

Genética y biología molecular en cardiología (V)

# Temas actuales en biología vascular: puesta al día para el siglo XXI

Cam Patterson

Department of Internal Medicine, and Lineberger Comprehensive Cancer Center.  
University of North Carolina at Chapel Hill. Chapel Hill. North Carolina. EE.UU.

Aunque se da por sentado que los vasos sanguíneos desempeñan un papel primordial en la regulación del sistema cardiovascular en condiciones fisiológicas y patológicas, el mecanismo por el que lo hacen no ha sido comprendido hasta las últimas décadas. El campo de la biología vascular nació de esta apreciación de la primacía de los vasos sanguíneos en la patología cardiovascular. En esta revisión actualizamos varios temas de particular interés en el campo de la biología vascular del siglo XXI: principalmente el papel del estrés oxidativo en la función y la disfunción vascular; la angiogénesis y las terapias génicas angiogénicas, y los biomarcadores emergentes de aterosclerosis. Es probable que cada una de estas áreas experimente avances significativos en los años venideros que tendrán un impacto clínico directo sobre la toma de decisiones y el cuidado de los pacientes con enfermedades cardiovasculares.

**Palabras clave:** *Biología vascular. Estrés oxidativo. Angiogénesis. Terapia génica. Aterosclerosis.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 635-642)

## Current Topics in Vascular Biology: an Update for the 21<sup>st</sup> Century

Although taken for granted in the present day, the central role played by the blood vessels themselves in regulating the cardiovascular system under physiologic and pathologic conditions has only been understood in the last several decades. The field of vascular biology grew out of this appreciation of the primacy of the vasculature in cardiovascular pathologies. In this review, we come up to date on several topics of particular interest to the field of vascular biology as it enters the 21<sup>st</sup> century: namely, the role of oxidative stress in vascular function and dysfunction; angiogenesis and angiogenic gene therapies; and emerging biomarkers of atherosclerosis. Each of these areas is likely to experience significant advances in the coming years that will directly impact clinical decision-making and care of patients with cardiovascular diseases.

**Key words:** *Vascular biology. Oxidative stress. Angiogenesis. Angiogenic gene therapy. Atherosclerosis.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 635-642)

## INTRODUCCIÓN

Generalmente se atribuye el mérito de haber introducido el concepto moderno de sistema circulatorio en la medicina occidental a William Harvey, que describió la circulación continua de la sangre en su tratado *De Motu Cordis* en 1628. Durante los siguientes siglos, los médicos han añadido a su armamentario la capacidad de auscultar el corazón y medir la presión arterial, pero hasta la segunda mitad del siglo XX los

médicos y los científicos no reconocieron el papel de los vasos sanguíneos en la patogenia de las enfermedades cardiovasculares más comunes y debilitantes: la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad vascular periférica, el infarto de miocardio y la hipertensión arterial sistémica. Es precisamente este reconocimiento del papel central de los vasos sanguíneos como órganos diana en las principales patologías cardiovasculares lo que ha llevado al desarrollo de la biología vascular como un campo de estudio independiente durante las últimas décadas.

Durante el último siglo se han obtenido logros relevantes en el campo de la biología vascular. Se han descubierto importantes mediadores del tono vascular, la inflamación y la capacidad proliferativa –los principales han sido el óxido nítrico y la angiotensina–, y se han desarrollado herramientas farmacológicas para manipular sus efectos. Uno de los indicios del papel del endotelio vascular en la patogenia de la aterosclerosis

Sección patrocinada por el Laboratorio Dr. Esteve

Correspondencia: Dr. C. Patterson.  
The University of North Carolina at Chapel Hill.  
CB 7075, 324 Burnett Womack Building.  
Chapel Hill, NC 27599-7075. North Carolina. EE.UU.  
Correo electrónico: cpatters@med.unc.edu

rosis procede de los completos estudios de Russell Ross<sup>1</sup>. La importancia de la infiltración de células inflamatorias en las lesiones ateroscleróticas acaba de ser comprendida<sup>2</sup>, y están desarrollándose estrategias terapéuticas que actúan directamente sobre la respuesta inflamatoria.

Estos importantes logros en el campo de la biología vascular han tenido un enorme impacto sobre las terapias cardiovasculares durante los últimos 20 años. De los principales descubrimientos del siglo XX obtenidos por los biólogos vasculares se han desarrollado nuevos fármacos –como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, los inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa y los trombolíticos– y nuevos usos para fármacos antiguos –incluyendo la aspirina y los bloqueadores beta–. Es prácticamente imposible encontrar a alguien familiarizado con el campo de investigación que quiera apostar que el trabajo de los biólogos vasculares del siglo XXI será menos productivo que el de sus predecesores. Con estas reflexiones como preámbulo, el presente artículo proporciona una ocasión excelente para revisar algunos de los temas más interesantes y oportunos, y algunas de las controversias que existen en el campo de la biología vascular.

## ESTRÉS OXIDATIVO Y BIOLOGÍA VASCULAR

Aunque los intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) tienen unas funciones fisiológicas bien definidas –por ejemplo, la generación de descargas oxidativas por parte de los neutrófilos– los datos recientes aportan una conexión convincente entre la generación de especies reactivas del oxígeno y la formación de una lesión vascular<sup>3</sup>. Por ejemplo, las concentraciones fisiológicas de IRO (superóxido y peróxido de hidrógeno) pueden provocar respuestas de crecimiento en las células musculares lisas de los vasos<sup>4</sup>. Actualmente se sabe que los IRO inducen la activación de vías de señalización intracelulares relacionadas con el crecimiento de una forma similar a como lo hacen los factores de crecimiento endógenos, lo que indica que los IRO pueden encontrarse en la ruta metabólica de la señalización intracelular de algunos factores de crecimiento<sup>5</sup>. A pesar de las evidencias que establecen una conexión entre los IRO y la aterogénesis, numerosos ensayos clínicos en humanos han sido incapaces de demostrar un beneficio convincente de la terapia antioxidante en pacientes con aterosclerosis<sup>6-9</sup>. Las discrepancias entre los estudios experimentales que relacionan la generación de los IRO y la formación de una lesión vascular, por una parte, y la carencia de efectos beneficiosos de las estrategias antioxidantes en los ensayos clínicos, por otra, ha sido denominada «la paradoja oxidativa»<sup>10</sup>. Es un requisito imprescindible para la biología vascular del próximo siglo resolver esta paradoja aumentando nuestro conocimiento sobre el papel que desempeñan los IRO en los acontecimientos vasculares.

## Generación de oxidantes en células vasculares

A partir de estudios como los de Berk et al, que demuestran que los IRO pueden inducir directamente la proliferación de células musculares de los vasos<sup>4</sup>, muchos grupos se han preguntado si los IRO son mediadores fisiológicos de señalización en las células vasculares y, en caso afirmativo, cuál es su procedencia. De hecho, ahora sabemos que las células que se encuentran en los vasos sanguíneos, incluyendo las células endoteliales y las células musculares lisas, generan IRO<sup>11,12</sup>. Éstos son mediadores importantes de los efectos de factores proaterogénicos, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y la trombina<sup>13,14</sup>. Además, la trombosis por sí misma es probablemente un potente mecanismo iniciador de la generación de IRO en los vasos sanguíneos<sup>15</sup>.

Si la generación de IRO entre las células vasculares desempeña un papel en los procesos de señalización celular asociados con la formación de la lesión aterosclerótica, entonces el origen de estas especies oxidativas sería una potencial diana terapéutica. Aunque existen varias fuentes generadoras de especies oxidantes en las células vasculares, los estudios más recientes implican a la oxidasa NAD(P)H de las células musculares lisas como la mediadora de los procesos oxidativos. Se han identificado varios de los componentes de esta oxidasa que, aunque se parece, es distinta de la oxidasa NADPH fagocítica, y que incluyen la p22<sup>phox</sup>, la p47<sup>phox</sup> y un componente específico de las células musculares lisas llamado MOX1<sup>14,16,17</sup>. En particular, la p47<sup>phox</sup> se activa rápidamente en las células musculares lisas en respuesta a la estimulación con agentes como la trombina<sup>14</sup>, y la regulación de este componente puede ser un importante mecanismo por el que la generación de los IRO es controlada en las células musculares lisas, lo que lo convierte en una diana potencial interesante para intervenir en las enfermedades vasculares.

## Consecuencias de la generación de IRO y su conexión con la aterogénesis

Existen diversas dianas en la ruta metabólica de la señalización mediada por los IRO, que incluyen las proteincinasas reguladas por señales extracelulares y las proteincinasas activadas por estrés (ERKs y SAPKs), y los factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa$ B, o la familia de los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT)<sup>3</sup>. Estas vías están bien conectadas con los acontecimientos proaterogénicos; por ejemplo, la activación del factor nuclear  $\kappa$ B es un estímulo potente para el reclutamiento de células inflamatorias dentro de las lesiones vasculares<sup>18</sup>, y la activación del ERK media las respuestas proliferativas en las células musculares lisas<sup>19</sup>. Sin embargo, si-

que siendo difícil reconciliar el hecho de que los IRO de vida corta, como el superóxido o el peróxido de hidrógeno, puedan ser los mediadores de los cambios celulares a largo plazo que están asociados con la aterosclerosis. Una posibilidad es que los lípidos, proteínas y ADN sean modificados oxidativamente por las especies reactivas del oxígeno, y que estas proteínas modificadas tengan una vida larga y consecuencias deletéreas para los vasos (fig. 1). La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad constituye un excelente ejemplo de este tipo de procesos<sup>20</sup>. Además, el 4-hidroxinonenal es un producto de los ácidos grasos modificados oxidativamente con unos efectos de bastante larga duración y que puede tener propiedades aterogénicas<sup>21</sup>. La modificación oxidativa del ADN, especialmente dentro del genoma mitocondrial, puede también ser responsable de algunos de los cambios a largo plazo de la función celular que pueden resultar en una progresión de la aterosclerosis<sup>22</sup>.

### Marcadores de daño oxidativo como indicadores de aterogénesis

Al igual como ocurre con la hipertensión y la hiperlipemia, el incremento del estrés oxidativo puede ser un factor de riesgo sólo para un subgrupo de pacientes con aterosclerosis. Sin embargo, no disponemos en la actualidad de métodos que sean lo suficientemente buenos como para determinar cuáles son los individuos que tienen mayores probabilidades de beneficiarse de una terapia antioxidante. Imaginemos cuál es la probabilidad de determinar la eficacia de una medicación antihipertensiva que fuera aplicada a la población en general, o del uso de las medicaciones que reducen el colesterol utilizadas indiscriminadamente y sin conocimiento de los valores del colesterol sérico. Hay indicios de que se puede llegar a desarrollar un marcador de este tipo (o grupo de marcadores): la medida de los isoprostanos F2<sup>23</sup> y el método recientemente descrito para medir el daño del ADN mitocondrial<sup>22</sup> se perfilan como estrategias prometedoras. Se están llevando a cabo estudios clínicos de éstos u otros marcadores oxidativos para identificar a aquellos pacientes en los que el estrés oxidativo puede ser un importante factor de riesgo aterogénico. El desarrollo de estrategias que vayan dirigidas a los IRO como método de prevención o tratamiento de la enfermedad vascular es un aspecto fundamental y crítico para los biólogos vasculares en los próximos años.

### ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos existentes. La naturaleza ha conducido el proceso angiogénico para crear vasos sanguíneos durante el desarrollo, para controlar los procesos reproductivos y, como res-

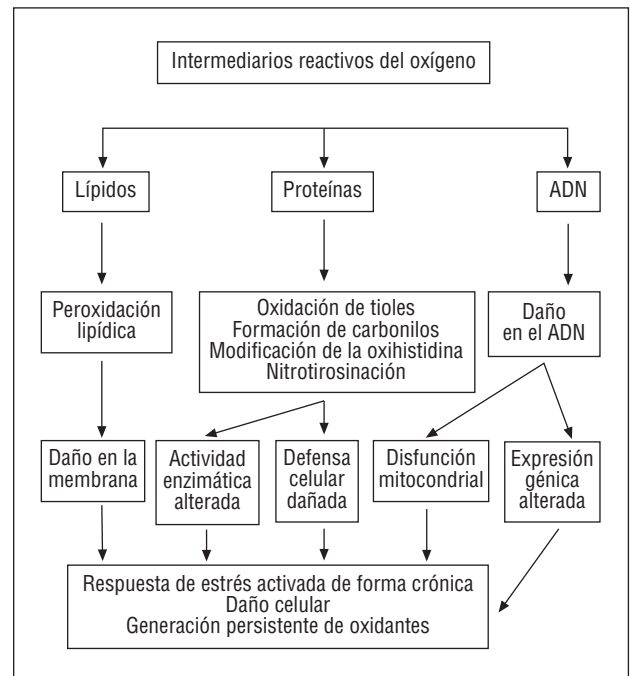


Fig. 1. Posibles vías por las que el estrés oxidativo puede inducir lesión celular en los vasos sanguíneos e iniciar el proceso de aterosclerosis.

puesta al daño, la inflamación y la isquemia. Además, la angiogénesis participa en gran medida en condiciones patológicas como el crecimiento tumoral y la metástasis, la enfermedad microvascular diabética y las retinopatías proliferativas, situaciones todas ellas en las que los nuevos vasos sanguíneos pueden o bien nutrir un proceso patológico, o bien ser ellos mismos los factores mórbidos. El interés por la angiogénesis que han desarrollado los biólogos vasculares ha crecido en diversos frentes. En este trabajo vamos a considerar el papel desempeñado por la angiogénesis en la contribución de la formación de la neointima y la aterosclerosis, pero primero vamos a examinar el uso potencial de la angiogénesis y de los factores angiogénicos como terapias para las enfermedades vasculares isquémicas.

### Estrategias angiogénicas para tratar enfermedades vasculares isquémicas

La creación de nuevos conductos vasculares para aumentar el flujo sanguíneo es una vieja historia; después de todo, la cirugía de *bypass* arterial coronario se basa en este principio. El uso de factores de crecimiento angiogénicos, y en particular la terapia génica angiogénica, son enfocados como medios para conseguir este objetivo —el llamado «*bypass* molecular»—. La esperanza que aportan las terapias angiogénicas es que se pueda mejorar el flujo sanguíneo en las zonas isquémicas, tanto en la circulación central como en la periférica, mediante la inducción de la angiogénesis, de una forma que sea menos invasiva, más beneficiosa,

o que pueda ser aplicada de forma más amplia que las terapias farmacológicas, intervencionistas o quirúrgicas que existen actualmente.

Varios grupos, entre los que destaca el grupo liderado por Jeffrey Isner en Boston, han sido los propulsores de la idea de que los factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial (VEGF), pueden ser utilizados para mejorar los resultados del tratamiento de las enfermedades vasculares isquémicas. De hecho, los primeros estudios realizados en modelos de isquemia en conejos o perros demostraron la capacidad de la proteína VEGF administrada por vía intravenosa para aumentar la formación de colaterales en los tejidos isquémicos<sup>24,25</sup>. Estos experimentos de prueba de principio provocaron una explosión del interés sobre el papel de los factores de crecimiento angiogénicos entre los biólogos vasculares. Teniendo en cuenta que los principales grupos en este campo ya están desarrollando las primeras fases de estudios en humanos con el fin de probar la seguridad y eficacia de las estrategias terapéuticas angiogénicas, merece la pena considerar el estado en el que se encuentran estos estudios.

El grupo de Isner es el que ha recibido mayor notoriedad por su trabajo en este campo. Este grupo ha utilizado la terapia génica angiogénica a partir de plásmidos que llevan el gen VEGF. Los plásmidos son moléculas de ADN pequeñas, circulares y relativamente inertes. Pueden ser inyectados localmente en tejidos que están isquémicos, pero se captan de forma ineficiente por la mayoría de células y están desprotegidos contra los sistemas de vigilancia celulares. En general, se considera que las proteínas expresadas por los plásmidos aparecen de forma transitoria y en pocas células. Sin embargo, el grupo de Isner demostró que la terapia génica angiogénica basada en los plásmidos era práctica y producía efectos a largo plazo sobre la formación de colaterales en los modelos animales<sup>26</sup>.

A partir de estos estudios en animales se iniciaron dos ensayos en fase I para probar la terapia de plásmidos VEGF en humanos. El primer protocolo examina los efectos de la inyección de VEGF en músculos isquémicos de pacientes con isquemia crítica en las extremidades<sup>27</sup>, y el segundo prueba la actividad del plásmido VEGF administrado por inyección directa vía minitoracotomía en pacientes con isquemia miocárdica<sup>28</sup>. Los resultados presentados hasta el momento a partir de estos estudios en fase I se encuentran en forma de descripción de casos clínicos no controlados y, por tanto, no aportan conclusiones sobre la eficacia de estos métodos. Incluso ha surgido cierta preocupación en relación con la invasibilidad del ensayo de isquemia miocárdica, ya que requiere anestesia general y una incisión para la toracotomía<sup>29</sup>. Por otra parte, los estudios experimentales no han abordado plenamente los potenciales efectos adversos de estas terapias, como la retinopatía proliferativa, que pueden desenmascarar tumores latentes, y la formación de un angio-

ma en el lugar de la inyección<sup>30,31</sup>. A pesar de esto, los hallazgos iniciales que se han obtenido en los estudios humanos son, por lo menos, alentadores.

Acaban de ser publicados los resultados de otros ensayos en humanos que se encuentran en las fases iniciales y que se están llevando a cabo actualmente. Los ensayos que se han mencionado con anterioridad basados en la terapia con plásmidos con VEGF para el tratamiento de la enfermedad vascular periférica<sup>27</sup> y la isquemia miocárdica<sup>28</sup> están aportando resultados prometedores, aunque todavía preliminares, en estudios no controlados. Además, un estudio realizado con adenovirus que expresan VEGF y que se administran de manera complementaria a la cirugía de *bypass* o como terapia única vía toracotomía, ha demostrado la seguridad de este tipo de abordajes en un reducido número de pacientes<sup>32</sup>. La proteína VEGF también ha sido administrada por vía intracoronaria en un estudio reducido y no aleatorizado, sin que se hayan encontrado evidencias de toxicidad y con unas mejorías limitadas en algunos objetivos clínicos<sup>33</sup>.

Aunque se ha prestado una gran atención a la terapia angiogénica basada en el VEGF, existen otros factores angiogénicos que se están estudiando en los ensayos clínicos humanos. El factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1) es una proteína que se ha administrado por inyección en el miocardio de pacientes sometidos a cirugía de *bypass*<sup>34,35</sup>. A pesar de que la administración de estas terapias en el momento del *bypass* limita la probabilidad de que se observen mejorías clínicas en estudios a corto plazo, se han descrito respuestas angiogénicas y mejorías en la perfusión en el seguimiento angiográfico. En un estudio similar, en el que se administró FGF-2 en forma de microcápsulas de liberación continua en el miocardio isquémico pero revascularizable en el momento del *bypass*, se han observado mejorías en los índices no invasivos de perfusión en un subgrupo de pacientes<sup>36</sup>. Finalmente, también se ha administrado la proteína FGF-2 por vía intracoronaria o intravenosa en un reducido número de pacientes no aleatorizados, y se ha obtenido una disminución en la isquemia inducida por estrés<sup>37</sup>.

### **Papel de la angiogénesis en la progresión de la lesión aterosclerótica y en la formación de la neointima**

Para aquellos que están familiarizados principalmente con la angiogénesis basada en los ensayos clínicos con fines terapéuticos, puede parecer paradójico que tenga también un efecto deletéreo sobre la formación de la lesión vascular. No obstante, la formación de nuevos vasos sanguíneos es un componente de la lesión aterosclerótica que se conoce desde hace tiempo. Koestner fue el primero que describió la vascularización de las lesiones ateroscleróticas en 1876<sup>38</sup>. Tanto entre distintas especies como dentro de una misma es-

pecie, la media de los vasos sanguíneos se mantiene avascular hasta que se alcanza una anchura crítica a partir de la cual la vascularización es imprescindible para su nutrición<sup>39</sup>. El aumento del flujo sanguíneo que se produce en las lesiones ateroscleróticas se debe a la formación de nuevos vasos en la media más que a la dilatación de los vasos existentes<sup>40</sup>. Los nuevos vasos que se forman en las lesiones ateroscleróticas proceden de la ramificación de los *vasa vasorum* de la adventicia<sup>41</sup>. La posibilidad de que la neovascularización contribuya a la fisiopatología de la aterosclerosis fue reconsiderada cuando Barger et al demostraron por cinefluorografía la presencia de redes complejas de vasos rodeando las placas ateroscleróticas humanas<sup>42</sup>.

Existen diversos mecanismos por los que la neovascularización puede contribuir a las consecuencias clínicas de la aterosclerosis. La neovascularización proporciona una fuente de nutrientes, factores de crecimiento y moléculas vasoactivas a las células dentro de la media y la neointima, como se pone de manifiesto por la asociación que existe entre la neovascularización de las lesiones ateroscleróticas y la proliferación de las células musculares lisas adyacentes<sup>43</sup>. La hemorragia de la íntima, que se asocia con la inestabilidad de la placa, se debe a la rotura de la compleja red de capilares friables de nueva formación que se encuentran rodeando las lesiones<sup>44</sup>. La regulación del flujo sanguíneo a través de los microvasos de la placa puede contribuir a la fisiopatología del vasospasmo en lesiones avanzadas<sup>45</sup>. El remodelado de la pared vascular, que es un problema particular asociado con la vasculopatía del envejecimiento, parece estar relacionado en parte con el proceso de neovascularización<sup>46</sup>. Por último, la neovascularización dentro de las lesiones ateroscleróticas humanas está asociada con la expresión de moléculas de adhesión, lo que a su vez está estrechamente relacionado con el reclutamiento de células inflamatorias de la neointima<sup>47,48</sup>.

Todos estos estudios demuestran de forma plausible la existencia de una conexión entre la angiogénesis y el incremento de la formación de la lesión vascular. Recientemente, colaboradores del laboratorio de Folkman han aportado evidencias convincentes de que la formación de la lesión vascular es dependiente de la angiogénesis, ya que puede ser inhibida por los inhibidores de la angiogénesis endostatina y TNP-470 en ratones Apo (-/-) proclives a la aterosclerosis<sup>49</sup>. Es interesante señalar que los mecanismos que subyacen a la angiogénesis en las lesiones vasculares –principalmente el incremento de la producción de VEGF<sup>50</sup>– son los mismos que son utilizados terapéuticamente para producir angiogénesis. Estos estudios plantean la posibilidad de que una de las consecuencias adversas de las estrategias terapéuticas angiogénicas pueda ser el efecto paradójico de acelerar la propia enfermedad que se pretende tratar. Parece claro que van a ser necesarios más trabajos para desentrañar el papel que la angiogé-

nesis pueda desempeñar en la enfermedad vascular isquémica, y el potencial terapéutico de los agentes moduladores de la respuesta angiogénica.

## NUEVOS FACTORES DE RIESGO PARA LA ATEROGENESIS

Sigue siendo uno de los mayores retos que se plantean en la biología vascular del nuevo siglo el descubrimiento de nuevos factores de riesgo en la aterogénesis y la identificación de intervenciones primarias apropiadas. Ya se ha discutido con anterioridad el papel del estrés oxidativo como un factor de riesgo emergente. Nos vamos a centrar ahora en la hiperhomocisteinemia, los marcadores de la inflamación crónica y los agentes infecciosos, como factores de riesgo potenciales para considerar en las predicciones de probabilidad de aterosclerosis.

### Hiperhomocisteinemia

La homocistinuria (hiperhomocisteinemia genética severa) es una enfermedad de la infancia que se caracteriza por retraso mental, anemia megaloblástica y una forma severa de enfermedad vascular trombótica que suele ser fatal en las primeras décadas de la vida. La similitud en la naturaleza de este síndrome (aunque de forma acelerada) en comparación con la aterosclerosis condujo a los investigadores a proponer la «teoría de la homocisteína de la aterosclerosis»<sup>51</sup>, en la que elevaciones menos severas de la homocisteína plasmática fueron postuladas como factores causales en la aterogénesis. Contrariamente a lo que ocurre en pacientes con homocistinuria (en los que las concentraciones de homocisteína plasmática en ayunas pueden sobrepasar los 400  $\mu\text{mol/l}$ ), los pacientes con hiperhomocisteinemia pueden tener concentraciones de homocisteína plasmática que estén en el límite superior de la normalidad o ligeramente por encima ( $> 15 \mu\text{mol/l}$ ). Las elevaciones de esta magnitud pueden ser debidas a una deficiencia heterocigótica o a alelos hipomórficos de enzimas (como cistationina  $\beta$ -sintasa y metilene-tetrahidrofolato reductasa), deficiencias vitamínicas (folato y vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>), algunos fármacos y trastornos médicos crónicos.

Teniendo en cuenta la conocida asociación que existe entre las concentraciones elevadas de homocisteína y la trombosis<sup>52</sup>, el daño celular endotelial<sup>53</sup> y la proliferación de células musculares lisas<sup>54</sup>, es lógico proponer un papel causal para las concentraciones elevadas de homocisteína en la aterosclerosis. En este sentido, diversos estudios han aportado datos epidemiológicos sólidos en favor de esta asociación<sup>55,56</sup> que sugieren que la elevación de las concentraciones de homocisteína ligeramente por encima de lo normal (16  $\mu\text{mol/l}$ ) confieren un riesgo tres veces superior de presentar una enfermedad coronaria. Hay que tener en cuenta,

sin embargo, que no todos los resultados de los estudios prospectivos son consistentes<sup>57</sup>. No se pueden extraer conclusiones firmes sobre esta causalidad hasta que se concluyan los estudios clínicos prospectivos aleatorizados y diseñados para probar los efectos de los agentes que disminuyen las concentraciones de homocisteína sobre la mortalidad cardiovascular (varios de ellos se están llevando a cabo en estos momentos).

A pesar de la persistencia de interrogantes sobre la posible conexión causal entre la homocisteína y la aterogénesis, la determinación de las concentraciones de homocisteína tiene probablemente un lugar en la práctica clínica, en la medida que el tratamiento primario de la hiperhomocisteinemia leve consiste en un tratamiento de prueba con vitaminas (B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y folato), incluso en pacientes que no tienen una deficiencia vitamínica franca. Por tanto, no está descaminado examinar a pacientes con enfermedad coronaria (o con importantes antecedentes familiares) y que no tengan otros factores de riesgo importantes, en un intento de descubrir aquellos casos que puedan verse beneficiados de una terapia con vitaminas. Esto no descarta, por supuesto, que los estudios en curso puedan sugerir un uso más amplio de estos suplementos vitamínicos en todos los pacientes que se sabe que tienen, o que están en riesgo de tener, enfermedad arterial coronaria.

## Agentes infecciosos

Durante el pasado siglo se propuso de manera intermitente una conexión entre los agentes infecciosos y la aterosclerosis<sup>58</sup>. La demostración de que la infección viral podía ejercer un papel causal en un modelo animal<sup>59</sup> ha hecho que esta conexión sea plausible. Hasta la fecha se han propuesto numerosos agentes infecciosos como posibles causantes de la progresión de la lesión aterosclerótica, entre ellos la familia de los herpes virus, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* y las infecciones dentales bacterianas<sup>60</sup>. Las evidencias que apoyan la conexión entre infección y aterogénesis se basan, en distintas proporciones, en una demostración directa del agente infeccioso en las lesiones vasculares, en datos que se derivan de estudios animales y en evidencias epidemiológicas basadas en marcadores séricos de infección. También existen algunas evidencias clínicas que sugieren que la terapia con macrólidos y con tetraciclina puede ser protectora contra el infarto de miocardio (posiblemente por actuar sobre *C. pneumoniae*)<sup>61-64</sup>, aunque los resultados que se han presentado hasta ahora sobre este aspecto han sido más bien confusos. La determinación de un papel causal se ve obstaculizada, en parte, por el gran número de posibles agentes infecciosos involucrados que se han propuesto. Se están llevando a cabo una serie de estudios clínicos con el fin de probar la hipótesis infecciosa mediante el tratamiento de pacientes con enfermedad arterial coronaria con diferentes regímenes

antibióticos. Si se prueba la eficacia del uso de agentes antimicrobianos en todos los pacientes con enfermedad coronaria, o en un subgrupo de ellos, la terapia antiaterosclerótica experimentaría una revolución análoga a la que supuso el tratamiento de las infecciones por *H. pylori* en pacientes con úlceras gástricas.

## Marcadores de la inflamación

Actualmente está bien aceptado que la aterosclerosis es una enfermedad con un fuerte componente inflamatorio<sup>65,66</sup> que incluye la infiltración de las lesiones avanzadas con células inflamatorias<sup>2</sup>. La idea general que se ha tenido es que esta inflamación era intermitente, se encontraba localizada, y que era poco probable que se pusiera de manifiesto sistémicamente. Los datos más recientes sugieren otra cosa. Aunque existe una gran variedad de marcadores de la inflamación que se considera que ponen de manifiesto lesiones ateroscleróticas inestables, incluyendo las moléculas de adhesión solubles<sup>67</sup>, una gran parte de la atención se ha centrado en la proteína C reactiva (PCR) como un marcador de riesgo de los síndromes coronarios inestables. A pesar de que se cree que la PCR no es un marcador específico de la inflamación sistémica, debido a que es un reactante de fase aguda, en tres ensayos clínicos prospectivos (el Multiple Risk Factor Intervention Trial, el Physician's Health Study y el Women's Health Study) se ha identificado una asociación entre las concentraciones de PCR y el incremento de riesgo de enfermedad arterial coronaria<sup>68-70</sup>. Este riesgo persiste después de ajustar para otros factores de riesgo conocidos para la enfermedad coronaria.

A pesar de la carencia de datos que sugieran que las concentraciones elevadas de PCR deban ser un objetivo terapéutico, no deja de ser atractivo especular sobre la posibilidad de que agentes antiinflamatorios no específicos, como la aspirina, puedan ser beneficiosos en estos pacientes. A medida que fármacos antiinflamatorios más selectivos (como los inhibidores de la ciclooxigenasa) sean considerados como agentes antiaterogénicos, se puede considerar el potencial que supondría encontrar una «receta» de una terapia antiinflamatoria basada en los marcadores circulantes.

## CONCLUSIÓN

Mirando el futuro, tienen que resolverse muchos aspectos importantes de la medicina cardiovascular. A medida que mejora nuestra habilidad para estudiar pacientes de forma no invasiva en busca de indicios de mejoría en su estado aterogénico, podremos considerar las nuevas terapias –antioxidantes, agentes angiogénicos (o antiangiogénicos), antibióticos específicos o antiinflamatorios– para el tratamiento de nuestros pacientes. De hecho, las terapias más estimulantes del futuro están por venir y dependen de los estudios

del biólogo vascular del futuro, quizás aquel que se encuentra en estos momentos en proceso de formación. Nuestra comprensión y habilidad para tratar las enfermedades arteriales coronarias ha evolucionado muy rápidamente, a lo mejor más de lo que pensamos. No hay razones para no suponer que este conocimiento se va a acelerar aún más en los próximos años para beneficio de nuestros pacientes.

## AGRADECIMIENTO

La investigación en el laboratorio del autor está financiada por las becas HL03658 y AG15234.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977; 86: 675-684.
- Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques in characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89: 36-44.
- Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000; 87: 179-183.
- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992; 70: 593-599.
- Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11: 118-124.
- Investigators GP. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999; 354: 447-455.
- Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, Huttunen JK, Albanes D, Taylor PR et al. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997; 349: 1715-1720.
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781-786.
- Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 154-160.
- Patterson C, Madamanchi N, Runge MS. The oxidative paradox: another piece of the puzzle. *Circ Res* 2000; 87: 1074-1076.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-1148.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546-2551.
- Sundaresan M, Yu Z-X, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 296-299.
- Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C et al. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin: evidence that p47<sup>phox</sup> may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274: 19814-19822.
- Saldeen T, Li D, Mehta JL. Differential effects of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol on LDL oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1208-1215.
- Ushio-Fukai M, Zafari A, Fukui T, Ishizaka N, Griendling K. p22<sup>phox</sup> is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 23317-23321.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401: 79-82.
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1866-1874.
- Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 77: 29-36.
- Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963-20966.
- Ruef J, Rao GN, Li F, Bode C, Patterson C, Bhatnagar A et al. Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Circulation* 1998; 97: 1071-1078.
- Ballinger SW, Patterson C, Yan C-N, Doan R, Burow DL, Young CG et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 86: 960-966.
- Pratico D, Barry OP, Lawson JA, Adiyaman M, Hwang SW, Khanapure SP et al. IPF2alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3449-3454.
- Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; 89: 2183-2189.
- Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662-670.
- Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94: 3281-3290.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K et al. Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-1121.
- Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF<sub>165</sub> as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800-2804.
- Patterson C, Runge MS. Therapeutic myocardial angiogenesis via vascular endothelial growth factor gene therapy: moving on down the road. *Circulation* 2000; 102: 940-942.
- Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000; 102: 898-901.
- Scharwz ER, Speakman MT, Patterson M, Hale SS, Isner JM, Kedes LH et al. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat - angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1323-1330.

32. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100: 468-474.
33. Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ et al. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* 2000; 101: 118-121.
34. Schumacher B, Stegmann T, Pecher P. The stimulation of neoangiogenesis in the ischemic human heart by the growth factor FGF: first clinical results. *J Cardiovasc Surg* 1998; 39: 783-789.
35. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998; 97: 645-650.
36. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Ware JA, Brown DL et al. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 1865-1871.
37. Udelsion HE, Dilsizian V, Laham RJ, Chronos N, Vansant J, Blais M et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 1605-1610.
38. Koestner W. Endarteritis and arteritis. *Berl Klin Wochenschr* 1876; 13: 454-455.
39. Wolinsky H, Glagov S. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res* 1967; 20: 409-421.
40. Heistad DD, Armstrong ML. Blood flow through vasa vasorum of coronary arteries in atherosclerotic monkeys. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 326-331.
41. Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Human Pathology* 1995; 26: 450-456.
42. Barger AC, Beeuwkes R, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. *N Engl J Med* 1984; 310: 175-177.
43. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB et al. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1994; 145: 883-894.
44. Zamir M, Silver M. Hemorrhagic and microvascular phenomena within the arterial wall. *Can J Cardiol* 1992; 8: 981-984.
45. Egashira K, Inou Y, Hirooka Y, Yamada A, Marouka Y, Kai H et al. Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993; 91: 29-37.
46. Carmeliet P, Collen D. Gene targeting and gene transfer studies of the plasminogen/plasmin system: implications in thrombosis, hemostasis, neointima formation, and atherosclerosis. *FASEB J* 1995; 9: 934-938.
47. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; 92: 945-951.
48. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996; 93: 672-682.
49. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 99: 1726-1732.
50. Ruef J, Hu ZY, Yin LY, Wu Y, Hanson SR, Kelly AB et al. Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. *Circ Res* 1997; 81: 24-33.
51. McCully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22: 215-227.
52. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909-1916.
52. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocysteinemia: Vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974; 291: 537-543.
54. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6369-6373.
55. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probably benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1994; 274: 1049-1057.
56. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-881.
57. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999; 131: 363-375.
58. Frothingham C. The relation between acute infectious diseases and arterial lesions. *Arch Intern Med* 1911; 8: 153-162.
59. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med* 1978; 148: 335-340.
60. Fong IW. Emerging relations between infectious diseases and coronary artery disease and atherosclerosis. *CMAJ* 2000; 163: 49-56.
61. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, Allen A, Trehan S, Nielson C et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection. *Circulation* 1999; 99: 1540-1547.
62. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 404-407.
63. Gurfinkel C, Bozovich G, Doroca A, Beck E, Mautner B. Randomized trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: The ROXIS pilot study. *Lancet* 1997; 350: 404-407.
64. Gurfinkel C, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellura B, Mautner B. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS study. *Eur Heart J* 1999; 20: 121-127.
65. Libby P, Galis Z. Cytokines regulate genes involved in atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1995; 748: 158-168.
66. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Int Med* 2000; 247: 349-358.
67. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentrations of soluble intracellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy young men. *Lancet* 1998; 351: 88-92.
68. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study: Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 537-547.
69. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973-979.
70. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998; 98: 731-733.