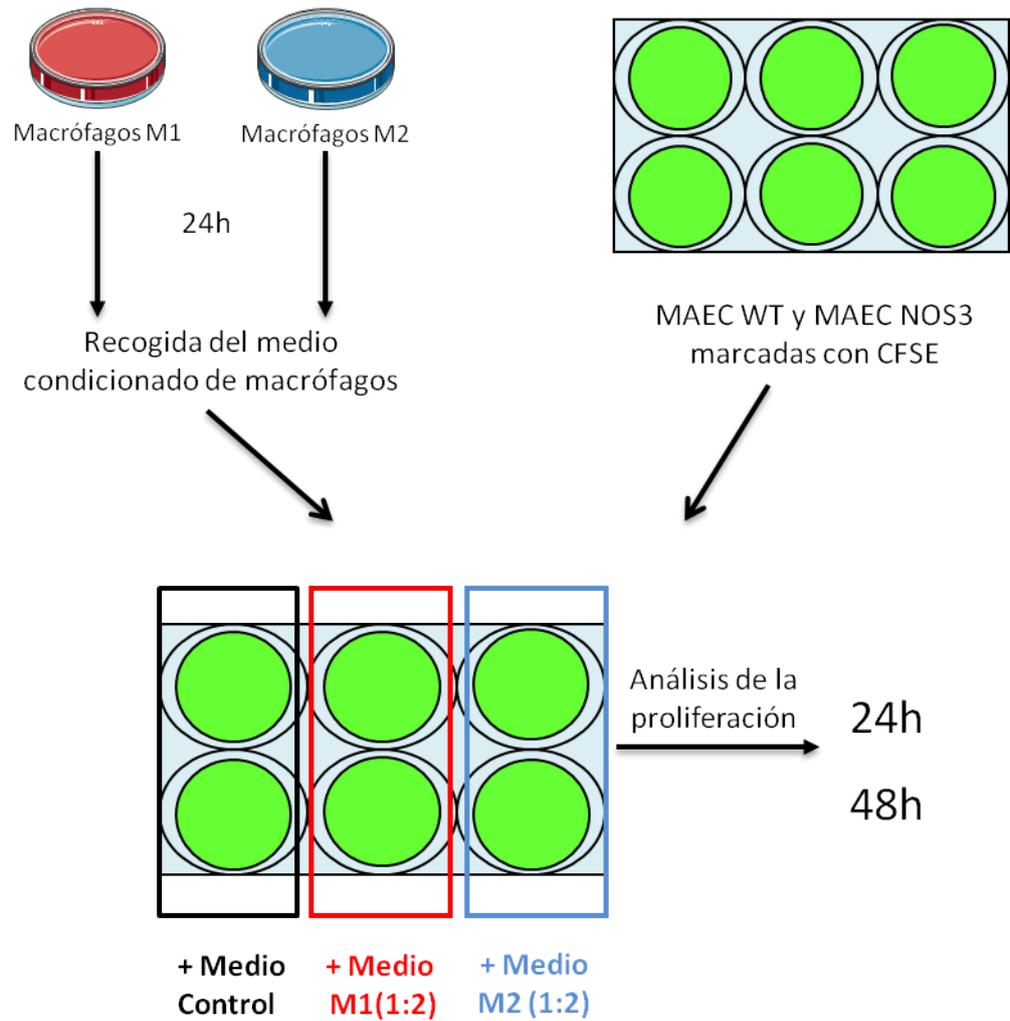
**Figura 4.** Protocolo empleado para el estudio de la migración celular.

Para los ensayos de proliferación, las MAEC fueron teñidas durante 5 min con 5  $\mu$ L del reactivo CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester), tinción fluorescente frecuentemente utilizada para evaluar proliferación celular, y a continuación cultivadas con medio control o medio condicionado de macrófagos. La proliferación en las MAEC

## ***Materiales y Métodos***

---

fue cuantificada por citometría de flujo y calculada como la reducción de la intensidad de fluorescencia del CFSE después de 24 y 48 h de incubación (**Figura 5**).



***Figura 5.** Protocolo empleado para el estudio de la proliferación celular.*

## **Evaluación de la expresión de citoquinas mediante ensayo Multi-plex**

El patrón de expresión de citoquinas a lo largo de los distintos tiempos de experimentación fue realizado mediante el sistema comercial Multi-plex (ver reactivos) utilizando suero procedente de la sangre de los ratones de experimentación, o a través del uso de los sobrenadantes procedentes de cultivos celulares, de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante.

Para preparar el suero de ratón, la sangre periférica fue incubada durante 30 min a 37°C y después a 4°C durante 2 h. A continuación la sangre fue centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4°C. Una vez obtenidos los sueros se almacenaron a -80°C para su conservación hasta la realización del Multi-plex.

Los medios de cultivo se obtuvieron a partir de MAEC crecidas en placas de 6 pocillos. En el momento en el que obtuvimos una monocapa confluyente de células realizamos el procedimiento de herida en placa empleando una hoja de bisturí. Los cultivos se lavaron con tampón PBS y se añadió medio fresco, el cual fue aislado a distintos tiempos durante la experimentación celular para analizar las citoquinas presentes en él.

## **Transplante de médula ósea**

Para los ensayos de transplante de médula ósea irradiamos ratones de 4 semanas de edad con dos dosis de 6,5 Gy (13 Gy en total), manteniendo un espacio de 3 h entre cada irradiación. Al cabo de 24 h, procedimos al transplante de  $30 \times 10^6$  células procedentes de la médula ósea del donante, tiempo tras el cual, los animales fueron sometidos a su recuperación durante cuatro semanas adicionales. Tras este periodo los

## ***Materiales y Métodos***

---

ratones fueron sometidos al procedimiento quirúrgico del denudado de la aorta abdominal para su posterior experimentación.

### **Citometría de flujo**

Para caracterizar la composición de la médula ósea en condiciones basales en los animales WT y KO para NOS3 se sacrificaron ratones de 8 semanas, aislando la médula ósea presente en los fémures y las tibias. Después de la extracción, las médulas se pasaron a través de un filtro de 70µm y las células fueron marcadas con los anticuerpos específicos Sca1-FITC, c-Kit-PE-Cy7 y el Cocktel “*biotin mouse lineage*” (Lin<sup>-</sup>), a fin de detectar las células progenitoras multipotentes LSK (Lin<sup>-</sup> Sca1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup>), caracterizadas por ser la población más primitiva de células progenitoras hematopoyéticas capaces de generar todos los tipos celulares maduros que podemos encontrar en sangre. Para el análisis de las médulas marcadas se empleó citometría de flujo usando un citómetro FACSCanto (BD Biosciences).

### **Aislamiento de células progenitoras endoteliales (EPCs)**

Para el aislamiento de las células progenitoras endoteliales (EPCs), sacrificamos ratones de entre 8 y 12 semanas, aislando la médula ósea presente en los fémures y las tibias. Tras la extracción, las médulas fueron homogeneizadas y cultivadas en placas con fibronectina en medio EBM-2 suplementado con FBS, VEGF, VEGF-1, FGF-2, EGF, IGF y ácido ascórbico. A continuación, las células fueron seleccionadas mediante la expresión de los marcadores PECAM-1 (CD31) y VEGFR2 (Flk-1). Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células a los ratones un día después del denudado endotelial.

## **Protocolo *in vivo* de MRI**

Las imágenes *in vivo* de la pared vascular fueron realizadas utilizando un equipo de MRI de 3 T, modelo Philips Achieva (Philips Healthcare, Best, Holanda) equipado con un sistema clínico de bobinas de gradiente ( $30 \text{ mT m}^{-1}$ ,  $200 \text{ mT/m/ms}$ ) y con una bobina receptora de superficie de una vuelta (diámetro= 47 mm). Las imágenes fueron adquiridas colocando a los ratones en tendido prono, 30 min después de la administración intravenosa de  $0,03 \text{ mmol/kg}$  de gadofosveset (Bayer Schering Pharma AG, Berlín, Alemania) y mantenidos con anestesia gaseosa (2% de isoflurano en oxígeno) durante los experimentos de resonancia. Después de un primer escaneo de exploración, realizamos una angiografía de contraste que nos permitió ver la aorta abdominal, las arterial renales y las arterias iliacas con un campo de visión (FOV: Field of view) de  $35 \times 35 \times 12 \text{ mm}$ , en una matriz de  $233 \times 233$  y una resolución en plano de  $0.15 \times 0.15 \text{ mm}$  (reconstruido  $0.10 \times 0.10 \text{ mm}$ ), con un grosor del plano de  $0.5 \text{ mm}$ , un tiempo de repetición/tiempo de eco (TR/TE) de  $28/6 \text{ ms}$  y ángulo de giro de  $40^\circ$ . Utilizamos la máxima intensidad de proyección de las imágenes para planear las secuencias *delayed enhancement* (DE) y el mapa  $T_1$ . A continuación se planeó una secuencia *2D-Look-Locker* perpendicular a la aorta abdominal, que fue empleada para determinar el tiempo de inversión (TI) en el que la sangre queda visualmente anulada. Los parámetros de adquisición fueron: FOV= $30 \times 30 \text{ mm}$ , matriz= $76 \times 76$ , plano de resolución= $0.39 \times 0.39 \text{ mm}$ , grosor del plano= $2 \text{ mm}$ , TR/TE= $19/8.2 \text{ ms}$ , TR entre los pulsos IR= $1000 \text{ ms}$  y un ángulo de giro de  $10^\circ$ . para visualizar por resonancia la captación del agente de contraste a través de la secuencia DE, se planeó la secuencia denominada *3D fast gradient echo*. Los parámetros de imagen fueron FOV= $35 \times 35 \times 12 \text{ mm}$ , matriz= $348 \times 348$ , plano de resolución= $0,1 \times 0,1 \times 1 \text{ mm}$ , número de planos= $24$ , TR/TE= $27/8 \text{ ms}$ , TR entre los pulsos IR= $1000 \text{ ms}$  y ángulo de giro de  $30^\circ$ . El mapa  $T_1$  fue realizado utilizando la secuencia que emplea dos pulsos de inversión no selectivos

## ***Materiales y Métodos***

---

con tiempos de inversión que oscilaban entre los 20 ms y los 2000 ms, seguidos de 8 lecturas segmentadas que dieron lugar a 8 imágenes individuales. Las imágenes captadas generaron un bloque de 16 imágenes por plano con tiempos de inversión crecientes. Los parámetros para la adquisición del mapa  $T_1$  fueron: FOV=36x22x10 mm, matriz= 180x102, plano de resolución= 0.2x0.2x0.5 mm, número de planos=16, TR/TE=9/4.6 ms y ángulo de giro de  $10^\circ$ . Los valores de  $T_1$  fueron calculados píxel por píxel usando el software interno para MATLAB (MATLAB R2010b, The Mathworks, Inc, Natick, Massachusetts, EEUU).

El área de la pared del vaso fue calculada definiendo manualmente la región de la pared con captación de gadofosveset en las imágenes de DE usando el software OxiriX (Fundación OxiriX, Ginebra, Suiza). Para asegurarnos de que el área definida se correspondía con la pared del vaso, las imágenes DE se co-registraron y fusionaron con las imágenes de la angiografía.

### **Tinción con Evans Blue**

Con el propósito de determinar y cuantificar *ex vivo* el grado de permeabilidad vascular en la zona desnuda, utilizamos la técnica de tinción con el reactivo Evans Blue (EB). Para ello, con los animales anestesiados con isoflurano, inyectamos en el ventrículo izquierdo 100  $\mu$ l de la solución de EB (1% en PBS) y 10 min más tarde aislamos, lavamos y pesamos la aorta abdominal. A continuación, las muestras fueron incubadas con 300  $\mu$ L de formamida al 4% durante 24 h a  $60^\circ\text{C}$ , midiendo posteriormente la absorbancia del homogeneizado a 620 nm e interpolando los valores obtenidos en una curva patrón obtenida a partir de diferentes concentraciones conocidas de EB puro.

## **Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Para los ensayos de TEM, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de ketamina/xilacina y a continuación fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con suero salino. Las aortas se aislaron y fijaron en glutaraldehído 0.1 M al 2% en tampón fosfato sódico (pH=7.4) durante 2 h, lavadas con tampón de fosfato sódico durante 2 h y finalmente post-fijadas con tetraóxido de Osmio (OsO<sub>4</sub>) durante 2 h adicionales. Cada aorta fue dividida en tres niveles (alto, medio y bajo) empezando desde la bifurcación renal izquierda hasta la bifurcación de las iliacas para su procesamiento mediante análisis histológico. Las muestras fueron deshidratadas a través de series graduales de etanol y posteriormente fueron embebidas en resinas epoxi que nos permitieron preparar secciones histológicas de 0.2 μm de grosor, las cuales fueron teñidas con azul de toluidina para su examen mediante microscopía de campo claro, a modo de guía para las muestras utilizadas en los ensayos de TEM. Para estos últimos, se obtuvieron secciones ultra-finas de 0.09 μm de espesor que fueron doblemente teñidas con acetato de uranilo y citrato, visualizándose en un equipo H7650, (Hitachi, Tokyo, Japón).

## **Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como media ± desviación típica y analizados empleando el software GraphPad-Prism (GraphPad software, LaJolla, CA, EEUU). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de  $p < 0,05$  determinado con un test *t*-Student con dos colas para ensayos realizados con dos condiciones experimentales o mediante un test de análisis de varianza (ANOVA)

## ***Materiales y Métodos***

---

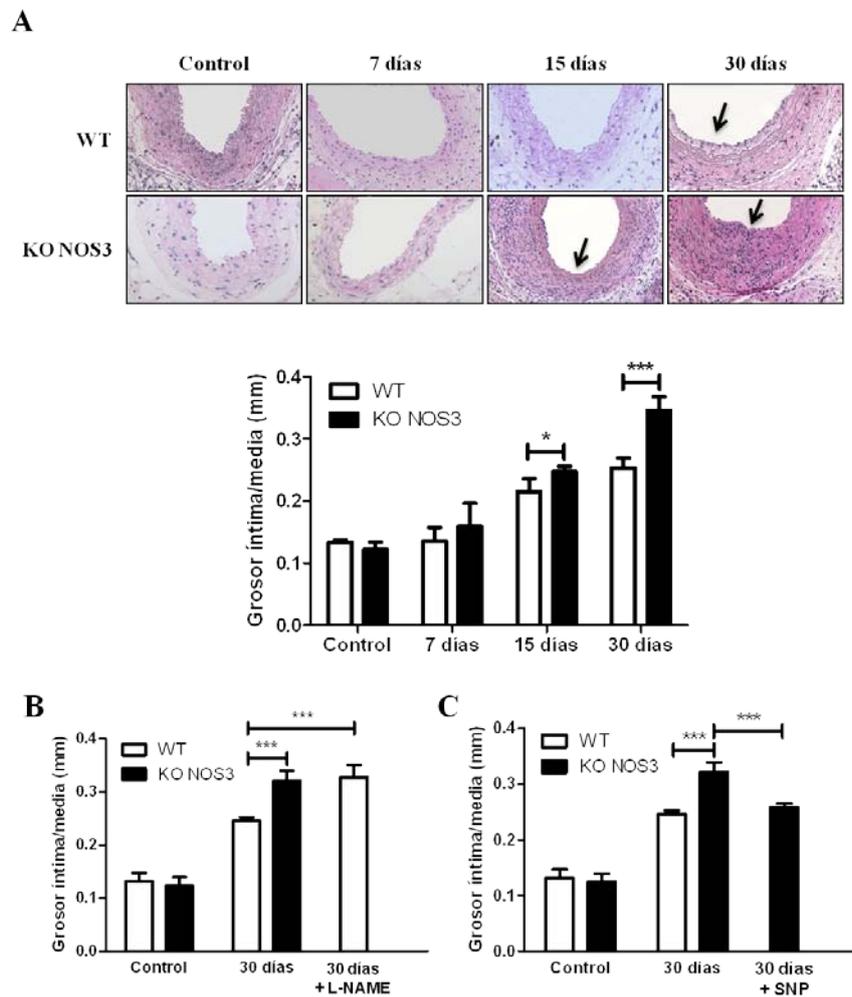
seguido de un test Bonferroni en el caso de ensayos con más de dos condiciones experimentales.

## **1. La pérdida de NOS3 promueve la formación de neointima**

Debido a la importancia que el NO tiene en el mantenimiento del tono vascular, la inhibición de la proliferación del músculo liso y el favorecimiento de la migración de las células endoteliales, quisimos determinar la importancia del NO producido por NOS3 en la remodelación de los vasos sanguíneos. Para ello, empleamos ratones WT (*wild type*, salvajes) y ratones KO (*knock out*, deficientes) para el gen NOS3 en los que fue realizado el procedimiento quirúrgico de denudado endotelial de la aorta, en la región comprendida entre las arterias renales y la bifurcación de las ilíacas. Para estudiar la estructura del vaso se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina analizando las muestras 7, 15 y 30 días después de la cirugía, comprobando como a los 30 días después del denudado, los animales KO para NOS3 habían desarrollado una hiperplasia de la neointima significativamente mayor que los animales WT (**Figura 1A**).

Para comprobar que el NO generado por la enzima NOS3 era responsable de las diferencias encontradas en el grosor de la pared de los vasos, se administró de forma exógena el donador de NO SNP (Sodium Nitroprosside), que es un compuesto que interviene en la vasodilatación, provocando vasorrelajación del músculo liso. En este caso, observamos una disminución del remodelado vascular en los animales KO para NOS3 (**Figura 1B**). Por otro lado, en animales WT se administró el inhibidor de NOS3 L-NAME (L-Nitroarginine Methyl Ester) manifestándose un aumento en el grosor de la pared del vaso similar a la encontrada en los animales KO para NOS3 (**Figura 1C**).

## Resultados



**Figura 1. La pérdida de NOS3 promueve la formación de neointima.** (A) Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) de secciones de aorta en animales WT y KO para NOS3 en condiciones basales y después del denudado endotelial (7, 15 y 30 días) y determinación del grosor de la íntima/media de la pared del vaso ( $n=6$  animales/ grupo/ día). (B) Grosor de la íntima/media de aortas denudadas de animales WT, KO para NOS3 y WT a los que se les administró i.p. 50mg/kg/día del inhibidor de la NOS L-NAME ( $n=3$  animales/ grupo/ día). (C) Grosor de la íntima/media de aortas denudadas de animales WT, KO para NOS3 y KO para NOS3 a los que se les administró i.p. 0.25mg/kg/día del donador de NO SNP ( $n=3$  animales/ grupo/ día). En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*  $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

## **2. La pérdida de NOS3 dificulta la recuperación de la capa endotelial**

Estudios previos a esta tesis doctoral elaborados en nuestro laboratorio, demostraron cómo el NO es crucial en la migración de las células endoteliales *in vitro*<sup>111</sup>, lo que nos indujo a evaluar cómo era la recuperación del endotelio en nuestro modelo quirúrgico y si efectivamente era dependiente de NO. Para ello, realizamos un análisis inmunohistoquímico para la detección de PECAM-1 (marcador de endotelio), con el que pudimos observar cómo la regeneración de la capa íntima era significativamente menor en los animales KO para NOS3 a lo largo del tiempo de experimentación (**Figura 2A**).

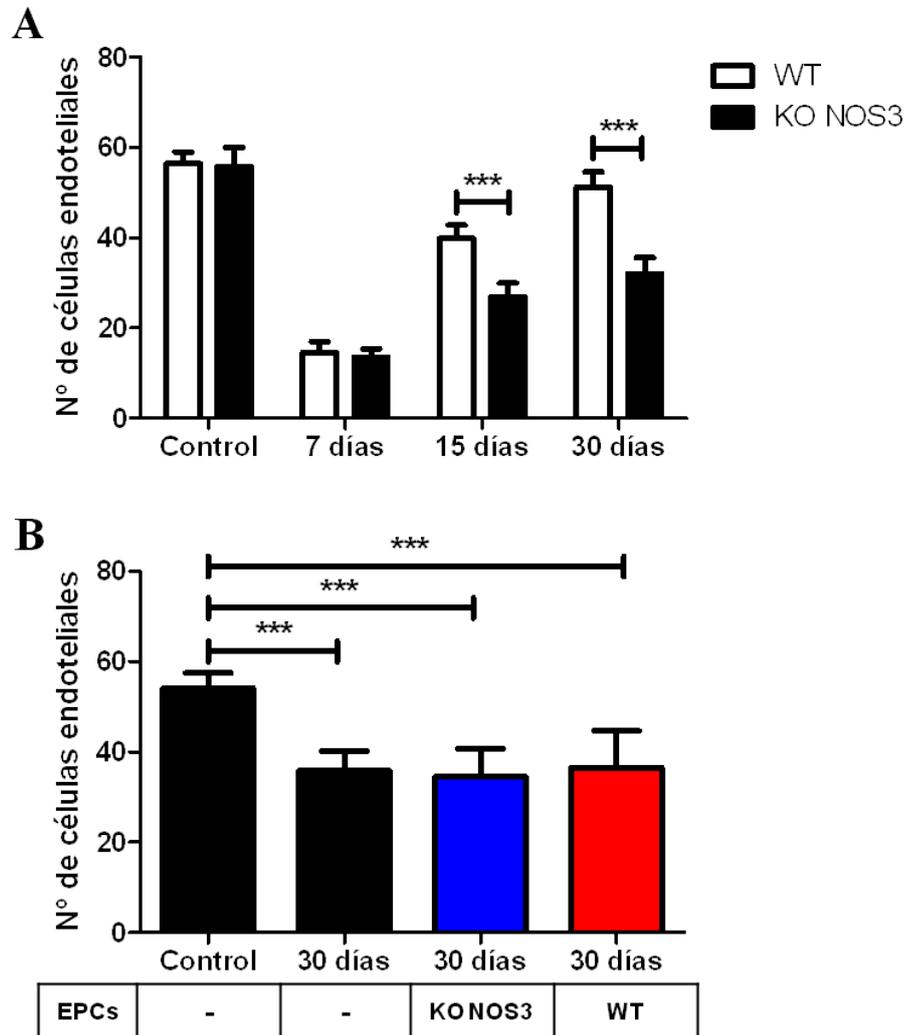
El concepto de reparación endotelial, entendido como la movilización del endotelio adulto, ha cambiado a lo largo del tiempo desde que se descubrió la existencia de las células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs: Endothelial Progenitor Cells) y su posible función positiva en el re-tapizado de los vasos sanguíneos<sup>112</sup>. Con el objeto de evaluar su contribución en nuestro sistema, procedimos al aislamiento de EPCs procedentes de animales WT o KO para NOS3, para su posterior inyección en animales KO para NOS3, no observando diferencias significativas con respecto a los ratones no tratados (**Figura 2B**).

---

<sup>111</sup> López-Rivera E et al. Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *PNAS* 102 (2005): 3685–3690.

<sup>112</sup> Xu, Q et al. Progenitor cells in vascular repair. *Current opinion in lipidology*. 18 (2007): 534-539.

## Resultados



**Figura 2. La pérdida de NOS3 dificulta la recuperación de la capa endotelial.** (A) Inmunohistoquímica para PECAM-1 de secciones de aorta en animales WT y KO para NOS3 después del denudado endotelial (control, 7, 15 y 30 días) y determinación del número de células endoteliales ( $n=6$  animales/ grupo/ día). (B) A los animales WT y KO para NOS3 previamente denudados, se les administró semanalmente i.v.  $10^6$  EPCs. Los animales fueron sacrificados a intervalos regulares y sus aortas cortadas y teñidas con H-E, para el recuento de las células endoteliales ( $n=6$  animales/ grupo/ día). En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0.001$ .

### **3. El trasplante de médula ayuda en la recuperación del vaso dañado**

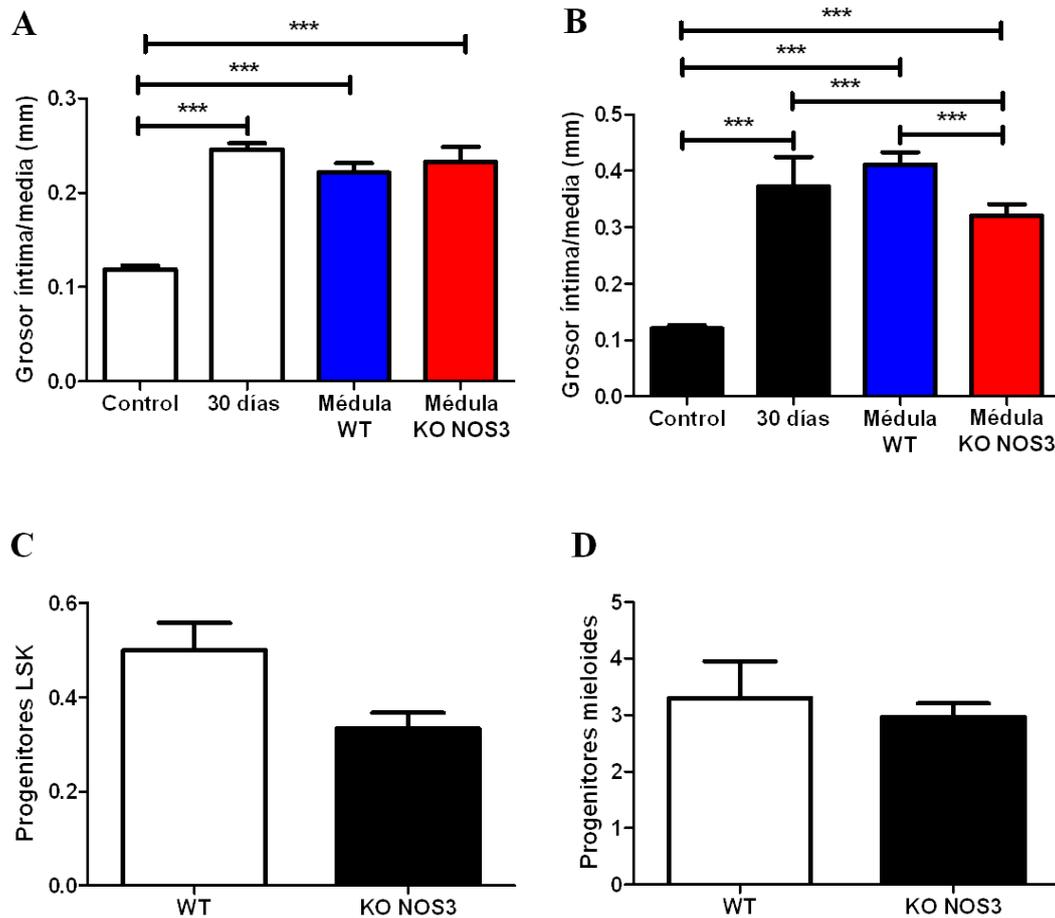
De forma adicional y con el objetivo de analizar la posible contribución de las células progenitoras procedentes de la médula ósea en la resolución del daño generado, extrajimos médulas procedentes de animales WT para su inyección por vía intravenosa en animales KO para NOS3, previamente sometidos a irradiación para la depleción de su propia médula ósea, y viceversa. Al realizar el análisis del grosor de la pared del vaso en los animales WT, comprobamos como independientemente del trasplante que se realizara, no se produjeron cambios significativos respecto a los animales transplantados (**Figura 3A**). En cambio, en el caso de los animales KO para NOS3 que habían sido inyectados con médula WT, se encontraron valores de engrosamiento menores que los detectados en animales inyectados con médula ósea de los KO para NOS3 (**Figura 3B**). Ante este grupo de resultados, todo parecía indicar que la médula de los animales WT contenía los determinantes necesarios para revertir parcialmente el fenotipo generado en los animales KO para NOS3, lo que indujo a realizar un análisis en profundidad de la composición de progenitores mieloides y progenitores multipotentes LSK. Las células progenitoras mieloides son una población de células hematopoyéticas que van a dar lugar a los eritrocitos y a las células mieloides de la sangre<sup>113</sup>. Las células progenitoras LSK son la población más primitiva de células progenitoras hematopoyéticas y se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y por ser capaces de producir todos los tipos celulares presentes en sangre<sup>114</sup>. Aunque los resultados podrían indicar lo contrario, en condiciones basales no fuimos capaces de detectar diferencias significativas en cuanto a la composición de los progenitores LSK (**Figura 3C**) ni en los progenitores mieloides en función del genotipo para NOS3 (**Figura 3D**).

---

<sup>113</sup> Luc S, et al. Biological and molecular evidence for existence of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Ann N Y Acad Sci.* 1106 (2007): 89-94.

<sup>114</sup> Akashi K, TraverD, Miyamoto T & Weissman I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, (2000): 193-197.

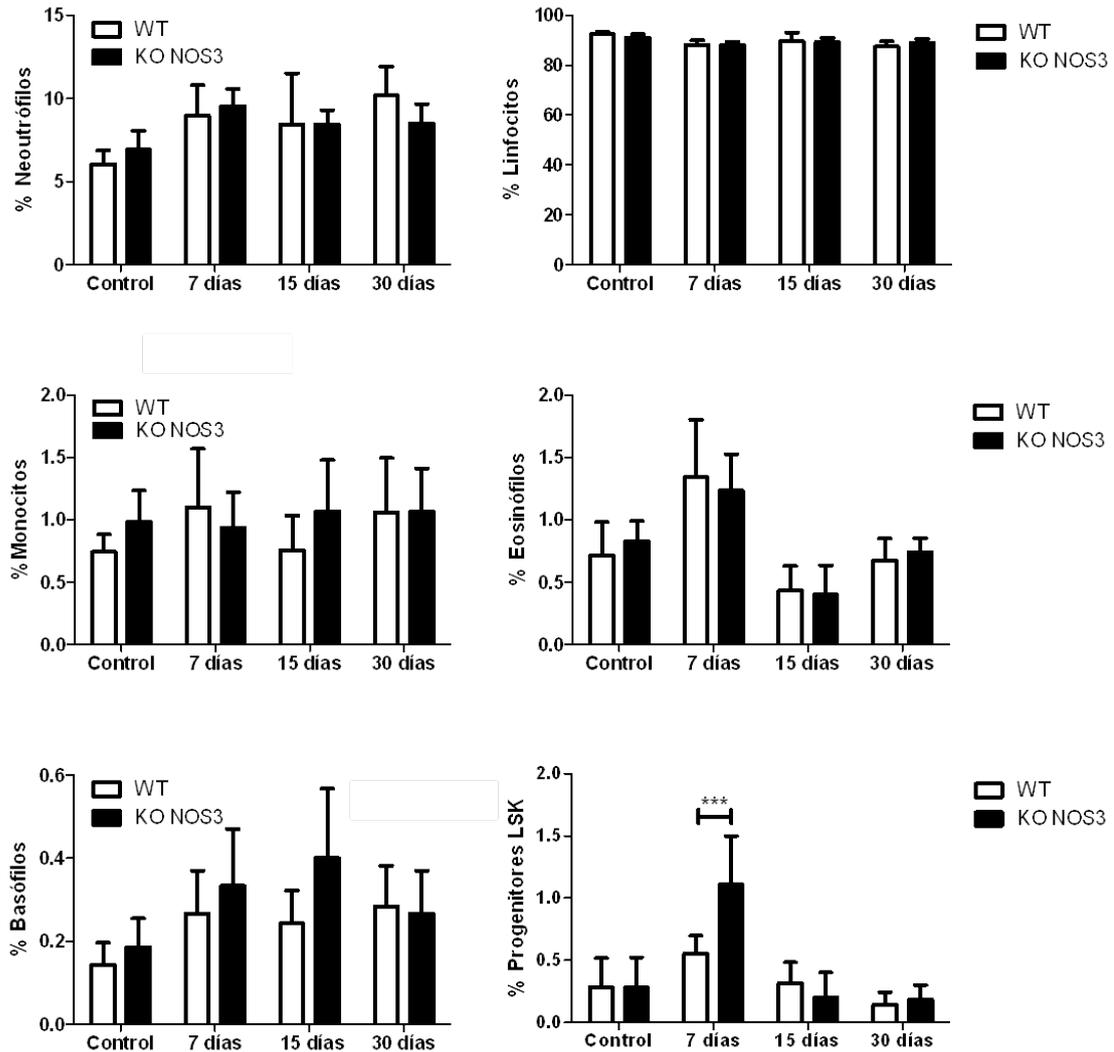
## Resultados



**Figura 3** El trasplante de médula ayuda en la recuperación del vaso dañado. (A) Médula ósea procedente de animales WT o KO para NOS3 fue transplantada en animales WT previamente irradiados. Como control, se transplantó médula WT en animales WT (n=6 animales por grupo). (B) Médula ósea procedente de animales WT o KO para NOS3 fue transplantada en animales KO para NOS3 previamente irradiados. Como control, se transplantó médula ósea en animales KO para NOS3 en animales KO para NOS3 (n=6 animales por grupo). (C) y (D) La médula ósea procedente de animales WT y KO para NOS3 fue marcada con los anticuerpos específicos Sca1-FITC, c-Kit-PE-Cy7 y el Cocktel “biotin mouse lineage” ( $Lin^-$ ) para la detección de progenitores LSK ( $Lin^-$  Sca1 $^+$  c-Kit $^+$ ) y progenitores mieloides ( $Lin^-$  Sca1 $^+$  c-Kit $^+$ ) (n=3 animales por grupo). En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Ante este resultado, decidimos analizar la cantidad de células mieloides y precursores LSK presentes en sangre tras la cirugía, encontrando únicamente un incremento significativo de los progenitores LSK en los animales KO para NOS3 7 días después del denudado endotelial. Todo ello sugiere una mayor movilización de precursores de médula en sangre, lo que se relaciona con una mayor inflamación en los animales KO para NOS3, tal y como posteriormente analizaremos con detalle (**Figura 4**).

## Resultados



**Figura 4.** En ausencia de NOS3 se produce un aumento de progenitores LSK en sangre 7 días después del denudado endotelial. Recuento de células blancas y progenitores LSK en sangre en condiciones basales y después del denudado endotelial (7, 15 y 30 días) (n=7 animales/grupo/día). En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### **4. El fenotipo de los macrófagos se ve afectado en ausencia de NOS3 después del protocolo de denudado endotelial.**

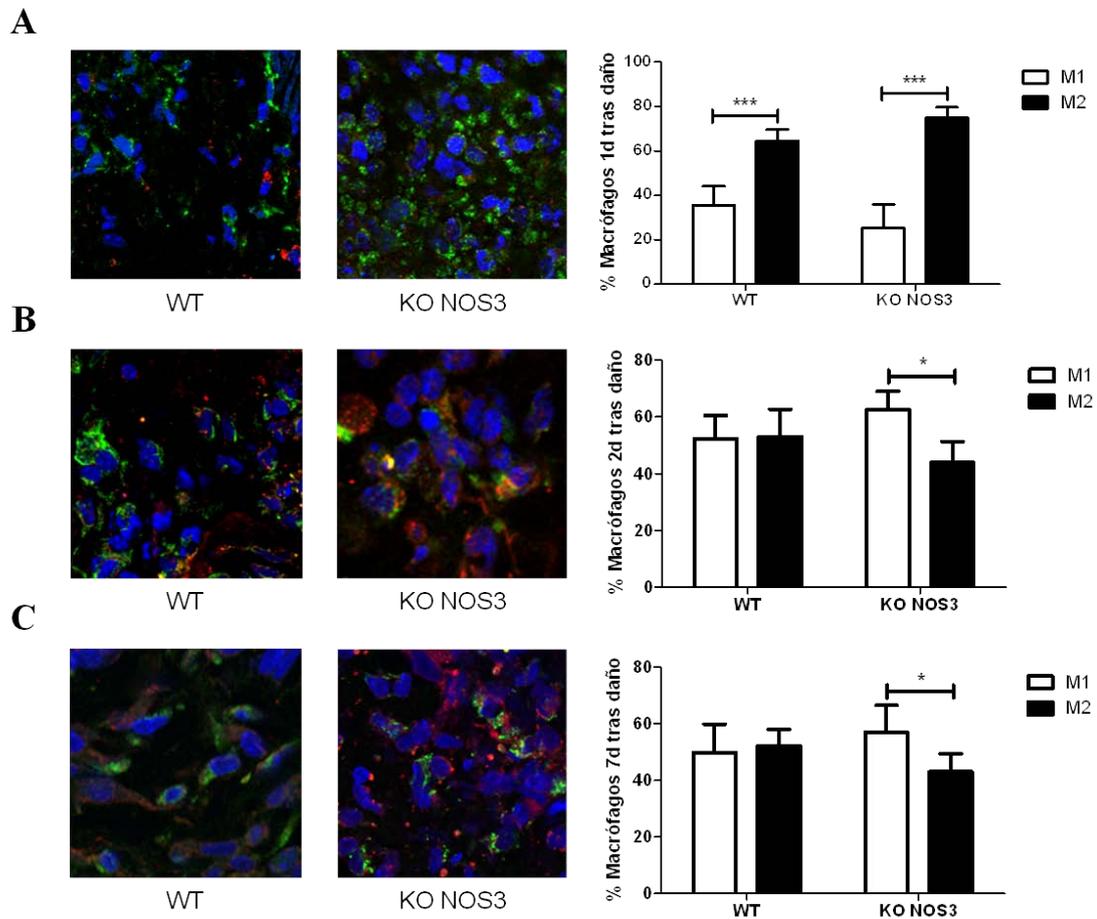
Dentro de los distintos tipos celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria que surge tras cualquier manifestación de daño, está descrito el papel decisivo de los macrófagos, ejerciendo además un efecto esencial sobre la remodelación tisular, gracias a la plasticidad de estos para promover o resolver la inflamación.<sup>115</sup> Una vez llevadas a cabo las comprobaciones en sangre que eliminan cualquier posible diferencia en cuanto a la cantidad de monocitos en presencia o ausencia de NOS3, decidimos estudiar si podía existir un desbalance entre macrófagos: inflamatorios (M1) y reparadores (M2), infiltrados en el área surgida tras el daño. Para ello, y empleando la técnica de inmunofluorescencia *en face* pudimos comprobar en ambos genotipos que 24 horas después de la cirugía, se encontraba una población significativamente mayor de macrófagos resolutivos M2 respecto a la población de macrófagos M1 (M1<M2) (**Figura 5A**), resultado esperado y descrito previamente en otros modelos experimentales, donde el sistema inmune trata de resolver el daño generado a fin de evitar la activación de una respuesta inflamatoria<sup>115</sup>. Sin embargo, después de 48 horas de daño, los animales WT presentaban un número similar del tipo M1 y M2 (M1=M2), mientras que los animales KO para NOS3, acumulaban una mayor cantidad de macrófagos M1 (M1>M2) (**Figura 5B**), desequilibrio que se mantenía a lo largo del tiempo, tal y como pudo comprobarse 7 días después de la cirugía (**Figura 5C**). Este comportamiento, explica la mayor movilización de precursores LSK en sangre 7 días después del procedimiento, que llegarían a la zona dañada y al encontrarse un ambiente pro-inflamatorio se diferenciarían directamente hacia macrófagos M1. Estas diferencias

---

<sup>115</sup> Mantovani, A., et al. «Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling.» J Pathol. 229 (2013): 176-185.

## Resultados

en el fenotipo de los macrófagos presentes tras el daño, nos llevaron a explorar su relación con el incremento en la formación de neointima presente en los animales KO para NOS3.



**Figura 5.** El fenotipo de los macrófagos se ve afectado en ausencia de NOS3 después del protocolo de denudado endotelial. (A), (B) y (C) Inmunofluorescencia en fase y recuento de macrófagos CD68<sup>+</sup>/iNOS<sup>+</sup> (M1) y CD68<sup>+</sup>/iNOS<sup>-</sup> (M2) después del denudado endotelial (1, 2 y 7 días). Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía confocal, CD68 (FITC, verde), iNOS (Cy3, rojo) (n=6 animales/ grupo/ día). En las gráficas se representa la media ± SD. \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001.

## **5. La pérdida de NOS3 induce la repolarización de los macrófagos reparadores M2 hacia el fenotipo de macrófagos inflamatorios M1.**

Una vez hubimos demostrado que NOS3 es una de las piezas clave en la dirección que tomará la respuesta inflamatoria que se genera en el vaso, quisimos explorar el ambiente generado en el área dañada de cara a la polarización de los macrófagos y el posterior efecto que ello supone sobre la proliferación y la migración tanto de las células endoteliales de aorta (MAEC, Mouse Aortic Endothelial Cells) como de las células musculares lisas (VSMC, Vascular Smooth Muscle Cells) por ser dos de los participantes celulares principales del vaso en la hiperplasia de la neointima, punto final y objeto fundamental de evaluación en esta tesis.

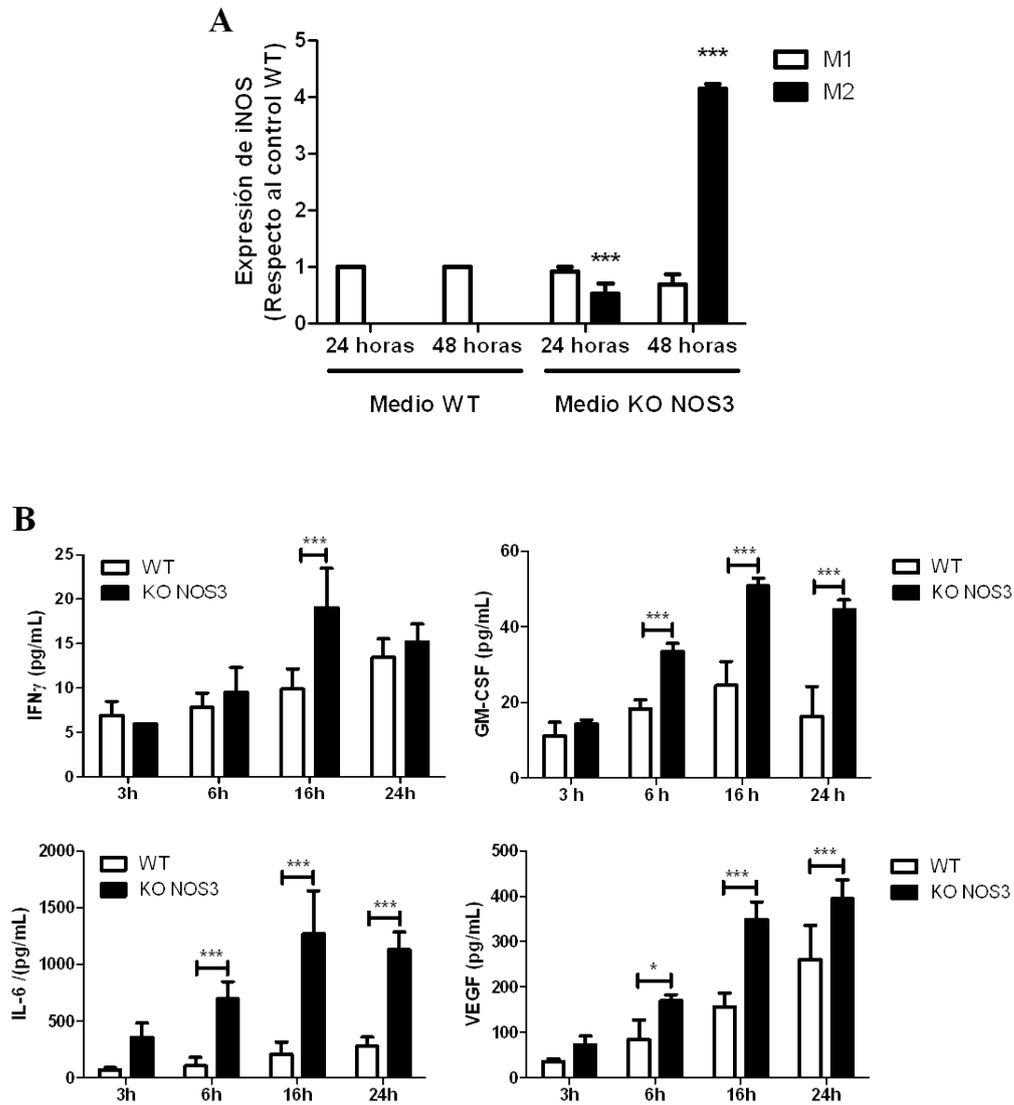
Para evaluar el efecto de las MAEC sobre la polarización de los macrófagos, procedimos al aislamiento y polarización de macrófagos procedentes de médula ósea de ratones WT hacia los fenotipos M1 y M2, e incubamos posteriormente con medios condicionados procedentes de MAEC tanto WT como KO para NOS3. Aunque 24 horas de incubación con el medio condicionado procedente de las MAEC NOS3 nos permitió detectar expresión de iNOS (marcador clásico de macrófagos pro-inflamatorios M1, y ausente en el estado M2) en los macrófagos M2, 48 horas de tratamiento fueron suficientes para comprobar cómo estos macrófagos sufrían una clara repolarización hacia un estado proinflamatorio M1, caracterizado por una expresión muy elevada de iNOS (**Figura 6A**).

Para dar respuesta al por qué en ausencia de NOS3 las células endoteliales promueven la polarización hacia el estado proinflamatorio M1, y teniendo en cuenta el efecto fundamental de las citoquinas sobre la plasticidad de los macrófagos, llevamos a cabo la medición de 25 citoquinas y quimiocinas a lo largo de distintos tiempos en

## ***Resultados***

---

medios condicionales procedentes de monocapas de MAEC WT y KO para NOS3, sometidas a ensayos de herida en placa. El objetivo de este ensayo fue tratar de encontrar diferentes patrones de expresión en función de la presencia o ausencia de NO endotelial. De esta forma, pudimos comprobar cómo tras el daño endotelial, los sobrenadantes procedentes de las MAEC KO para NOS3 contenían elevados niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 y de las quimiocinas, GM-CSF, VEGF e IFN $\gamma$  (**Figura 6B**), lo que aporta de forma objetiva y por primera vez una respuesta acerca del por qué en ausencia de NOS3 predomina la respuesta inflamatoria sobre la resolutive. A este respecto cabe destacar que tanto IL-6 como GM-CSF están involucrados en el reclutamiento de macrófagos activados y cómo la regulación positiva de IL-6 e IFN $\gamma$  participa en la polarización hacia el estado M1, mientras que IFN $\gamma$  y VEGF contribuyen positivamente en la expresión de iNOS.



**Figura 6. El endotelio vascular regula la polarización de los macrófagos.** (A) Macrófagos M1 y M2 procedentes de médula ósea WT y KO para NOS3 fueron tratados con durante 24 y 48 horas con medios condicionados procedentes de MAEC WT o MAEC KO para NOS3 y cuantificándose la expresión del marcador iNOS mediante qPCR. (B) Análisis Multi-plex (ver métodos) de citoquinas secretadas al medio extracelular en células endoteliales WT y KO para NOS3 previamente dañadas a los tiempos indicados (n=6) En las gráficas se representa la media $\pm$ SD. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## ***Resultados***

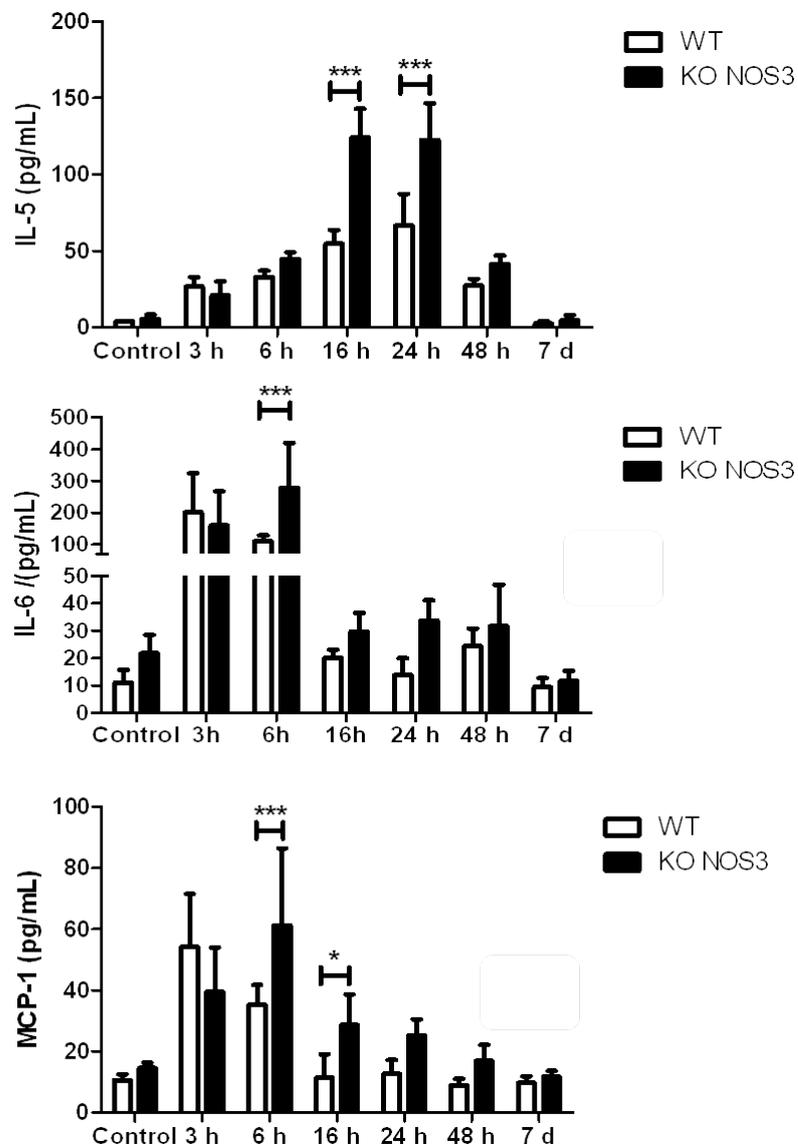
---

Con objeto de hacer extensivo este resultado a lo que sucede realmente después del denudado arterial, se recogió plasma de ratones WT y KO para NOS3 para analizar el ambiente inflamatorio generado a lo largo del tiempo tras el procedimiento quirúrgico. A este respecto detectamos diferentes patrones de expresión (**Tabla 1**), aunque de forma especialmente significativa pudimos observar que las citoquinas IL-5 e IL-6 y la quimiocina MCP-1 aumentaban en las primeras 24 horas tras el denudado endotelial en los animales KO para NOS3 (**Figura 7**). Es importante destacar de nuevo la presencia de IL-6, quimiocina que en los sobrenadantes de las células endoteliales se encontraba altamente expresada y relacionada con la polarización hacia macrófagos M1. Adicionalmente, encontramos una expresión significativamente diferente de la quimiocina IL-5 y la citoquina MCP-1, resultado especialmente relevante, dado que IL-5 es una molécula pro-inflamatoria, mientras que MCP-1 está relacionada con el reclutamiento de macrófagos en el punto de inflamación. Tomando todos estos datos en conjunto, podemos afirmar que el endotelio participa en la resolución de la inflamación, al menos en parte, a través de la polarización de los macrófagos, influyendo tanto en su reclutamiento como su polarización. En concreto, los animales KO para NOS3 responden al daño de forma diferente a los animales WT, acumulando cantidades significativamente mayores de citoquinas pro-inflamatorias que promueven la activación y acumulación de macrófagos M1 en la zona dañada.

	<b>Control</b>		<b>3 horas</b>		<b>6 horas</b>		<b>16 horas</b>		<b>24 horas</b>		<b>48 horas</b>		<b>7 días</b>	
	<b>WT</b>	<b>NOS3</b>	<b>WT</b>	<b>NOS3</b>	<b>WT</b>	<b>NOS3</b>	<b>WT</b>	<b>NOS3</b>	<b>WT</b>	<b>NOS3</b>	<b>WT</b>	<b>NOS3</b>	<b>WT</b>	<b>NOS3</b>
<b>FGFb</b>	52,8±26,3	43,8±10,6	55,5±15	35,1±8,5	81,7±30,5	56,9±11,3	48,7±16,5	17,3±9	41,5±18,4	41,5±18,4	46,9±19,5	53,5±5,5	73,8±13,2	73,8±13,2
<b>GM-CSF</b>	1,0±0,6	0,6±0	6,4±0,7	6±0,5	7,1±0,8	6,1±0,4	5,8±0,3	5,8±0,4	0±0	0±0	0,6±0	0,9±0,4	0±0	0±0
<b>IFN-g</b>	15,5±3,1	20,9±6,1	10,5±2,9	11,1±3	17,3±4,8	17,7±7,2	11,9±4,4	22,7±6,8	13,2±6,1	2,6±2,5,1	13,1±4	21,3±7,4	20,1±1,5	16,7±4,3
<b>IL-1a</b>	7,7±2,5	8,6±2,3	20,5±12,8	12,5±4,4	11,2±5,8	12,3±5,9	7,8±0,1	6,3±0,9	1,9±0,2	4,6±2,6	6,7±5,2	4,6±1,8	6,1±5,5	10,8±6,5
<b>IL-1b</b>	12,8±5,4	16±7,7	22,2±5	19,6±4,8	21,1±3,7	20,1±4,2	14,3±2,3	18,5±8,7	13,6±5,3	16,6±2,6	14,4±5,7	13,8±5	12,5±6	15,4±5,1
<b>IL-2</b>	10,2±1	12,4±5,7	15,7±2,4	16,7±2,3	17,4±3,7	15,8±2,5	11,5±1,7	12,9±2,4	9,4±1,4	12,3±2,4	9±2,1	12,2±4,0	0±0	14,7±1,2
<b>IL-4</b>	15±8,7	18,6±9,8	20±7,2	14±6,2	23,3±10,9	18,3±9,1	4,5±2,5	20,5±11,6	10,7±1,8	21,4±3,5	14,7±5,	21±6,5	14,6±5,3	19,2±2
<b>IL-5</b>	5±1,3	5,4±1,9	26,6±6,2	21,8±9,4	32,7±4,3	44,7±4,3	54,7±8,9	124,2±18	66,5±20,6	131,9±33	18,5±9,1	20,5±16,4	2,6±1,6	4,6±3,4
<b>IL-6</b>	6,3±4,1	21,8±6,6	201,5±122	160,3±107	110,5±17	232,2±147	20,1±2,9	29,7±6,7	13,8±6,1	33,6±7,4	8,6±4,7	14,8±4,4	9,4±3,2	11,7±3,6
<b>IL-10</b>	257,9±64	432,4±182	414,2±158	436,8±195	580,5±191	469,3±213	312±101	394,5±201	285,5±147	474,4±193	343,3±167	467±150,9	569,2±189	308,3±194
<b>IL-12</b>	33,9±8,9	27,5±7,1	21,6±5,1	18,8±6,2	17,9±2,9	16,8±5,8	21,2±4,1	17,7±8,8	19,4±5,4	20,2±7,2	17,1±5,9	16,3±1,8	33±4,2	29,5±5,4
<b>IL-17</b>	1±0,6	1,5±0,7	2,4±0,6	2,7±0,4	2,9±0,7	1,9±0,3	1,7±0,4	2,4±1,4	0,5±0,2	1,6±0,7	0,7±0,1	1,4±0,7	1±0,09	2,4±0,9
<b>IP-10</b>	17±7,6	15,9±3,3	30,4±11,7	29,2±5,5	36,8±8,8	30,6±6,3	19,9±2,5	26,6±7,3	15±5,7	20,4±4,2	9±2,1	12,1±5,8	18,3±1,8	19,7±5,7
<b>MCP-1</b>	9,4±2,4	11,4±4,4	54,3±17,2	39,5±14,4	30,3±11,8	61,2±25,2	19,4±10,6	28,7±10	12,7±4,4	25,3±5,1	8,8±1,6	14,2±5,5	8,1±3,1	11,8±1,8
<b>MIG</b>	23,6±9,6	18,1±4,9	16,9±6,9	13,8±5,1	11,3±4	8,4±3,4	4,2±1,2	5,5±2,2	11,8±4,3	9,5±3,4	9,9±3	11±4,9	19,3±6,3	14,6±3
<b>MIP-1a</b>	21,9±7,7	40,5±20,2	49,5±15,6	43,1±12,6	48±12,6	39,4±13	23,7±10,9	22,9±11,5	21,1±5,1	34±10,4	23±5,5	33,8±17,1	40,8±22,4	49,8±13,4
<b>TNF-a</b>	11,9±0,9	21,6±7,9	23,73±4,3	21,5±7	27,9±8,9	16,6±5,6	13±0	16,8±7,4	11±0	16,7±5,9	19±8,9	18,5±6,6	12,3±3,7	20,6±2,4
<b>VEGF</b>	6,1±1	7,8±1,9	12,8±2,4	10,4±2	11,8±1,7	11,6±1,3	9,4±1,8	9,492±1,8	8,7±2,5	8,8±0,9	5,8±1,5	8,5±0,9	7,1±0,07	7,2±0,9

**Tabla 1.** Análisis mediante Multi-plex de citoquinas presentes en la sangre de animales WT y KO para NOS3 en condiciones basales y después del denudado endotelial a los tiempos indicados (n=6 animales/ grupo/ día) En la tabla se representa la media± SD.

## Resultados

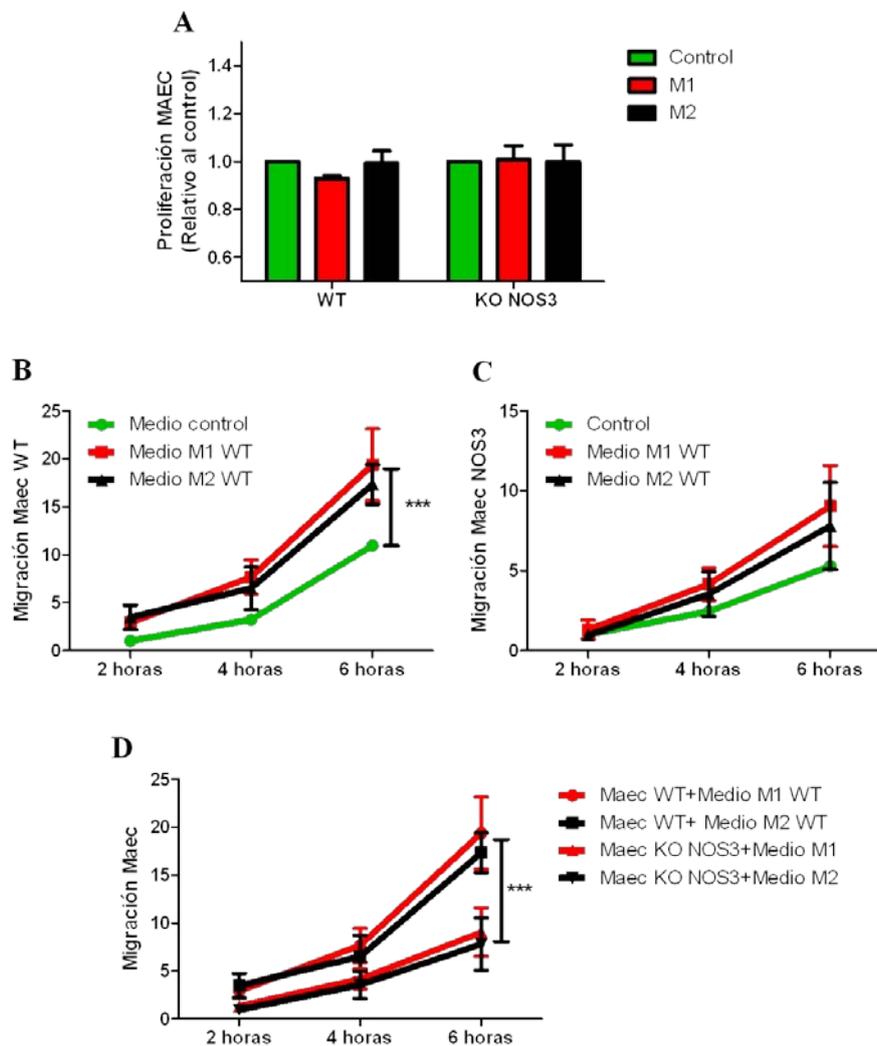


**Figura 7. La ausencia de NOS3 estimula la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.** Representación de las citoquinas más significativas presentes en la sangre de animales WT y KO para NOS3 en condiciones basales y después del denudado endotelial a los tiempos indicados ( $n=6$  animales/ grupo/ día) En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## **6. Los macrófagos estimulan la migración de las células endoteliales que expresan NOS3**

El conjunto de resultados anteriormente descritos ponen de manifiesto por primera vez el efecto diferencial que NOS3 ejerce sobre la respuesta inflamatoria, respecto a la contribución del endotelio en la plasticidad de los macrófagos. De manera análoga, postulamos que debido a ese efecto de NOS3, tanto la migración como la proliferación endoteliales podían estar a su vez afectados como consecuencia del daño endotelial. Por ello, analizamos la proliferación de las MAEC WT y KO para NOS3 en presencia o ausencia de medio condicionado de macrófagos (M1 y M2), no observando cambios significativos con los distintos tratamientos (**Figura 8A**). Sin embargo, en ensayos de herida sobre monocapas de MAEC WT pudimos comprobar que la presencia de medio condicionado de macrófagos estimulaba su migración (**Figura 8B**), mientras que la ausencia de NO endotelial tuvo como consecuencia la falta de estimulación por parte del medio condicional en el que las células habían sido incubadas (**Figura 8C**). Este resultado sugiere que aunque la presencia de macrófagos favorece la migración de las células endoteliales y por tanto la recuperación del endotelio dañado tras un procedimiento de denudado, al menos una de las claves en la migración es precisamente NOS3 (**Figura 8D**).

## Resultados

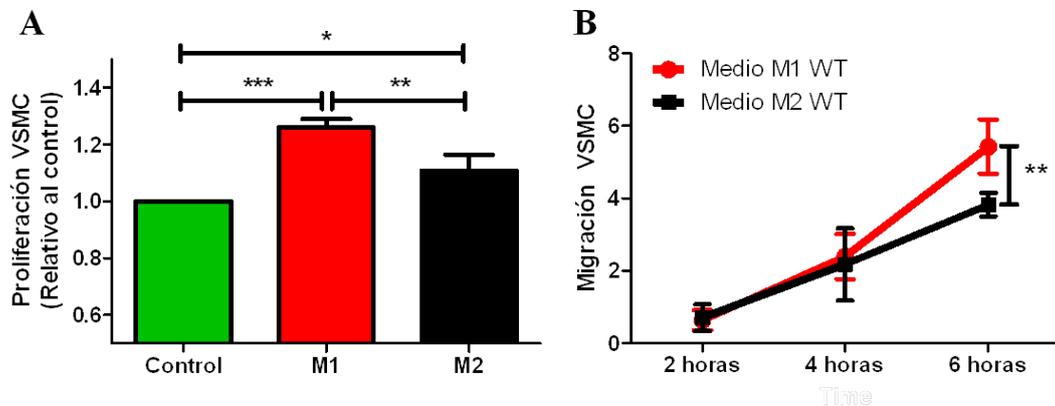


**Figura 8. Los macrófagos estimulan la migración de las células endoteliales que expresan NOS3.** (A) Proliferación de las células endoteliales WT y KO para NOS3 incubadas con medio control y medios condicionados de macrófagos M1 y M2 mediante tinción con CFSE, a lo largo de 24 horas después de la incubación ( $n=3$ ). (B), (C) y (D) Migración de células endoteliales WT y KO para NOS3 incubadas con medio control y medios condicionados de macrófagos M1 y M2 mediante ensayos de herida en placa en los tiempos indicados. Los resultados se expresan como el incremento de la migración respecto al medio control ( $n=6$ ). En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $p<0.001$ .

## **7. La generación de un ambiente inflamatorio estimula la proliferación y migración de las VSMC.**

De forma análoga, y como anteriormente hemos mencionado, quisimos conocer la contribución de la plasticidad de los macrófagos sobre las propiedades migratorias y proliferativas de las VSMC, para lo cual, tras su incubación con medios condicionales provenientes de macrófagos M1 o M2, y a diferencia de lo que sucede en el endotelio vascular, pudimos constatar la influencia del tipo de macrófago sobre la proliferación de este tipo celular, recordando que es el componente principal de la neoíntima generada tras el daño vascular (**Figura 9A**). Para el análisis de la migración, al igual que en el caso de las MAEC se realizaron ensayos de herida en placa incubando las VSMC con medios condicionados de macrófagos M1 y M2, comprobando cómo en este tipo celular, la presencia de medio condicional de macrófagos M1 estimulaba significativamente más la migración de las VSMC que con el medio condicional de macrófagos M2 (**Figura 9B**), lo que claramente sugiere que la generación de un ambiente pro-inflamatorio estimula tanto la proliferación como la migración de las VSMC. Este hecho tiene especial relevancia, ya que contribuye a explicar por primera vez a nivel molecular las diferencias en la formación de neoíntima que surgen después del denudado endotelial en función de la expresión de NOS3 y en definitiva como consecuencia de una mayor o menor disfunción endotelial, como es el caso de pacientes en los que la eliminación del endotelio supone la restenosis del vaso por la proliferación incontrolada de la musculatura de la túnica media, hecho hasta el momento poco explorado. La incógnita que subyace de estos ensayos es averiguar a través de que mecanismo/s el NO endotelial juega ese papel tan esencial en el control del remodelado vascular, lo que podría aportar una herramienta para el tratamiento de pacientes sometidos a este tipo de intervenciones.

## Resultados



**Figura 9. La generación de un ambiente inflamatorio estimula la proliferación y migración de las VSMC.** (A) Proliferación de las células vasculares lisas tratadas con medio control y medios condicionados de macrófagos M1 y M2 mediante tinción con CFSE ( $n=3$ ). (B) Migración de células vasculares lisas incubadas con medios condicionados de macrófagos M1 y M2 mediante ensayos de herida en placa. Los resultados se expresan como el incremento de la migración respecto al medio control ( $n=6$ ). En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

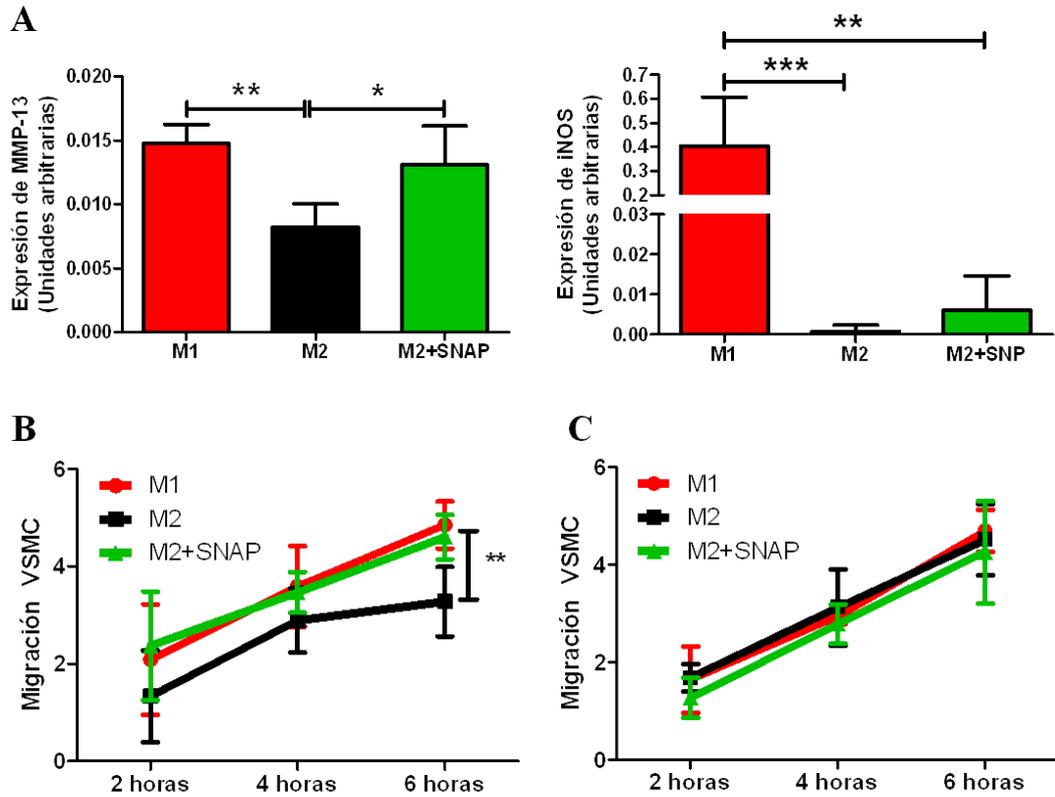
## 8. El NO dirige la expresión y actividad de MMP-13 en la regeneración vascular y la hiperplasia

Estudios anteriores de nuestro laboratorio demostraron cómo la migración de las células endoteliales dependiente de NO, estaba estrictamente relacionado con la expresión y activación de la metaloproteinasas de matriz extracelular MMP-13, hasta el punto que esta MMP es componente casi indispensable para una correcta migración del endotelio en respuesta a la herida. Para averiguar si la expresión de MMP-13 estaba implicada en la regeneración del endotelio mediada por el NO, aislamos y polarizamos macrófagos de animales WT donde estudiamos su expresión, comprobando cómo

MMP-13 se expresa preferentemente en los macrófagos M1, recordando que es en este tipo celular donde la expresión de iNOS era significativamente mayor.

Teniendo en cuenta el resultado anteriormente mencionado, y a fin de comprobar si la expresión de MMP-13 es dependiente de NO, tratamos macrófagos M2 con el donador de NO SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine), observando que aunque, los niveles de iNOS eran similares a los de los macrófagos M2 no tratados, la expresión de MMP-13 aumentaba significativamente confirmando que su expresión dependía de NO independientemente de su procedencia (**Figura 10A**). Para confirmar si MMP-13 es clave también para la migración de las VSMC, realizamos ensayos de herida en placa, incubando las células con medios condicionales de macrófagos M1, M2 o M2 tratados el donador de NO SNAP. De esta forma pudimos comprobar cómo se revertía el fenotipo migratorio cuando los M2 habían sido tratados con SNAP, los cuales presentaron en este caso, niveles de expresión de MMP-13 similares a los macrófagos M1 (**Figura 10B**). Todo ello fue especialmente dotado de significación, cuando pudimos comprobar que los macrófagos que no expresan MMP-13, por haber sido aislados a partir de animales KO para la metaloproteinasa, no presentaban efecto alguno sobre la migración de las VSMC en ninguna de las condiciones ensayadas (**Figura 10C**).

## Resultados

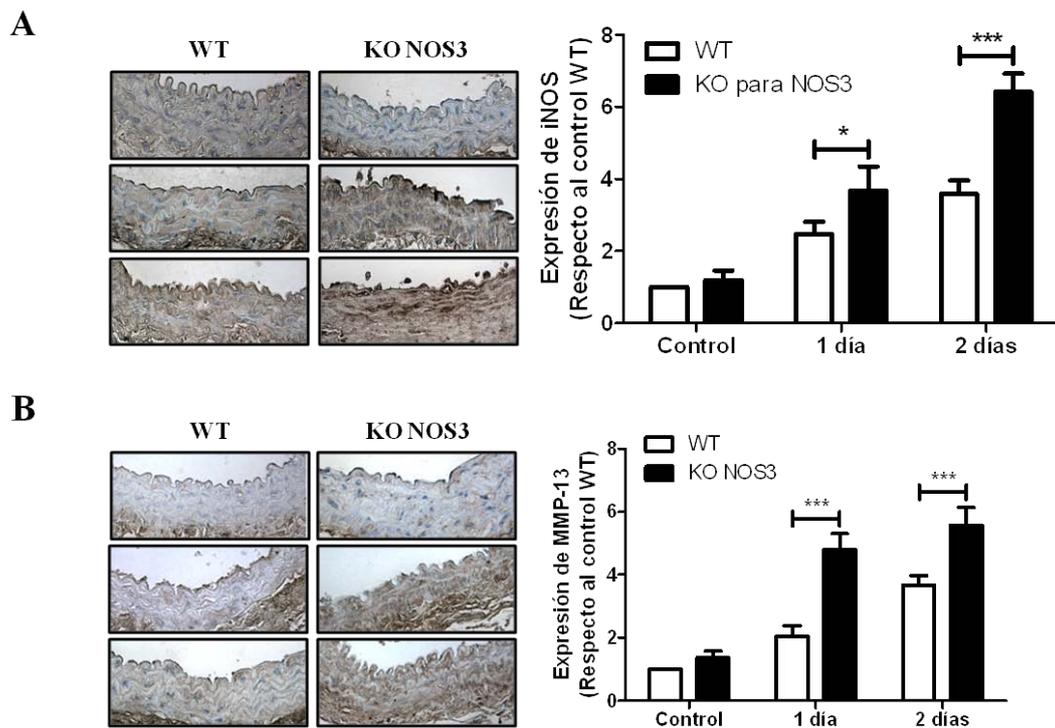


**Figura 10. El NO dirige la expresión y actividad de MMP-13 en la regeneración vascular y la hiperplasia.** (A) Cuantificación de la expresión de MMP-13 e iNOS en macrófagos M1, M2 y M2 tratados con el donador de NO SNAP mediante qPCR. (B) Migración de células vasculares lisas incubadas con medios condicionados de macrófagos M1, M2 y M2 tratados con SNAP mediante ensayos de herida en placa. (n=6) (C) Migración de células vasculares lisas incubadas con medios condicionados de macrófagos M1, M2 y M2 tratados con SNAP procedentes de animales KO para MMP-13 mediante ensayos de herida en placa (n=6). Los resultados se expresan como el incremento de la migración respecto al medio control. En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Todos los resultados descritos hasta el momento ponen claramente de manifiesto el efecto significativo que el endotelio vascular ejerce sobre el remodelado, aportando a nivel molecular varias vías a través de las cuales ejerce su acción. Un endotelio funcional produce NO a través de NOS3, controlando la respuesta inflamatoria que se produce después del daño del vaso evitando, entre otros procesos, la expresión de enzimas proteolíticas como MMP-13. En cambio un endotelio disfuncional, bien porque carece de NOS3 o porque NOS3 no produce NO, es incapaz de resolver el proceso inflamatorio de forma adecuada, favoreciendo la expresión de enzimas como MMP-13 y favoreciéndose la expresión de grandes cantidades de iNOS, que paradójicamente produce NO en concentraciones más elevadas que NOS3.

Para confirmar *in vivo* que la ausencia de NOS3 promueve un mayor ambiente inflamatorio (como hemos descrito en detalle) y que además induce la acción de iNOS, procedimos a su detección mediante un análisis inmunohistoquímico en aortas en las que había sido realizado el protocolo de denudado endotelial, comprobando cómo la expresión de iNOS era significativamente mayor en los animales KO para NOS3 24 y 48 horas después del denudado, en comparación con los niveles detectados en los animales WT, siendo especialmente abundante la señal detectada en la capa media de las arterias denudadas (**Figura 11A**). Además, en etapas tempranas del proceso inflamatorio, pudimos constatar un considerable incremento de la expresión de MMP-13 en los ratones KO para NOS3 después del denudado de la aorta, comparado con los niveles encontrados en las arterias WT denudadas (**Figura 11B**), confirmando de esta forma, que MMP-13 se expresa bajo condiciones pro-inflamatorias, no solo en los macrófagos sino también en las células musculares del vaso.

## Resultados

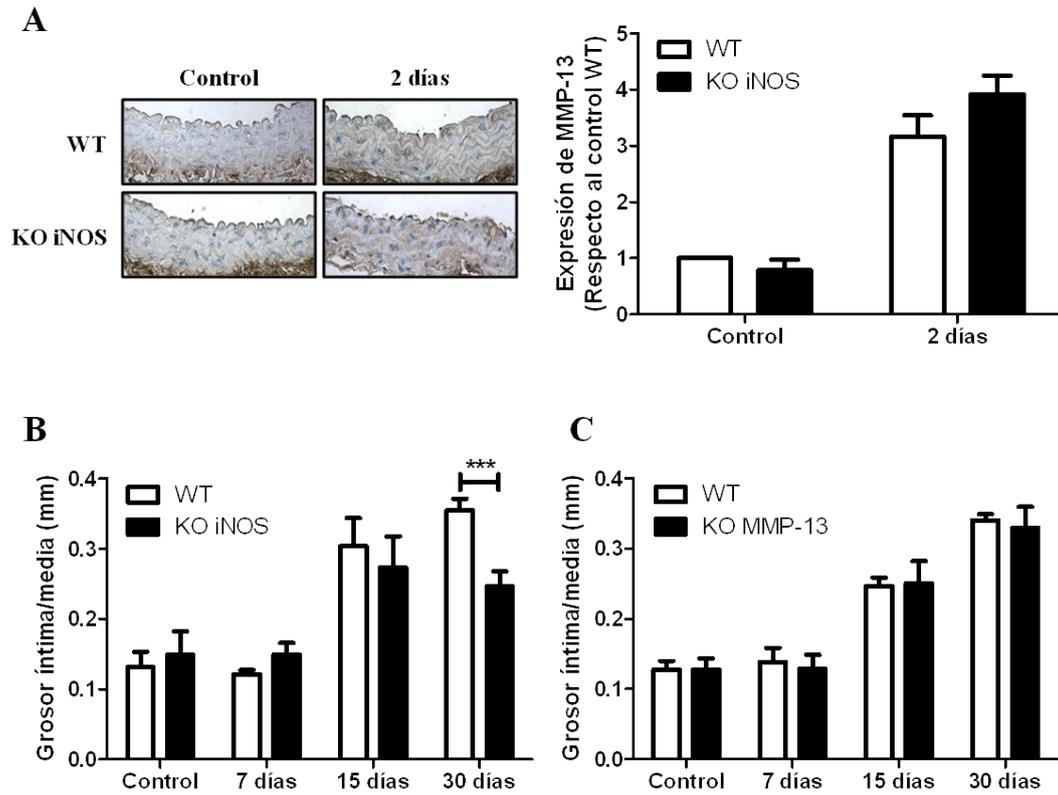


**Figura 11. La ausencia de NOS3 estimula la expresión de iNOS y MMP-13 in vivo. (A) y (B) Detección mediante inmunohistoquímica de iNOS y MMP-13 en secciones de aortas de animales WT y KO para NOS3 en condiciones basales y después del denudado endotelial (1 y 2 días). Análisis de las imágenes por densitometría respecto al control WT. En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .**

El papel del NO en la expresión de MMP-13 fue verificado en aortas denudadas de animales KO para iNOS. En este punto es importante recordar que iNOS está directamente relacionado con la respuesta inflamatoria, por lo que su ausencia debería minimizar los efectos negativos encontrados en los animales KO para NOS3, donde se producía una respuesta inflamatoria descontrolada. Lo primero que se estudió fueron los niveles de MMP-13 en estos animales tras la cirugía y se comprobó que eran similares a

los encontrados en los animales WT (**Figura 12A**). A continuación, se analizó el grosor de las capas íntima y media del vaso 30 días después del procedimiento quirúrgico observando que era significativamente inferior comparado con los animales WT (**Figura 12B**). Por el contrario, cuando analizamos el grosor de la capa íntima-media en los animales KO para MMP-13 no fueron encontradas diferencias significativas al ser comparados con los animales WT (**Figura 12C**), sugiriendo que MMP-13 podría ser la diana por la cual el NO generado a través de iNOS, ejerce su efecto en este modelo de patología.

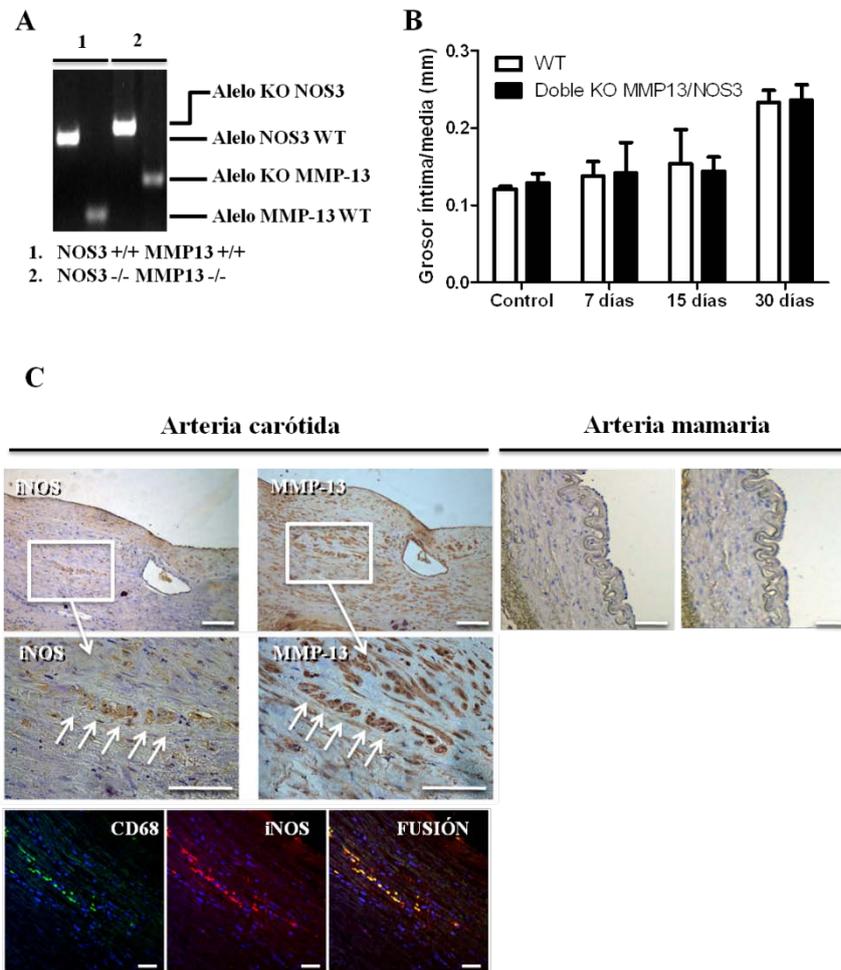
## Resultados



**Figura 12.** (A) La ausencia de iNOS reduce la presencia de MMP-13 y el grosor de la íntima/media del vaso. (A) Detección mediante inmunohistoquímica de MMP-13 en secciones de aortas de animales WT y KO para iNOS en condiciones basales y después del denudado endotelial (2 días). Análisis de las imágenes por densitometría respecto al control WT. (n=3 animales/grupo/día) (B) y (C) Grosor de la íntima/media en animales WT, KO para iNOS y KO para MMP-13 en secciones de aortas en condiciones basales y después del denudado endotelial (7, 15 y 30 días) (n=3 animales/ grupo/ día). En las gráficas se representa la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Para confirmar que MMP-13 era la molécula clave en la generación de hiperplasia de la neoíntima, generamos un animal doblemente deficiente para NOS3 y MMP-13 (**Figura 13A**). Como hemos visto anteriormente, la ausencia de NOS3 generaba diferencias significativas en el grosor de la pared del vaso en la zona desnuda 15 y 30 días después de la cirugía, pero en ausencia de NOS3 y MMP-13 (animales doblemente KO) no se apreció un aumento significativo del grosor del vaso (**Figura 13B**), lo que apunta de forma directa a MMP-13 como la diana de NOS3 en el mantenimiento de la proliferación y migración incontroladas del vaso. La importancia de estos resultados fue confirmada mediante un estudio de colocalización entre CD68 (marcador de macrófagos), iNOS (marcador de inflamación y macrófagos M1) y MMP-13 en secciones de arterias humanas procedentes de endarterectomias, donde pudimos observar una elevada concentración de macrófagos M1 y una mayor hiperplasia de la neoíntima, respecto a las arterias humanas sin aparente hiperplasia (**Figura 13C**).

## Resultados



**Figura 13. MMP-13 es diana del NO en el remodelado vascular.** (A) Electroforesis en bromuro de etidio para visualizar el ADN procedente de los alelos WT y KO para NOS3 y KO para MMP-13. (B) Grosor de la íntima/media en animales WT y doblemente deficientes para NOS3 y MMP-13 en secciones de aortas en condiciones basales y después del denudado endotelial (7, 15 y 30 días) ( $n=3$  animales/ grupo/ día). (C) Detección de iNOS y MMP-13 mediante inmunohistoquímica en secciones de carótidas procedentes de pacientes después de endarterectomía o arterias mamarias sanas. Las flechas indican la colocalización de iNOS y MMP-13. En la parte inferior se representa la detección de CD68 (FITC, verde) e iNOS (Cy3, rojo) en imágenes tomadas mediante microscopía confocal en las mismas secciones. La colocalización de ambas proteínas se representa en amarillo.

Todo lo anteriormente expuesto es un trabajo realizado para caracterizar a nivel molecular el mecanismo/s por los cuales el NO ejerce un efecto vasoprotector frente a la restenosis que aparece en un vaso después del denudado endotelial.

La restenosis y la regeneración endotelial son dos de los principales problemas que surgen como consecuencia del tratamiento de pacientes, a los que se les ha eliminado mecánicamente el agente que ocluye la luz del vaso y/o se les ha instalado un sistema para mantener el vaso abierto (stent). A parte de la complicación de estos procedimientos, no existen en la actualidad técnicas no invasivas dirigidas a la monitorización del grado de regeneración del endotelio perdido. A este respecto, uno de los intereses fundamentales de este trabajo fue poder diseñar un protocolo no invasivo que nos permitiera monitorizar a lo largo del tiempo el grado de recuperación del endotelio, signo evidente de la salud del paciente sometido a los tratamientos anteriormente citados.

Para poder realizar este objetivo con éxito, establecimos una colaboración directa con el grupo del Dr. René M. Botnar, experto en el campo de la imagen cardiovascular no invasiva por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) en el St. Thomas Hospital de Londres (King's College London). Para ello, evaluamos el problema concreto de la regeneración endotelial tras su interrupción mecánica (CNIC), con su posible detección y aplicación clínica mediante imagen molecular por RMN (KCL).

Como hipótesis de partida, nos planteamos cómo después del denudado endotelial, la permeabilidad de la aorta abdominal debe verse incrementada de forma significativa y que durante el proceso de re-endotelización dicha permeabilidad irá disminuyendo hasta retornar a valores próximos a los de un vaso que no ha sufrido alteración mecánica alguna.

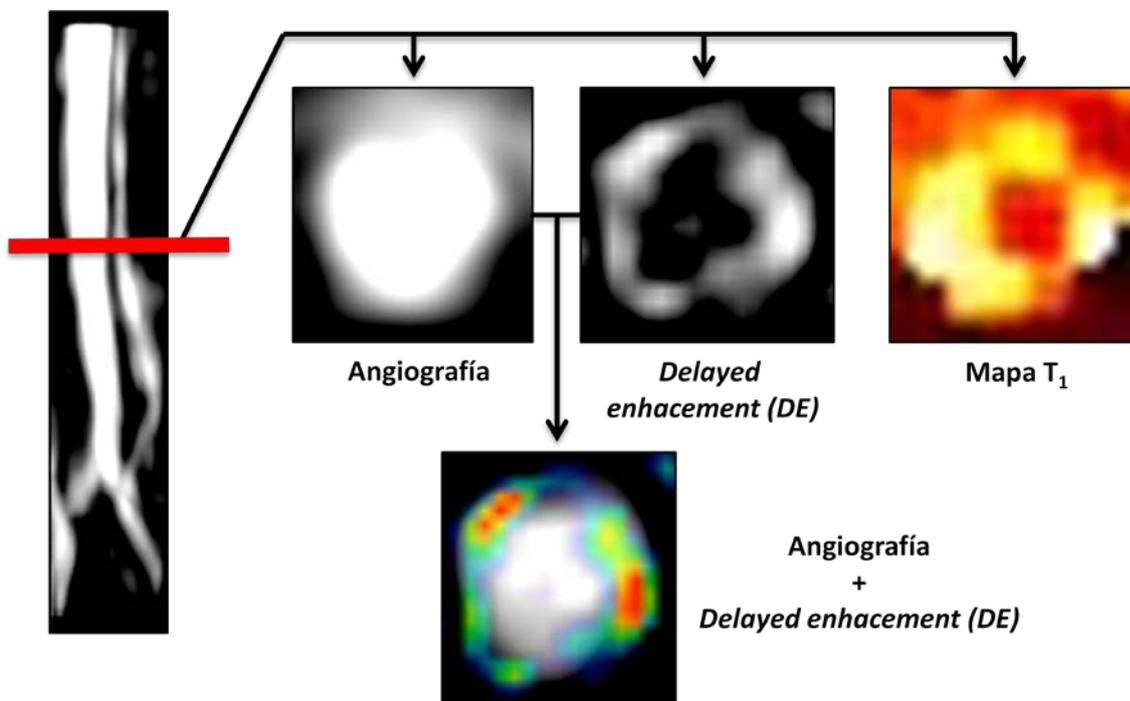
Para realizar el estudio se empleó el agente de contraste gadofosvest (vasovist), clínicamente aprobado para su uso en humanos y caracterizado por la presencia de un núcleo de gadolinio y una región de unión a albúmina que le confieren, como previamente han descrito otros grupos, la capacidad de detectar diferencias en la permeabilidad vascular en procesos como la aterosclerosis o la angiogénesis.

### **9. La captación de gadofosveset se correlaciona con la permeabilidad vascular generada después del protocolo de denudado endotelial en la aorta abdominal**

Para evaluar la relación existente entre la captación de gadofosveset y la permeabilidad en la aorta en nuestro procedimiento quirúrgico, se realizó el protocolo de denudado endotelial en animales WT, los cuales fueron evaluados mediante RMN a lo largo de 7, 15 y 30 días después de la cirugía. Como control del ensayo, se realizó una primera sesión de resonancia en animales sanos, para conocer los niveles basales de captación del agente de contraste en la aorta abdominal.

Para el estudio de la evolución del daño a lo largo del tiempo tras el denudado endotelial se diseñó un protocolo específico de imagen para RMN de 3T. Para la adquisición de las imágenes, los ratones fueron colocados en tendido prono, 30 min después de la inyección intravenosa de 0,03 mmol/kg de gadofosveset y mantenidos con anestesia gaseosa (2% de isoflurano) durante los experimentos de resonancia. Después de un primer escaneo de exploración, realizamos una angiografía de contraste que nos permitió ver la aorta abdominal, las arterias renales y las arterias iliacas. A continuación se planeó una secuencia *2D-Look-Locker* perpendicular a la aorta abdominal, que fue

empleada para determinar el tiempo de inversión (TI) en el que la sangre quedaba visualmente anulada y una secuencia *delayed enhancement* (DE), utilizada para la visualización de la captación de gadofosveset en la pared del vaso. Por último se realizó el mapa  $T_1$  (tiempo de relajación longitudinal), secuencia que permitió cuantificar la tasa de relajación ( $R_1$ ) de la pared del vaso, reflejo de la concentración de gadolinio existente en el área evaluada (**Figura 13**).



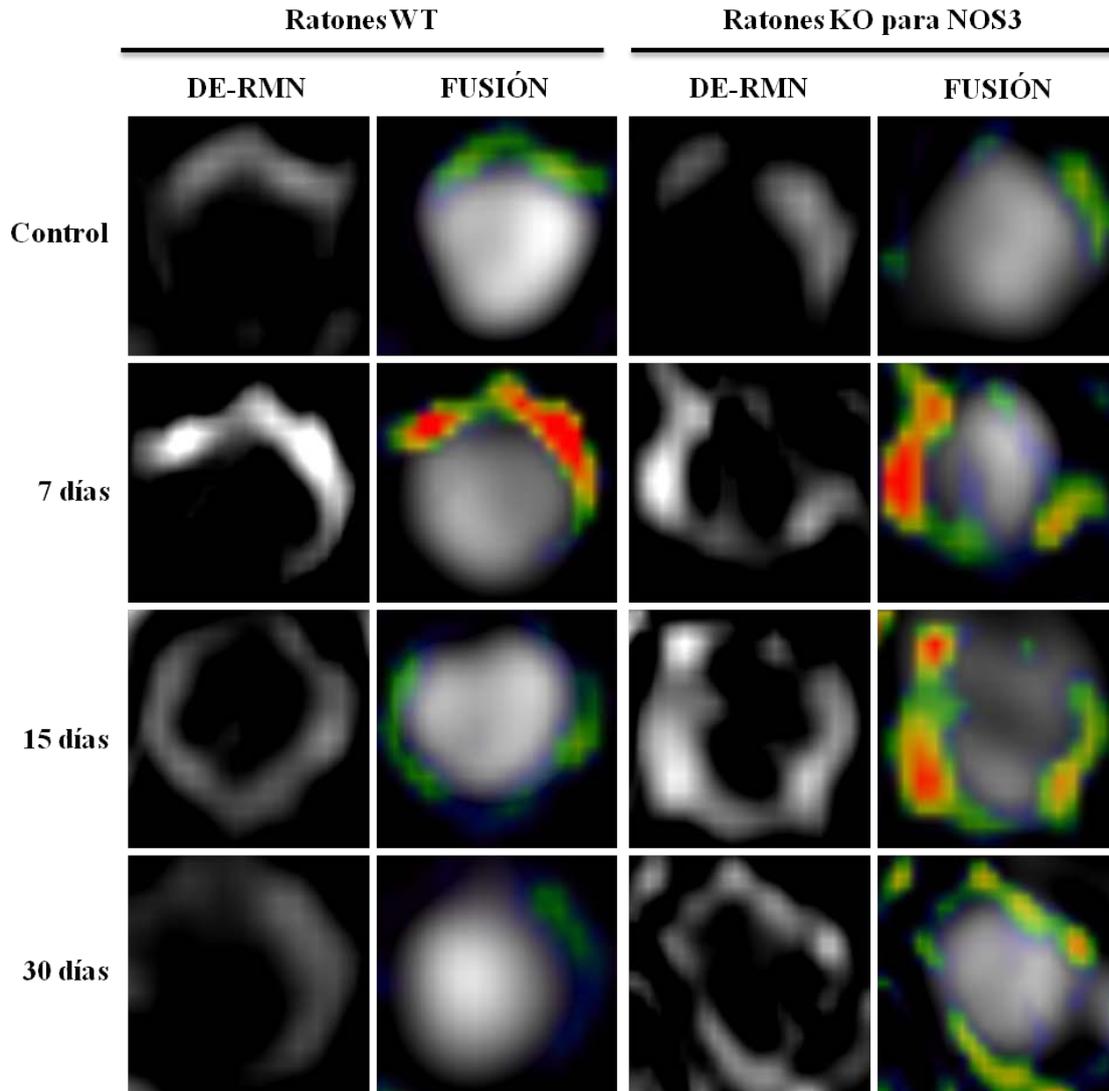
**Figura 13.** Protocolo de RMN empleado para la evaluación de la permeabilidad vascular tras el denudado endotelial. Los animales fueron inyectados i.v. con 0,03 mmol/kg de gadofosveset. Aproximadamente 30 minutos después, se realizó una angiografía para determinar la zona de interés, la secuencia *Delayed enhancement*, para determinar el área de la pared del vaso que había captado gadofosveset y por último un mapa  $T_1$ , para cuantificar la  $R_1$  del vaso.

## ***Resultados***

---

Este primer experimento nos mostró que la mayor captación de agente de contraste se producía 7 días después del procedimiento de denudado endotelial, produciéndose una disminución progresiva de la señal 15 y 30 días después del daño, donde la detección se aproximaba a los niveles basales encontrados en los animales sanos que habían sido utilizados como control (**Figura 14 izquierda**).

Como previamente hemos visto, los ratones KO para NOS3 presentan una peor recuperación de la arteria tras la cirugía, por lo que decidimos realizar en ellos el protocolo de denudado endotelial y evaluar si existía una captación del agente de contraste diferente a lo largo del tiempo en los dos genotipos. Al igual que en los animales WT, la máxima detección de gadofosveset fue observada a los 7 días, pero sorprendentemente, y a diferencia del caso anterior, los ratones KO para NOS3 conservaban la intensidad de señal elevada a los 15 y 30 días después del denudado, indicándonos que la permeabilidad vascular en estos animales se mantenía elevada a lo largo del tiempo tras el procedimiento quirúrgico (**Figura 14 derecha**).



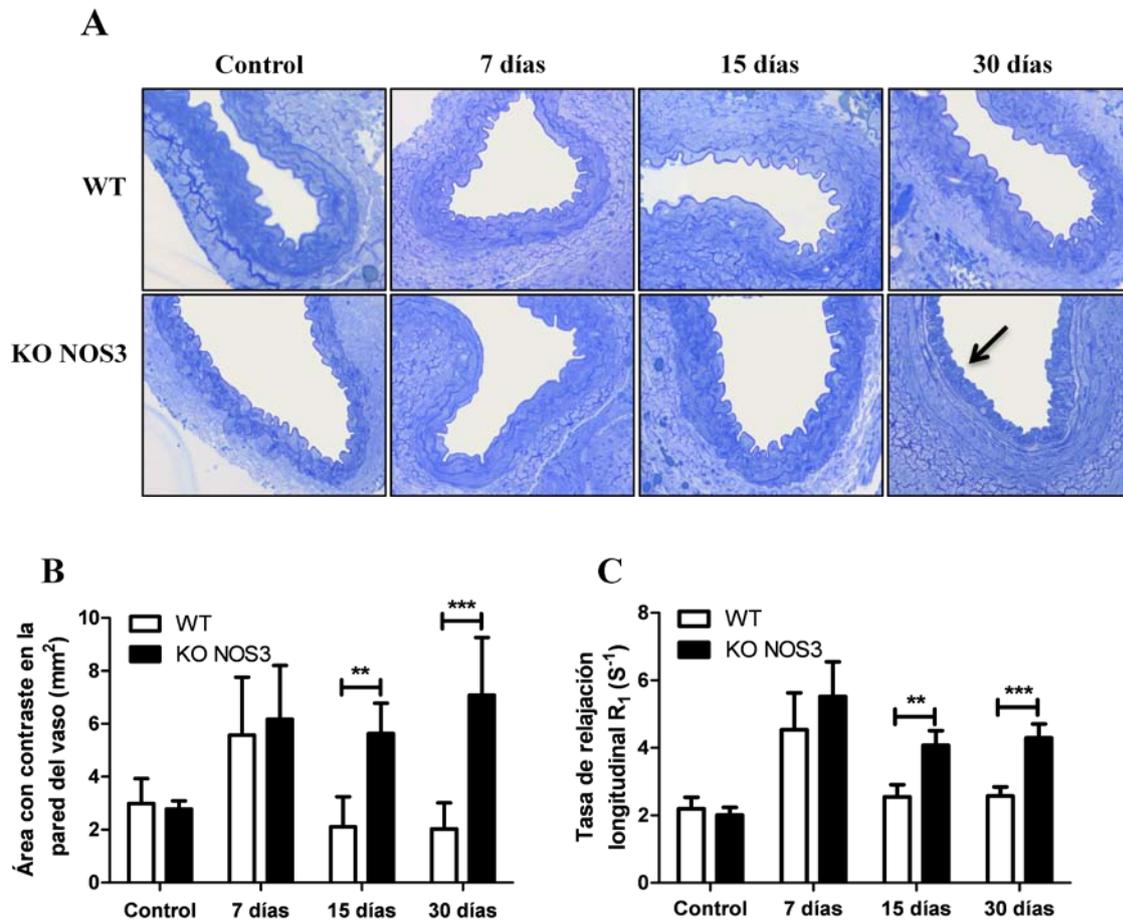
**Figura 14.** La captación de gadofosveset se correlaciona con la permeabilidad vascular generada tras el protocolo de denudado endotelial en la aorta abdominal. Imágenes obtenidas con la secuencia Delayed enhancement empleando RMN (DE-RMN) y fusión de DE-RMN con angiografía obtenida de la aorta abdominal. A la izquierda, de la imagen animales WT en condiciones basales y después del denudado endotelial a los tiempos indicados. A la derecha, de la imagen animales KO para NOS3 en condiciones basales y después del denudado endotelial a los tiempos indicados.

## **Resultados**

---

Una vez realizadas las resonancias procedimos a la recolección de las muestras para realizar en ellas otros análisis que complementaran los resultados obtenidos mediante RMN. Para el análisis estructural de las aortas aisladas, algunas muestras fueron destinadas a protocolos de histología, en las que se realizó la tinción con azul de toluidina, comprobando cómo en los animales KO para NOS3 se había desarrollado una significativa hiperplasia de la neointima 30 días después del denudado (**Figura 15A**). Por otro lado, analizamos el área de captación de gadofosveset en la pared del vaso mediante las imágenes obtenidas por resonancia con la secuencia *inversión recovery*. El área de captación fue significativamente mayor en los animales KO para NOS3 a los 15 y 30 días después del denudado endotelial comparado con los animales WT (**Figura 15B**).

Con el propósito de cuantificar la concentración de gadolinio, y por tanto de gadofosveset existente en la pared de la aorta abdominal dañada, se realizó el análisis de las secuencias *T<sub>1</sub> mapping*. Los resultados obtenidos indicaron que la mayor concentración de gadolinio se producía 7 días después del procedimiento quirúrgico. Estos datos corroboran los resultados anteriores (**Figura 15C**).

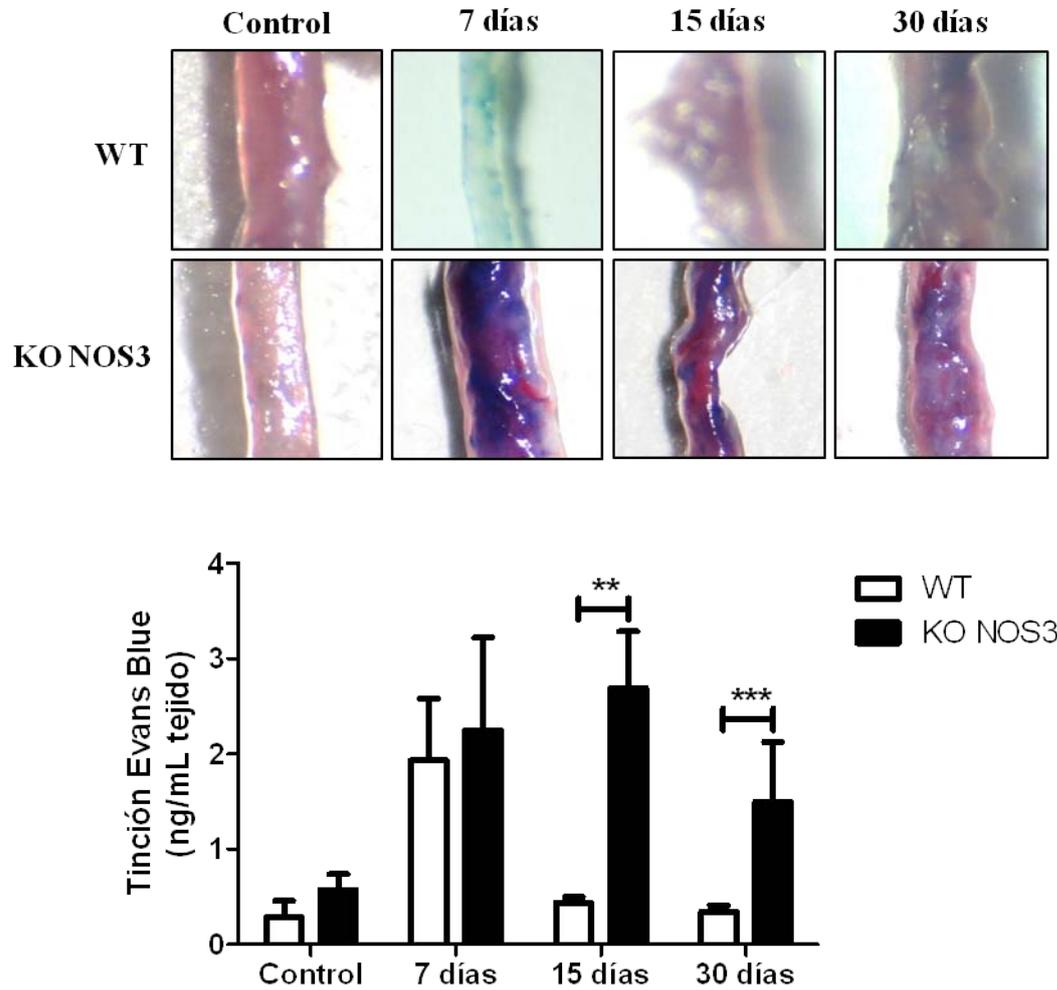


**Figura 15. La ausencia de NOS3 favorece la formación de neointima y una mayor permeabilidad vascular.** (A) Tinción de azul de toluidina de secciones de aorta en animales WT y KO para NOS3 en condiciones basales y después del denudado endotelial (7, 15 y 30 días) y determinación del grosor de la íntima/media de la pared del vaso ( $n=3$  animales/ grupo/ día). (B y C) Cuantificación de los resultados obtenidos en la figura 14. Determinación del área de captación y la tasa de relajación de gadofosveset en la pared del vaso en condiciones basales y después del denudado endotelial a los tiempos indicados.

## ***Resultados***

---

A parte de todos los análisis descritos, en algunos animales se realizó la tinción de Evans Blue, para evaluar la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Los resultados del área dañada calculada en las imágenes de resonancia, la concentración de gadofosveset y la concentración y distribución del Evans Blue encontrada en las arterias, refuerzan nuestra hipótesis que sugiere que la captación de gadofosveset en la pared del vaso es reflejo del daño existente en la aorta abdominal (**Figura 17**).



**Figura 16. NOS3 favorece la recuperación de la permeabilidad vascular a los niveles basales.** Tinción con Evans Blue (EB) en aortas de animales WT y KO para NOS3 en condiciones basales y después del denudado endotelial (7, 15 y 30 días) y determinación de la cantidad de EB en la pared del vaso (n=6 animales/ grupo/ día).

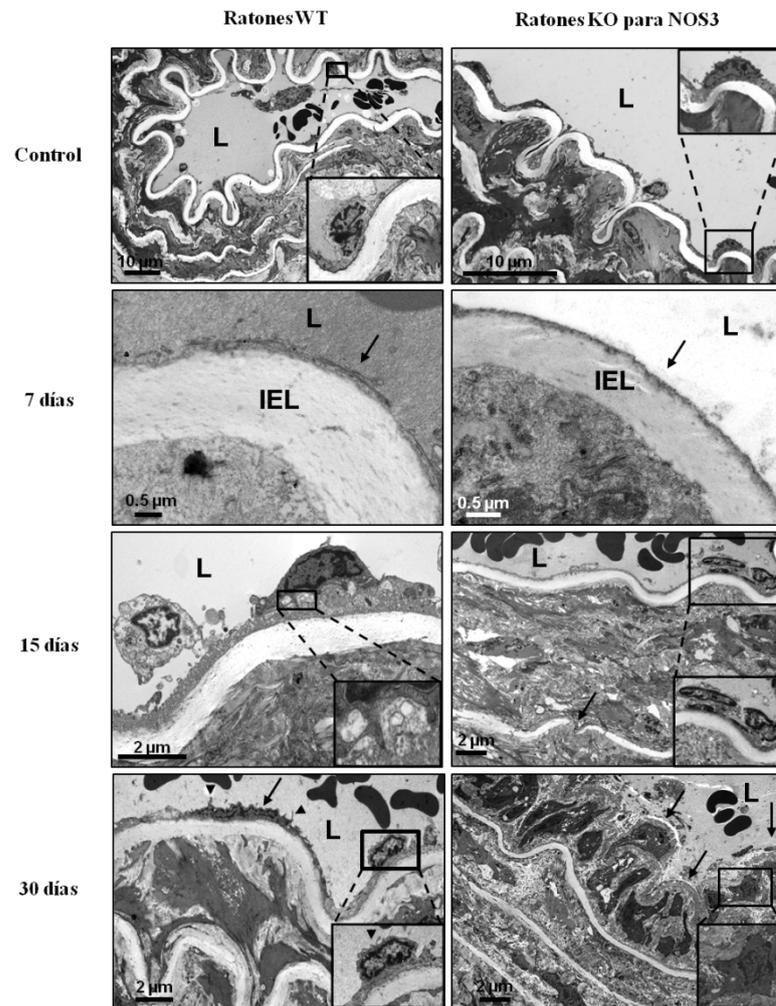
## **Resultados**

---

Como ha sido descrito previamente en la introducción, la permeabilidad vascular está íntimamente relacionada con el estado del endotelio de los vasos sanguíneos. En experimentos previos, vimos cómo las células endoteliales tenían una migración más lenta hacia la zona dañada en el caso de los KO para NOS3 y, por lo tanto una recuperación de la capa íntima de la zona dañada más lenta (**Figura 2A**).

Para poder analizar más en detalle qué estaba ocurriendo en este proceso, decidimos realizar Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM: Transmission Electron Microscopy). En los animales control, pudimos comprobar como la capa íntima del vaso era normal en ambos genotipos. Una vez realizado el protocolo de denudado endotelial, observamos que 7 días después de la cirugía la capa íntima continuaba completamente denudada en los animales WT y KO para NOS3, punto que coincide con la máxima captación de gadofosveset en las imágenes de RMN, ya que es el momento en el que la permeabilidad del vaso es mayor. 15 días después del protocolo quirúrgico comenzamos a ver la recuperación de la capa endotelial en los animales WT, pero observando en detalle las células endoteliales que estaban retapizando la zona dañada pudimos observar cómo estas células presentaban características que no tenían las células en la situación control, como una morfología aplanada, una mayor cantidad de vesículas y la presencia de *microvilli* o prolongaciones en la membrana, indicativo de que estas células tenían un fenotipo “activado”. Este fenotipo se mantenía 30 días después de la operación, donde la recuperación de la capa íntima era prácticamente completa. Sorprendentemente, al analizar los animales KO para NOS3 15 días después de la cirugía comprobamos cómo las células, además de tener estructuras que nos indicaban estar en un estado activado, no se disponían formando una monocapa como cabría esperar. Además, observamos una mayor desorganización de la capa media del vaso encontrando roturas en las bandas de elastina. Por último y de forma espectacular

comprobamos que 30 días después del procedimiento quirúrgico se había generado una importante hiperplasia en la neointima formada por células cuboideas dispuestas en varios estratos en estos animales, disminuyendo el lumen del vaso (**Figura 18**).



**Figura 18.** La ausencia de NOS3 favorece la formación de neoíntima tras el denudado endotelial. Animales WT y KO para NOS3 presentan una íntima normal en condiciones basales (ver las ampliificaciones). Después de 7 días del denudado endotelial no se detecta la capa íntima del vaso en ninguno de los dos casos. Después de 15 días del protocolo quirúrgico, en los animales WT comienza a recuperarse la capa íntima del vaso, donde las células endoteliales son alargadas, y presentan grandes vacuolas (ver ampliificación) y prolongaciones o microvilli (flechas). En los animales KO para NOS3 se observa una recuperación anormal de la capa endotelial a los 15 y 30 días después de la cirugía, detectando una capa media desorganizada, roturas de la elastina (flechas) y morfología cuboidal de las células endoteliales (flechas).

Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las causas más importantes de discapacidad y muerte prematura en el mundo. El endotelio juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis circulatoria, ya que responde a agentes vasodilatadores y vasoconstrictores liberando mediadores que regulan las respuestas de las células musculares lisas vasculares, las plaquetas y los linfocitos.

El desequilibrio de estos agentes altera la función endotelial, haciendo que ante estímulos vasodilatadores se responda con vasoconstricción paradójica o con vasodilatación insuficiente. Esta alteración de la función del endotelio conocida como disfunción endotelial está directamente asociada con la disminución de la producción de NO a través de NOS3. Sin embargo, los mecanismos por los que NOS3 es capaz de mantener la capa endotelial intacta no están suficientemente explorados. Por ello, uno de nuestros principales objetivos ha sido evaluar el NO como uno de los principales responsables de la generación de hiperplasia de neoíntima siendo MMP-13 su posible efector. Además, hemos analizado el efecto del NO sobre las células presentes en la pared vascular (endoteliales y músculo liso) y el ambiente inflamatorio generado después del denudado endotelial.

Como segundo objetivo y teniendo en cuenta que la disfunción endotelial está directamente relacionada con el aumento de la permeabilidad vascular, decidimos evaluar el uso de técnicas no invasivas de imagen molecular para detectar y monitorizar el grado de permeabilidad vascular después del denudado endotelial, y su posible aplicación como herramienta en clínica.

Centrándonos en la primera parte de la tesis, hemos observado la importancia de la metaloproteasa MMP-13 como diana de NOS3 en la generación de hiperplasia de la neoíntima en arterias que han sufrido denudado endotelial. Previamente, fue identificado por nuestro grupo, como esta proteasa estaba directamente implicada en la

rápida y correcta migración de las células endoteliales *in vitro*.<sup>116</sup> En esta tesis doctoral hemos demostrado *in vivo* como el NO es clave en la recuperación de las condiciones fisiológicas del vaso dañado.

El NO producido por NOS3 previene la formación de hiperplasia de la neoíntima, limitando la proliferación y migración de las células musculares lisas, aunque los mecanismos moleculares que lo dirigen no son del todo conocidos. Para evaluar el desarrollo de neoíntima, tanto nuestro laboratorio como otros grupos de investigación, hemos administrado exógenamente donadores de NO o incluso se ha expresado NOS3 mediante diferentes métodos de transfección en animales KO para NOS3.<sup>117</sup> Los resultados obtenidos son en general positivos, aunque no están exentos de dudas sobre la seguridad, duración y efectos secundarios derivados del uso de agentes virales para la expresión de la enzima productora de NO. No obstante, y dada la eficacia del NO en el mantenimiento del endotelio, en los últimos años se han desarrollado liposomas no virales portadores de NOS3, que favorecen la re-endotelización y disminuyen la restenosis,<sup>118</sup> reduciendo las complicaciones generadas por los tratamientos anteriores, pudiendo ser el comienzo de una nueva herramienta terapéutica.

Tsihlis y colaboradores han descrito como el NO inhibe la proliferación de las células musculares lisas y la formación de neoíntima, incrementando la ubiquitinización del sistema del proteasoma.<sup>119,120</sup> Sin embargo, nuestro estudio es el primero en el que

---

<sup>116</sup> López-Rivera E., et al. «Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration.» *P.N.A.S.* 102 (2005): 3685-90.

<sup>117</sup> Havelka, G.E., et al. «Nitric oxide delivery via a permeable balloon catheter inhibits neointimal growth after arterial injury.» *J. Surg. Res.* 180 (2013): 35-42.

<sup>118</sup> Kapadia, M.R., et al. «Nitric oxide and nanotechnology: a novel approach to inhibit neointimal hyperplasia.» *J. Vasc. Surg.* 47 (2008): 173-82.

<sup>119</sup> Tsihlis, N.D., et al. «Nitric oxide decreases activity and levels of the 11S proteasome activator PA28 in the vasculature.» *Nitric Oxide.* 27 (2012): 50-8.

se describe el efecto de NOS3 en la resolución de la respuesta inflamatoria después del denudado endotelial, identificando una diana concreta como es la metaloproteínasa MMP-13 a tener en cuenta en futuras intervenciones en restenosis humana.

Tras el denudado endotelial, los neutrófilos y monocitos circulantes se infiltran en el tejido dañado en respuesta a las señales producidas por una amplia variedad de células, incluyendo las endoteliales. Los monocitos maduran hacia macrófagos en respuesta al GM-CSF presente en el tejido dañado, confiriéndoles un fenotipo inflamatorio. Los macrófagos M1 expresan elevados niveles de iNOS, NADPH oxidasa y diversas citoquinas inflamatorias, contribuyendo al daño tisular. De forma alternativa, parte de los macrófagos sufren un proceso de polarización hacia un fenotipo M2, lo que promueve la reparación de los tejidos a través, entre otros factores, de la expresión de IL-10, favoreciendo de esta forma la resolución de la inflamación.<sup>121</sup> Además de los monocitos, también podemos encontrar progenitores hematopoyéticos LSK en sangre, caracterizados por su capacidad de diferenciación hacia cualquier tipo de célula sanguínea en función del estímulo recibido. Nosotros hemos detectado por primera vez un incremento significativo de progenitores LSK en sangre en los animales KO para NOS3 7 días después del denudado endotelial. En relación a ello, Yvan-Charvet y colaboradores demostraron como en condiciones de elevada proliferación de los progenitores LSK se producía la aceleración del proceso aterosclerótico en animales

---

<sup>120</sup> Tsihlis, N.D., et al. «Nitric oxide inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia by increasing the ubiquitination and degradation of UbcH10.» *Cell. Biochem. Biophys.* 60 (2011): 89-97.

<sup>121</sup> Mantovani, A., et al. «Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling.» *J. Pathol.* 229 (2013): 176-85.

sometidos a dieta rica en colesterol,<sup>122</sup> resultado que apoya significativamente nuestras observaciones.

Está descrito que la deficiencia de NO de origen endotelial estimula el desarrollo de neointima<sup>123,124</sup>, pero como anteriormente hemos mencionado, todavía existen serias lagunas sobre el mecanismo/s por los que se produce este fenómeno. Esta tesis doctoral es la primera que asocia la falta de NOS3 con una respuesta inflamatoria incrementada, donde se produce un mayor depósito de macrófagos pro-inflamatorios M1 en la zona denudada, favoreciendo la formación de hiperplasia de la neointima. En este contexto inflamatorio, Al Gadban y colaboradores han descrito recientemente que tanto NOS3 como iNOS son clave para mitigar las complicaciones asociadas al lupus reduciendo la síntesis de determinados metabolitos.<sup>125</sup> Estos pacientes presentan un mayor riesgo de sufrir fallo cardíaco,<sup>126</sup> fenómeno directamente relacionado con la disfunción endotelial.<sup>127</sup> En este caso, podría estar ocurriendo algo similar a nuestro sistema, donde la ausencia o reducción de NOS3 (disfunción endotelial), produciría una mayor acumulación de macrófagos M1 favoreciendo de esta manera un ambiente pro-inflamatorio y por ello no resolutivo. Además, apoyando nuestros resultados, otros autores han relacionado recientemente, la infiltración de monocitos después de un

---

<sup>122</sup> Yvan-Charvet, L., et al. «ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation.» *Science*. 328 (2010): 1689-93.

<sup>123</sup> Breen, D.M., et al. «Resveratrol inhibits neointimal formation after arterial injury through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism.» *Atherosclerosis*. 222 (2012): 375-81.

<sup>124</sup> Brito, L.A., et al. «Non-viral eNOS gene delivery and transfection with stents for the treatment of restenosis.» *Biomed. Eng. Online*. 9 (2010).

<sup>125</sup> Al Gadban, M.M., et al. «Lack of nitric oxide synthases increases lipoprotein immune complex deposition in the aorta and elevates plasma sphingolipid levels in lupus.» *Cell. Immunol*. 276 (2012): 42-51.

<sup>126</sup> Manzi, S., et al. «Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study.» *Am. J. Epidemiol*. 145 (1997): 408-15.

<sup>127</sup> El-Magadmi, M., et al. «Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women.» *Circulation*. 110 (2004): 399-404.

proceso de angioplastia carotídea, con la edad y deslocalización celular de NOS3, siendo este último, un evento característico de la disfunción endotelial.<sup>128</sup>

Recientemente, He y colaboradores han demostrado como las células endoteliales aportan un ambiente específico que conduce a la diferenciación y función de los macrófagos hacia el fenotipo M2.<sup>129</sup> Sin embargo, todavía queda por determinar cuáles son las moléculas implicadas por parte del endotelio, y si pudieran existir determinantes moleculares asociados a procesos patológicos concretos. Nosotros proponemos por primera vez la contribución de NOS3 como factor clave en el fenómeno de polarización hacia el fenotipo M2, ya que en su ausencia, hemos sido capaces de revertir la formación de colonias de macrófagos reparadores M2 hacia el fenotipo inflamatorio M1.

Para poder realizar una evaluación más completa sobre la generación de la hiperplasia en la zona denudada a lo largo del tiempo, y teniendo en cuenta que tanto la migración como la proliferación celulares, son dos pasos clave en la generación de este fenómeno adverso, procedimos a estudiar estos dos aspectos en el endotelio y la musculatura vascular, en el contexto de un ambiente inflamatorio como es el denudado endotelial. En el caso de las células endoteliales (MAEC) pudimos comprobar cómo la presencia de medio condicional procedente de macrófagos (independientemente del fenotipo inflamatorio o reparador) estimulaba la migración de las mismas, resultado cuanto menos inesperado, dados los antecedentes que relacionan la migración y proliferación celulares con la respuesta inflamatoria. En cambio, si el endotelio carece de NOS3, la migración celular no se ve alterada, lo que confirma por una parte que

---

<sup>128</sup> Eghbalieh, S.D. et al. «Age-related neointimal hyperplasia is associated with monocyte infiltration after balloon angioplasty.» *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 67 (2012): 109-17.

<sup>129</sup> He, H., et al. «Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages.» *Blood.* 120 (2012): 3152-62.

NOS3 es esencial en la migración del endotelio, como ya habíamos descrito previamente, pero además en el caso de este tipo celular, la contribución en la formación de neointima depende más de la propia producción de NO, que del tipo de ambiente generado.

Recientemente se ha descrito como los macrófagos son capaces de producir endotelina-1 y citoquinas inflamatorias, afectando al remodelado del pulmón y de manera directa o indirecta al miocardio.<sup>130</sup> La endotelina-1 (ET-1) es un péptido vasoactivo, que promueve vasoconstricción muscular y cuyo efecto se encuentra regulado a través de procesos de *feed back* negativos, al inducir la producción de NO endotelial a través de su unión a receptores de tipo B presentes en las células endoteliales, manteniendo de esta forma el tono vascular.<sup>131,132</sup> En virtud de los resultados obtenidos, sugerimos que ET-1 puede ser una de las moléculas generadas por los macrófagos, que promueva el incremento en la producción de NO endotelial, facilitando la migración de las células, mientras que en ausencia de NOS3 (MAEC KO para NOS3), al no producirse NO tras la unión de ET-1 a su receptor, la señalización se ve frenada y por tanto las células no responden al estímulo migratorio.

El desarrollo de neointima después de un daño vascular está asociado a un ambiente pro-inflamatorio,<sup>133</sup> donde el principal componente celular de la son las células musculares lisas (VSMC). Existen numerosos estudios, que indican que moléculas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-1 $\beta$ , entre otras, tienen un papel esencial en

---

<sup>130</sup> Sikkeland, L.I., et al. «Increased levels of inflammatory cytokines and endothelin-1 in alveolar macrophages from patients with chronic heart failure.» *PLoS One*. 7 (2012): e36815.

<sup>131</sup> Rodríguez-Pascual, F., et al. «Role of endothelin in the cardiovascular system.» *Pharmacol Res*. 63 (2011): 463-72.

<sup>132</sup> Mazzuca, M.Q., et al. «Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease.» *Biochem. Pharmacol*. 84 (2012): 147-62.

<sup>133</sup> Simon, D.I. «Inflammation and vascular injury: basic discovery to drug development.» *Circ. J*. 76 (2012): 1811-8.

la migración y proliferación de las VSMC promoviendo el desarrollo de neointima.<sup>134,135,136</sup> Estas evidencias contribuyen a explicar a nivel molecular las diferencias en la formación de neointima que surgen después del denudado endotelial en los animales que carecen de NOS3, ya que se produce el incremento de las citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias IL-6, VEGF, IFN $\gamma$  y GM-CSF, siendo estos dos últimos factores imprescindibles en el reclutamiento y polarización hacia M1.

Los resultados planteados en esta tesis, aportan por primera vez procesos y dianas concretas en el fenómeno de la regeneración y formación de neointima del vaso dañado. No obstante, todavía subyace averiguar a través de qué mecanismos la ausencia de NOS3 favorece un incremento significativo de citoquinas pro-inflamatorias frente a los animales que si son capaces de expresar la enzima. Una de las primeras respuestas que el endotelio vascular genera ante un daño, es la secreción por exocitosis de citoquinas, quimiocinas y toda una serie de factores implicados en la respuesta inflamatoria.<sup>137</sup> La exocitosis es un fenómeno altamente complejo y orquestado por toda una serie de procesos, siendo el NO una de las moléculas que pueden estar implicadas de forma directa, mediante la inducción de modificaciones post-traduccionales en componentes de las vesículas de secreción, afectando de esta forma a su actividad, o de

---

<sup>134</sup> Lee, G.L., et al. «TLR 2 induces vascular smooth muscle cell migration through cAMP response element-binding protein-mediated interleukin-6 production.» *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012): 2751-60.

<sup>135</sup> Yoon, J., et al. «Arginase inhibition reduces interleukin-1 $\beta$ -stimulated vascular smooth muscle cell proliferation by increasing nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production.» *Biochem Biophys Res. Commun.* (2013). *In press.*

<sup>136</sup> Zhang, T., et al. «Effects of chemokine-like factor 1 on vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vascular inflammation.» *Atherosclerosis.* 226 (2013): 49-57.

<sup>137</sup> Baer, C., et al. «Reciprocal interactions between endothelial cells and macrophages in angiogenic vascular niches.» *Exp. Cell. Res.* S0014-4827 (2013): 00134-1.

forma indirecta, a través de la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la formación y tránsito de dichas vesículas.<sup>138</sup>

Qian y colaboradores, han descrito uno de los mecanismos por los que el NO inhibe la inflamación vascular, a través de la inhibición de la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade, vesículas de secreción que median en procesos de inflamación y trombosis.<sup>139</sup> Los cuerpos de Weibel-Palade contienen el factor Von Willebrand, P-selectina, TPA y CD63, moléculas que promueven la extravasación monocitaria. El mecanismo por el cual el NO inhibe la exocitosis, es a través de la nitrosilación de NSF (N-ethyl maleimide sensitive factor), molécula requerida para unirse a su receptor SNARE (soluble NSF receptor). Este receptor se localiza en la vesícula y en la membrana diana y es necesario para que se produzca la exocitosis.<sup>140</sup> El papel del NO sobre la exocitosis de vesículas que contienen moléculas implicadas en inflamación es aún desconocido, pero este mecanismo podría explicar por qué en ausencia de NOS3 se produce una mayor respuesta pro-inflamatoria.

Numerosos estudios, han demostrado la importancia de IL-6 en la progresión de varias enfermedades cardiovasculares como la angina,<sup>141</sup> la enfermedad de las arterias coronarias (CAD: coronary artery disease) o el infarto de miocardio.<sup>142</sup> Estos resultados refuerzan los resultados que hemos obtenido, ya que se detectan niveles

---

<sup>138</sup> Lowenstein, C.J. «Nitric oxide regulation of protein trafficking in the cardiovascular system.» *Cardiovasc. Res.* 75 (2007): 240-6.

<sup>139</sup> Qian, Z. et al. «Inducible nitric oxide synthase inhibition of weibel-palade body release in cardiac transplant rejection.» *Circulation.* 104 (2001): 2369-75.

<sup>140</sup> Matsushita, K., et al. «Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor.» *Cell.* 105 (2003): 139-50.

<sup>141</sup> Kang, W.C. «Comparison of inflammatory markers for the prediction of neointimal hyperplasia after drug-eluting stent implantation.» *Coron. Artery. Dis.* 22 (2011): 526-32.

<sup>142</sup> Paulsson, J. «Activation of peripheral and in vivo transmigrated neutrophils in patients with stable coronary artery disease.» *Atherosclerosis.* 192 (2007): 328-34.

significativamente más elevados de IL-6 y un mayor desarrollo de neointima en ausencia de NOS3.

Los macrófagos M1 expresan citoquinas pro-inflamatorias y estimulan a las enzimas encargadas de la degradación de la ECM. Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) juegan un papel fundamental principalmente en la migración de las VSMC favoreciendo la formación de hiperplasia de la neointima. Aunque existen evidencias de la participación de MMP-2 y MMP-9<sup>143</sup>. En esta tesis doctoral hemos enfocado nuestros estudios en la evaluación del papel de MMP-13 en esta patología. Estudios anteriores, describieron a MMP-13 como una proteasa implicada en la inflamación, pero el efecto de NOS3 a través de MMP-13 en la formación de neointima era desconocido. Previo a esta tesis, nuestro grupo describió en ensayos *in vitro* como el NO induce la expresión y actividad de MMP-13 en las células endoteliales y cómo se lleva a cabo su liberación de caveolina-1 a través de la nitración de la proteína en determinados residuos de tirosina.<sup>144</sup> Cabe destacar que tanto MMP-2 como MMP-9 también se encuentran unidas a caveolina en su forma inactiva.<sup>145</sup> Los resultados que presentamos en esta tesis doctoral aportan una nueva diana frente a la formación de hiperplasia de la neointima describiendo el efecto *in vivo* del denudado aórtico sobre la expresión de MMP-13.

En condiciones normales, se detecta una expresión basal de MMP-13, probablemente asociado a situaciones de recambio celular y mantenimiento de la homeostasis del vaso, pero en condiciones patológicas puede ser regulado por

---

<sup>143</sup> Loftus, I.M., et al. «The role of matrix metalloproteinases in vascular disease.» *Vasc. Med.* 7 (2002): 117-33.

<sup>144</sup> Lizarbe, T.R., et al. «Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair.» *FASEB J.* 22 (2008): 3207-15.

<sup>145</sup> Han, F., Zhu, H.G. «Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells.» *J. Surg. Res.* 159 (2010): 443-50.

citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6, evento descrito en estudios previos en osteoclastos,<sup>146</sup> fibroblastos<sup>147</sup> y células cancerosas.<sup>148</sup> La pérdida de MMP-13 no afecta a la formación de hiperplasia de la neoíntima en ratones que expresan NOS3, mientras que se produce un incremento en el grosor de la pared del vaso en los animales KO para NOS3, viéndose claramente reducido este en los animales doblemente KO para NOS3 y MMP-13. Estos resultados sugieren que el NO previene la formación de neoíntima, a través de la modulación de la expresión de MMP-13.

El NO tiene un papel inhibitor frente a la proliferación y migración celulares. No obstante, como consecuencia del daño sufrido, nuestros resultados muestran un incremento significativo en la producción de iNOS, precisamente en los animales KO para NOS3, los cuales desarrollan una mayor formación de neoíntima, resultado aparentemente contradictorio con lo descrito por otros autores en relación a la proliferación celular. En el contexto sin embargo, es importante destacar el papel relevante de la enzima NADPH oxidasa, por ser uno de los principales responsables del estrés oxidativo, llegando a producir grandes cantidades de anión superóxido. Este anión es capaz de reaccionar rápidamente con el NO, generando de esta forma especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el peroxinitrito<sup>149</sup>, que como ya ha sido descrito

---

<sup>146</sup> Kusano, K., et al. «Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption.» *Endocrinology*. 139 (1998): 1338-45.

<sup>147</sup> Solís-Herruzo, J.A., et al. «Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through stimulation of activator protein 1 transcription factor in cultured fibroblasts.» *J. Biol. Chem.* 274 (1999): 30919-26.

<sup>148</sup> Tang, C.H., et al. «IL-6 increases MMP-13 expression and motility in human chondrosarcoma cells.» *J Biol. Chem.* 286 (2011): 11056-66.

<sup>149</sup> Muller, G., et al. «Nitric oxide, NAD(P)H oxidase, and atherosclerosis.» *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009): 1711-31.

previamente, estimula la proliferación y migración de las VSMC y por lo tanto la formación de neoíntima.<sup>150</sup>

Centrándonos en el segundo objetivo y sabiendo que la permeabilidad vascular está directamente asociada con la disfunción del endotelio y por tanto con complicaciones cardiovasculares, y teniendo en cuenta que no existen herramientas de monitorización no invasivas que nos permitan evaluar el progreso de la regeneración endotelial. Para ello, decidimos evaluar si un agente de contraste (*gadofosveset*) podía ser empleado en RMN (Resonancia Magnética Nuclear), para conseguir detectar la permeabilidad vascular y lo que es más importante, aportar una herramienta no invasiva útil que nos permita evaluar a lo largo del tiempo la regeneración del endotelio después de un procedimiento en el que se ha producido denudado endotelial. Para ello, empleamos animales WT y KO para NOS3, ya que como hemos visto a lo largo de los resultados de esta tesis estos animales presentan un retraso en la recuperación endotelial después del procedimiento de denudado endotelial, siendo por tanto un control experimental muy útil en esta investigación.

Recientemente, Pedersen y colaboradores han demostrado como *gadofosveset* puede ser empleado en la detección de daño endotelial y angiogénesis en arterias coronarias en cerdo,<sup>151</sup> mientras que Phinikaridou y colaboradores, han confirmado cómo la función y permeabilidad del endotelio en modelos de aterosclerosis en ratón, puede ser monitorizada empleando este agente de contraste en RMN.<sup>152</sup> A este respecto

---

<sup>150</sup> Hirschberg, K., et al. «Combined superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger protects against neointima formation after endarterectomy in association with decreased proliferation and nitro-oxidative stress.» *Eur J Vasc Endovasc. Surg.* 40 (2010): 168-75.

<sup>151</sup> Pedersen, S.F., et al. «CMR assessment of endothelial damage and angiogenesis in porcine coronary arteries using *gadofosveset*.» *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 13 (2011).

<sup>152</sup> Phinikaridou, A., et al. «Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent.» *Circulation.* 126 (2012): 707-19.

y teniendo en cuenta que la disfunción del endotelio es un paso previo a la aparición de la aterosclerosis, hemos confirmado como la presencia gadofosveset está directamente relacionada con la recuperación de la capa endotelial del vaso dañado en los animales WT y KO para NOS3. La captación de gadofosveset en la pared del vaso es similar y con la misma distribución que la obtenida mediante la técnica invasiva de *Evans Blue*, técnica invasiva clásicamente empleada en el estudio de la permeabilidad, corroborando los resultados obtenidos mediante RMN.

Para consolidar los resultados obtenidos mediante RMN, decidimos emplear microscopía electrónica (TEM: Transmission electron microscopy), para evaluar en detalle la estructura del vaso después del denudado endotelial. A través de esta técnica comprobamos cómo la progresión de la enfermedad venía acompañada por la pérdida de la integridad de la capa íntima y como consecuencia mayores espacios entre las células. Estos cambios incrementaban la permeabilidad vascular a los constituyentes de la sangre y a gadofosveset, detectando la señal de contraste en la pared del vaso de las zonas afectadas. A un nivel de mayor detalle pudimos observar en ambos genotipos que las células endoteliales que retapizaban la zona afectada presentaban una morfología diferente, caracterizada por células con forma cuboidal o elongada, presencia de prolongaciones citoplasmáticas, vacuolización citoplasmática y desanclaje de la membrana basal, cambios directamente relacionados con un estado alterado del endotelio. En los animales KO para NOS3 fue detectada una recuperación más lenta de la capa endotelial asociada al desarrollo de hiperplasia de la neoíntima a los 30 días después del denudado endotelial, donde además de los cambios citados anteriormente se detectó desorganización de la capa media y roturas en las bandas de elastina. Cambios similares han sido puestos de manifiesto en otros modelos animales y en la

aterosclerosis humana,<sup>153,154,155,156</sup> apoyando los resultados obtenidos en esta tesis doctoral.

La estimación clínica de la función endotelial aporta información importante sobre futuros eventos cardiovasculares.<sup>157,158</sup> Aunque esta estimación clínica puede hacerse directamente mediante métodos invasivos como la angioplastia<sup>159</sup> o empleando ultrasonidos (Doppler).<sup>160</sup>

En los últimos años ha comenzado a emplearse RMN en pacientes con CAD para estimar el estado de sus arterias,<sup>161, 162, 163</sup> siendo uno de los primeros pasos para la detección temprana de posibles patologías cardiovasculares, mediante el uso de técnicas no invasivas. Colectivamente, nuestros datos sugieren que gadofosveset, empleado a dosis clínica, puede ser un agente de contraste adecuado para la detección y progresión

<sup>153</sup> Gerrity, R.G., et al. «Endothelial cell morphology in areas of in vivo Evans blue uptake in the aorta of young pigs. II. Ultrastructure of the intima in areas of differing permeability to proteins.» *Am. J. Pathol.* 89 (1977): 313-34.

<sup>154</sup> Lee, W.C., et al. «Effects of high-cholesterol diet on the interendothelial clefts and the associated junctional complexes in rat aorta.» *Atherosclerosis.* 155 (2001): 307-12.

<sup>155</sup> Gerrity, R.G., et al. «Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages.» *Am. J. Pathol.* 95 (1979): 775-92.

<sup>156</sup> Bürrig, K.F. «The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans.» *Arterioscler. Thromb.* 11 (1991): 1678-89.

<sup>157</sup> Schächinger, V., et al. «Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease.» *Circulation.* 101 (2000): 1899-906.

<sup>158</sup> Nitenberg, A., et al. «Epicardial coronary artery constriction to cold pressor test is predictive of cardiovascular events in hypertensive patients with angiographically normal coronary arteries and without other major coronary risk factor.» *Atherosclerosis.* 173 (2004): 115-23.

<sup>159</sup> Ludmer, P.L. «Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries.» *N. Engl. J. Med.* 315 (1968): 1046-51.

<sup>160</sup> Dupouy, P. «Assessment of coronary vasomotion by intracoronary ultrasound.» *Am. Heart. J.* 126 (1993): 76-85.

<sup>161</sup> Nguyen, P.K., et al. «Noninvasive assessment of coronary vasodilation using cardiovascular magnetic resonance in patients at high risk for coronary artery disease.» *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 10 (2008).

<sup>162</sup> Terashima, M., et al. «Impaired coronary vasodilation by magnetic resonance angiography is associated with advanced coronary artery calcification.» *JACC. Cardiovasc. Imaging.* 1 (2008): 167-73.

<sup>163</sup> Hays, A.G., et al. «Noninvasive visualization of coronary artery endothelial function in healthy subjects and in patients with coronary artery disease.» *J. Am. Coll. Cardiol.* 56 (2010): 1657-65.

## *Discusión*

---

de permeabilidad del endotelio mediante una técnica no invasiva como la RMN. Por ello, consideramos que esta tesis doctoral aporta una nueva herramienta con capacidad de evaluar la recuperación endotelial, lo que dota a nuestro estudio de un interés significativo para posibles futuros ensayos en humanos.

## *Conclusiones*

---

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral demuestran cómo NOS3 es una enzima clave en la formación de hiperplasia de la neoíntima después de un procedimiento de denudado endotelial.

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. Los animales KO para NOS3 presentan una re-endotelización más lenta y una mayor hiperplasia de la neoíntima después del protocolo de denudado endotelial.
2. La respuesta inflamatoria generada después del procedimiento de denudado endotelial es diferente en ausencia de NOS3, promoviéndose una mayor infiltración y acumulación de macrófagos de tipo pro-inflamatorio (M1) en la zona dañada.
3. En respuesta al daño vascular, la respuesta inflamatoria es dirigida por las células endoteliales a través del control de la plasticidad de los macrófagos. En particular, La ausencia de NOS3, estimula la re-polarización de macrófagos resolutivos de la inflamación (M2) hacia el fenotipo pro-inflamatorio (M1).
4. En los animales KO para NOS3, se detectan unos niveles de las citoquinas y quimiocinas IL-5, IL-6, GM-CSF, MCP-1, IFN $\gamma$  y VEGF significativamente mayores en comparación con los animales control.

5. NOS3 es necesario para la migración de las células endoteliales en respuesta a estímulos inflamatorios.
  
6. La presencia de estímulos pro-inflamatorios (M1) estimula la proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares (VSMC).
  
7. Proponemos que MMP-13 es al menos una de las dianas moleculares por las que el NO controla tanto la recuperación del endotelio como la generación de hiperplasia de la neoíntima. En este caso, la expresión de MMP-13 es regulada por iNOS en el sitio donde se ha producido el daño.
  
8. La permeabilidad vascular está reducida en los animales que expresan NOS3 en respuesta al daño vascular. Usando la técnica no invasiva de RMN, testamos la eficacia de un agente de contraste (gadofosveset) en la cuantificación y seguimiento de la recuperación endotelial en aortas denudadas a lo largo del tiempo. Hemos demostrado cómo esta tecnología, puede servir como una nueva herramienta para la evaluación y monitorización de la recuperación del endotelio en determinadas condiciones patológicas, mecanismo clave para el seguimiento de los pacientes y que hasta ahora ha sido difícil de evaluar mediante técnicas no invasivas.

## *Conclusions*

---

The results presented in this Doctoral Thesis show that NOS3 is a key factor in preventing arterial neointima hyperplasia and the mechanisms by which this enzyme provides protection in a mouse model of aortic endothelial denudation.

The conclusions of this Doctoral Thesis are:

1. After aortic endothelial denudation, NOS3 KO mice show slower endothelial recovery and extensive neointima hyperplasia when compared to NOS3 expressing wild type mice.
2. The inflammatory response generated after endothelial denudation is different in the NOS3 KO mice as compared to the NOS3 expressing mice. Lack of NOS3 promotes sustained inflammation together with increased number of pro-inflammatory M1 macrophages at the injured site.
3. In response to a vascular injury, the inflammatory response is driven by the endothelial cells through the regulation of macrophage plasticity. In particular, the absence of endothelial NOS3 stimulates re-polarization of M2 resolving macrophages into M1- pro-inflammatory cells.
4. NOS3 KO mice show increased plasma levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines IL-5, IL-6, GM-CSF, MCP-1, IFN $\gamma$  and VEGF, when compared to the levels found in NOS3 expressing mice.
5. NOS3 is required for endothelial cell migration in response to inflammatory stimuli.

6. The proliferation and migration of vascular smooth muscle cells are both stimulated by a pro-inflammatory environment, thereby favouring extensive neointima hyperplasia.
  
7. We postulate that MMP-13 is one of the targets of NO-mediated prevention of neointima hyperplasia. Under this case scenario, the expression of MMP-13 is regulated by inducible iNOS at the site of the injury.
  
8. Vascular permeability is reduced in NOS3 expressing mice in response to vascular injury. By using a non-invasive molecular MRI imaging approach, we tested the efficacy of a novel contrast agent (gadofosveset) to follow up and to quantify the level of endothelial recovery in denuded aortas over time. We believe that this cutting-edge technology, may serve as a brand new tool for the evaluation and monitoring of endothelial recovery in several pathological conditions, a key process for the patient, and very difficult to track non-invasively.