

## ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y ALTERACIONES CROMOSOMICAS DE LAS CELULAS MUSCULARES LISAS EN LA ATEROESCLEROSIS

GRACIELA FERNANDEZ ALONSO<sup>1</sup>, DANIEL R. GRANA<sup>2</sup>, PAOLA TURCONI<sup>3</sup>, BARBARA COLOMBO<sup>3</sup>, ANNA MARIA LAVEZZI<sup>3</sup>, JOSE MILEI<sup>4, 5</sup>, LUIGI MATTURRI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Diagnóstico Maipú; <sup>2</sup> Area de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador; <sup>3</sup> Ospedale Maggiore, IRCCS, Università di Milano, Italia; <sup>4</sup> Cátedra de Cardiología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador; <sup>5</sup> Unidad Docente Hospitalaria Fernández, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** La causa de muerte más frecuente en los países desarrollados es la aterosclerosis. Sus lesiones características, además del depósito lipídico, son el engrosamiento focal de la pared arterial con proliferación de células musculares lisas (CML) e infiltración mononuclear y presencia de vasos neoformados. En este trabajo estudiamos el fenómeno proliferativo y las alteraciones citogenéticas de las CML. Estas células, identificadas mediante inmunohistoquímica por su expresión de actina muscular específica, eran diploides, con un alto índice de proliferación demostrado por expresión de la proteína nuclear PCNA. Un porcentaje elevado de CML expresó intensamente a la oncoproteína p53. Además se encontraron claros indicios de inestabilidad cromosómica. Los hallazgos más frecuentes fueron la trisomía del cromosoma 7 y la monosomía del cromosoma 11. También se observó amplificación del gen FGF-3. Estos hallazgos permiten inferir que la proliferación de CML es activa, tiene relación con la acumulación o mutación de la oncoproteína p53 y además presenta alteraciones cromosómicas específicas y relacionadas con los factores de crecimiento. La presencia de este tipo de cambios nos lleva a considerar a la hiperplasia de las CML en la placa ateromatosa como una expansión celular de carácter clonal.

**Abstract** *Proliferative activity and chromosomal alterations of smooth muscle cells in atherosclerosis.*

Atherosclerosis is the most frequent cause of death in industrialized countries. Lesions are characterized by lipid deposits, focal thickening of the arterial wall with proliferation of smooth muscle cells (SMC), mononuclear infiltrates and neoformed vessels. In this paper, we studied the proliferative characteristics and cytogenetic alterations of SMC. These cells, expressing specific muscular actin, were diploid with an increased proliferative index for PCNA. A high percentage of SMC showed intense expression of p53. There were signs of chromosomal instability, being the most frequent findings chromosome 7 trisomy and chromosome 11 monosomy. Additionally, the gene for FGF-3 showed a marked amplification. These findings strongly suggest that SMC proliferation is active, and is related to the accumulation or mutation of the p53 oncoprotein. It also presents specific chromosomal alterations in close relation with growth factors. According to these findings SMC hyperplasia in the atherosclerosis plaque may be considered as a cellular clonal expansion.

**Key words:** atherosclerosis, smooth muscle cells, atherosclerotic plaque, chromosomal alterations

La causa de óbito más frecuente en los países desarrollados es la aterosclerosis a través de las enfermedades coronaria, cerebrovascular y arterial periférica<sup>1</sup>.

La formación de placas ateroscleróticas está dada por: a) la proliferación de macrófagos y de células musculares lisas (CML), b) el depósito de tejido conectivo por parte de estas células originando, por ejemplo, la cápsula fibrosa y c) el acúmulo de restos necróticos los cuales contienen cristales de colesterol y otros lípidos (lipoproteínas) dentro de una matriz de proteoglicanos y tejido conectivo<sup>2, 3</sup>.

Según la hipótesis de la respuesta a la lesión, que es la más aceptada para explicar la aterogénesis, es fundamental que exista disfunción endotelial en este proceso, la cual provoca alteraciones en las CML llevándolas hacia la proliferación celular<sup>4</sup>.

Esta respuesta inflamatoria fibroproliferativa exagerada lesiona de diversa manera a las células endoteliales y a las CML de las arterias musculares de mediano y gran calibre<sup>5-7</sup>. Estos complejos procesos se relacionan con la proliferación, migración y muerte celular junto con la síntesis y proteólisis de la matriz extracelular<sup>8</sup>. Con ellos se reconocen como factores predisponentes la hipertensión, la obesidad, el tabaquismo, la presencia de lipoproteínas oxidadas de baja densidad, y, en los últimos años se han añadido a la lista algunos agentes infecciosos como la *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter*

Recibido: 24-XI-1999

Aceptado: 18-VI-2000

**Dirección postal:** Dra. Graciela Fernández Alonso, Diagnóstico Maipú, Av. Maipú 1668, 1638 Vicente López, Argentina  
Fax: (54-11) 4795-2600 e-mail: mc141089@satlink.com

*pylori*, cytomegalovirus<sup>9</sup> así como alteraciones cromosómicas y apoptosis tanto en CML como en macrófagos.

La actividad proliferativa aumentada de las CML se debería a una inestabilidad cromosómica<sup>10, 11</sup>. En un trabajo previo, nuestro equipo ha demostrado que es frecuente encontrar alteraciones del cromosoma 7, especialmente trisomía, en las placas ateromatosas inestables<sup>12</sup>. Este hallazgo es particularmente interesante ya que este cromosoma codifica, entre otros, para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>13-15</sup>.

El daño mecánico, químico o por agentes infecciosos podría producir alteraciones genómicas, las que inducirían una ventaja proliferativa selectiva y serían el origen del proceso aterosclerótico. Sobre esta base algunos autores comparan este proceso con la proliferación clonal observada en las neoplasias benignas<sup>11</sup>. El aumento de la capacidad proliferativa también se ha relacionado con las alteraciones de la oncoproteína p53<sup>16, 17</sup>, cuya función es reguladora de la proliferación durante el ciclo celular.

El objetivo del presente trabajo es correlacionar los resultados de los estudios realizados de inmunotipificación celular, la técnica FISH para cromosomas 7 y 11, expresión de p53 y de proteína nuclear PCNA con el objeto de evaluar las características proliferativas y de clonalidad de las CML involucradas en las lesiones ateroscleróticas.

## Material y métodos

Los estudios se realizaron en especímenes de arterias obtenidas por cirugía (Tabla 1).

Según el examen histológico, efectuado con técnicas tanto de rutina como especiales, se seleccionaron placas inestables con las siguientes características: capa de cubierta fina con evidente infiltrado mononuclear y abundante núcleo lipídico<sup>2</sup>.

**Caracterización de poblaciones celulares.** En todos los casos se efectuó la inmunofenotipificación celular para identificar las poblaciones comprometidas. Se estudió la expresión de CD68 (macrófagos), actina muscular específica (CML), CD45RO (linfocitos T), y CD34 (vasos) mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales<sup>3</sup>.

**Determinación de oncoproteína p53.** Se realizó en 67 carótidas y en 13 aortas abdominales y torácicas (n = 80) me-

dante una técnica inmunoenzimática con anticuerpo 1801 y complejo ABC.

**Determinación de índices de proliferación.** Se estudiaron las siguientes arterias: 4 coronarias, 9 carótidas, 3 ilíacas y una aorta (n = 17).

a. Expresión de proteína nuclear PCNA: Mediante anticuerpo monoclonal PC 10 y complejo ABC. Se examinaron campos contiguos abarcando todo el corte. En cada campo se contaron los núcleos positivos y se observó su localización en las capas íntima y media.

b. Ploidía y Fase S: Por medio de un analizador de imágenes Zeiss Cires y tinción de Feulgen se evaluaron campos contiguos en la totalidad del corte, correlacionando la densidad óptica de los especímenes en placas ateromatosas con la de los controles.

**Estudio citogenético.** Se realizó en las siguientes arterias: 7 carótidas, 9 aortas abdominales y 5 coronarias (n = 21) mediante la técnica de FISH con sondas de ADN alfa satélite específicas contra la región centromérica de los cromosomas 3, 7 y 11 marcadas con biotina (ONCOR, Gaithersburg MD, USA). El cromosoma 3 se incluyó como control de disomía, ya que se sabe que no está involucrado en la progresión aterosclerótica. También se utilizó una sonda específica para la secuencia genómica del locus FGF-3 (ONCOR). Los estudios se realizaron en cortes de tejidos incluidos en parafina (3 a 5 µm de espesor). Las señales se detectaron con un kit comercial FITC conjugado con avidina (ONCOR). La evaluación se realizó con microscopio de epi-iluminación, luz ultravioleta y objetivos de inmersión. Sólo se contaron los núcleos en interfase y con morfología intacta. Como control se utilizaron arterias normales. Los cromosomas 7 y 11 también se estudiaron en arterias con placas en estadios iniciales. El mismo procedimiento se realizó sobre CML en cultivo.

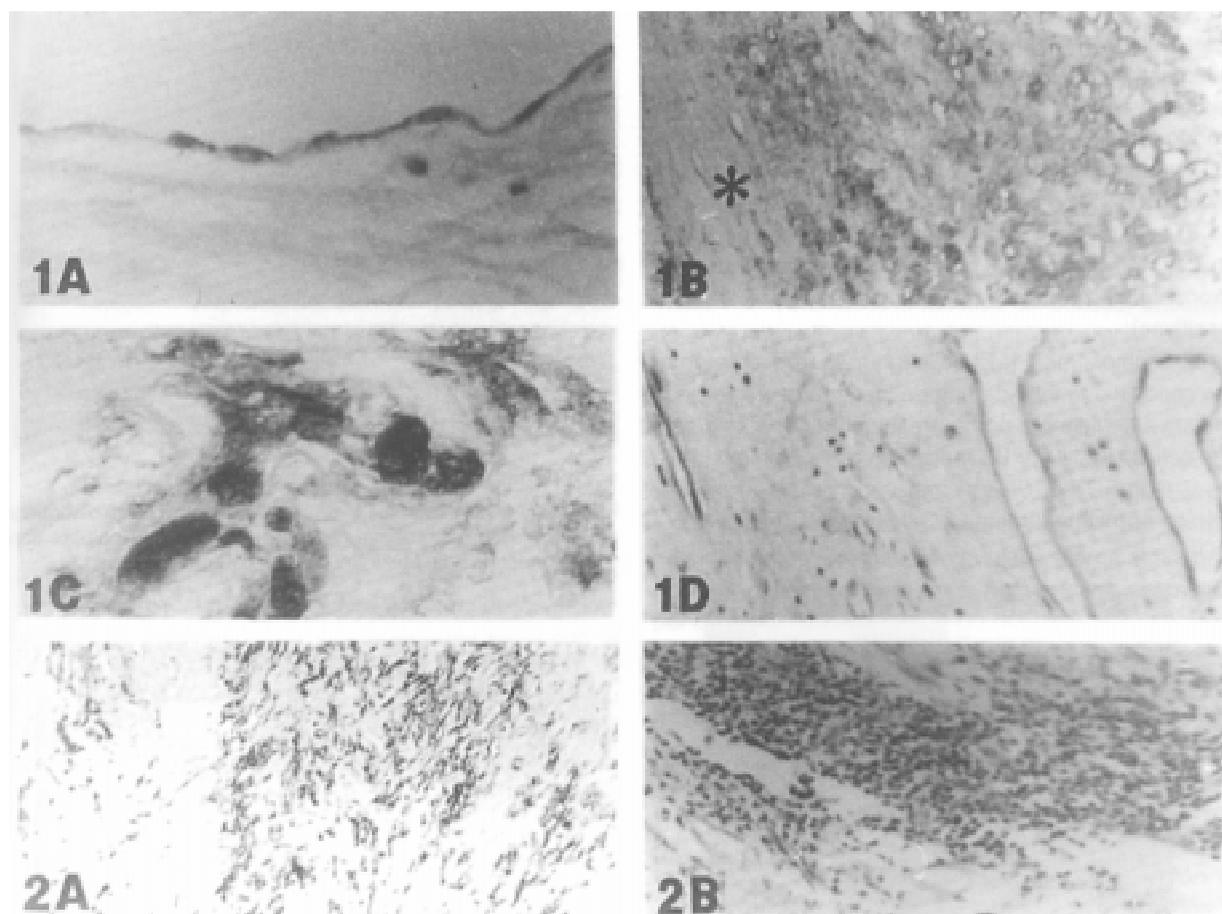
## Resultados

**Caracterización de poblaciones celulares.** En la Fig. 1A se observa el revestimiento endotelial normal continuo CD31 positivo. Las placas inestables presentaron alta celularidad tanto en las cubiertas de las placas como en los hombros de las mismas con un marcado predominio de macrófagos (Fig. 1B) e infiltrado linfocitario (Fig. 2B) con una profusa formación de neovasos (Fig. 1D). Tanto los macrófagos como los linfocitos estaban en estrecho contacto con los vasos de neoformación (Figuras 1C y 2B). Todas las lesiones mostraron gran engrosamiento a expensas de la proliferación de CML actina positivas (Fig. 2A). Su identificación y localización se hizo mediante la inmunomarcación, lo que permitió correlacionarlas con la expresión de PCNA y de p53.

**Expresión de oncoproteína p53.** Se observó en 59 casos (74%) expresión de la proteína p53 en el núcleo de numerosas células, con considerables variaciones en intensidad (débil, moderada e intensa). Estas células que expresaron p53 fueron también positivas para actina muscular específica (CML). Las células mostraron un patrón de proliferación focal y en ocasiones también difuso en el área de engrosamiento intimal. En la capa media se encontraron escasas células positivas. En 33 casos (41%) se observó una intensa marcación, la que

TABLA 1.- Métodos utilizados en el presente estudio

Estudio	n	Carótidas	Aorta	Ilíacas	Coronarias
p53	80	67	13	0	0
Proliferación	17	9	1	3	4
Ploidía	17	9	1	3	4
Citogenética	21	7	9	0	5
Inmunofenotipo	88	67	13	3	5



Figs. 1-2. 1) A. Revestimiento endotelial continuo intacto marcado con CD34 (control). Complejo ABC. Revelado con DAB. Contracoloración H&E X400. B. Capa fibrosa\* con prominente infiltrado de macrófagos CD68 positivos. Complejo ABC. Revelado con DAB. X250. C. Capa fibrosa. Macrófagos CD68 positivos (marrón, negro en la foto blanco y negro) en estrecho contacto con capilar CD34 positivo (rojo, gris en la foto blanco y negro, señalado por una flecha). Doble marcación (peroxidasa y fosfatasa alcalina). Revelado con DAB y Fast Red. X1000. D. Núcleo lipídico. Profusa neovascularización. Vasos de diferente calibre y forma CD34 positivos. Complejo ABC. Revelado con DAB. X250. 2) A. Hiperplasia de células musculares lisas en placa fibrosa. Expresión de actina muscular específica. Complejo ABC. Revelado con DAB. X250. B. Base de la placa. Infiltrado mononuclear rodeando vasos de neoformación de pared fina (marrón, negro en la foto blanco y negro) CD34+. Complejo ABC. Revelado con DAB.

TABLA 2.- Alteraciones citogenéticas en el cromosoma 7 detectadas por el método FISH expresadas en porcentaje

Nº casos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Trisomía	20	19	30	25	18	15	37	10	47	20	25	33	25	19	22	0	0
Tetrasomía	3	1	8	5	2	0	6	0	15	6	0	0	15	8	0	0	0
Polisomía	3	0	0	0	2	0	0	0	4	0	3	0	0	0	0	0	0

se interpretó como sobre-expresión y mutación del gen p53. En estos casos la marcación estuvo en el rango de 10 a 82%, esta sobre-expresión de p53 se presentó tanto en carótidas como en aortas.

*Determinación de índices de proliferación.* a) Expresión de PCNA: Sólo se encontraron células positivas para PCNA en las placas inestables de las arterias carótidas, estando

ausentes en las de arterias coronarias. El rango de positividad hallado fue del 0 al 33%, de localización intimal.

b) El estudio de ploidía mostró un contenido de ADN diploide (índice de ADN = 1). Se observó una frecuencia variable de células en fase S.

*Estudio citogenético.* En las CML de las placas inestables se encontraron las siguientes alteraciones:

a) Cromosoma 7: En el 71% de los casos, la microscopía de fluorescencia reveló, en las regiones de alta celularidad, porcentajes variables (Tabla 2) de células con tres y hasta cuatro señales de hibridación, indicando la existencia de trisomía y tetrasomía 7 (Fig. 3). En cuatro casos se observó polisomía 7 en algunos núcleos (más de cuatro marcas) (Fig. 3).

El resultado más frecuente fue la aparición de tres marcas (Fig. 3). Las células con anomalías en el cromosoma 7 eran CML (actina muscular específica positivas).

b) Cromosoma 11: El hallazgo más frecuente en estos casos fue la falta de uno de los cromosomas, hecho puesto en evidencia por la presencia de una sola señal por célula (Fig. 4A y B), indicando monosomía 11.

c) Gen FGF-3: Se observó una marcada amplificación en aproximadamente 2/3 de las CML (Fig. 5 A, B, C y D).

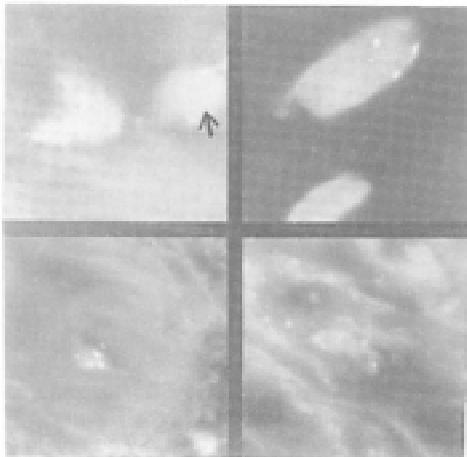


Fig. 3.- FISH con sonda para cromosoma 7. Carótida con placa de ateroma incluida en parafina. Los núcleos celulares muestran 3 señales de hibridación (trisomía 7). Una sola célula con disomía (flecha). X1000.

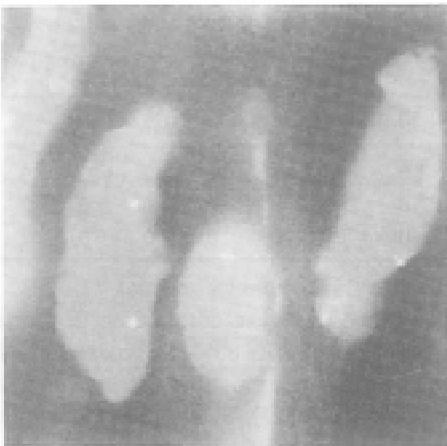


Fig. 6.- A. Cromosoma 3 en células musculares lisas de placa ateromatosa. Se observa disomía. B. Cromosoma 11 en células musculares lisas de lesión inicial. Se observa disomía.

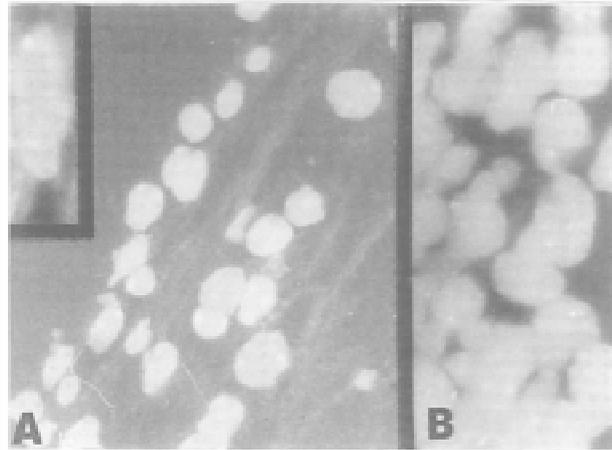


Fig. 4.- A. Cromosoma 11. Se observan células con disomía y otras con monosomía. El inset muestra dos células con monosomía. B. Múltiples células con monosomía 11.

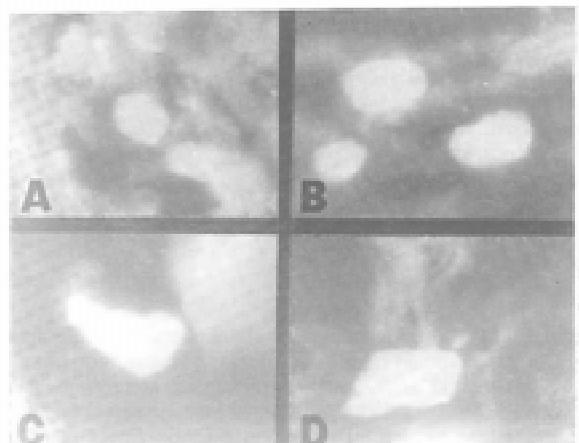
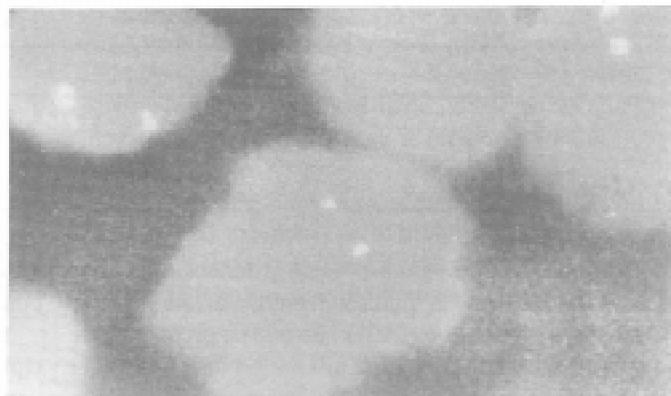


Fig. 5.- A. FGF-3. Se observan dos marcas correspondientes al gen en los 2 cromosomas que lo codifican. B, C y D. Amplificación del gen FGF-3.



En todos los casos se observó disomía del cromosoma 3 (Fig. 6A), el cual fue utilizado como control por no estar implicado en el proceso ateromatoso. También se observó disomía de los cromosomas 11 (Fig. 6B) y 7 en las paredes de las arterias normales y en las lesiones tempranas.

## Discusión

La aterosclerosis es un complejo proceso multifactorial. En la formación de una placa aterosclerótica hay dos hechos importantes: a) depósito de lípidos y b) migración y proliferación de CML y de macrófagos/células espumosas.

Las CML representan el 50% de los componentes celulares en placas crónicas y pueden llegar a ser el 90% en lesiones tempranas<sup>18</sup>. Las CML proliferativas producen proteoglicanos (matriz extracelular) y acumulan colesterol esterificado, siendo éste uno de los procesos que hacen progresar la enfermedad junto con la acumulación de restos necróticos<sup>19</sup>.

La importancia de estos hechos durante la aterogénesis se pone en evidencia por el efecto beneficioso de las estatinas, las cuales no sólo inhiben la acumulación de colesterol, sino que también interfieren en el proceso de formación de células espumosas y además poseen acción antiinflamatoria, contribuyendo de esta forma, a la estabilización de las placas<sup>19</sup>. Así, en recientes ensayos clínicos se demostró que la disminución de los niveles lipídicos reduce la morbimortalidad coronaria<sup>20</sup>.

Por medio de estudios morfológicos y bioquímicos se determinó que las CML intimaes, asociadas con la enfermedad vascular, son fenotípicamente diferentes a las CML encontradas en la media. Las primeras son células inmaduras y tienen menor cantidad de miofilamentos, a su vez expresan una gran variedad de proteínas que contribuirían al desarrollo y/o estabilidad de la lesión<sup>21</sup>. Esto aumentó el interés por comprender los mecanismos que modulan la proliferación de las CML. Una hipótesis explica el origen de las CML intimaes como proveniente de una expansión clonal a partir de una subpoblación de células inmaduras mediales y/o adventiciales<sup>22</sup> aceptando en forma implícita la existencia de al menos 2 fenotipos estables de CML, los cuales podrían reflejar un distinto origen embriológico (mesenquimático y cresta neural). Por lo tanto, debido a que las CML provienen embriológicamente de los distintos órganos parenquimatosos, existe una diversidad de estas células en las diferentes arterias, haciendo que respondan de modo diferente a los distintos estímulos locales. Esto explicaría el por qué los distintos lechos vasculares se comportan de manera tan distinta con respecto a la aterosclerosis<sup>1</sup>.

Murry y col.<sup>22</sup> han demostrado mediante la técnica de PCR que la monoclonalidad en la placa ateromatosa interesa exclusivamente a las CML y que el aumento de su capacidad proliferativa suele asociarse con una tendencia a la inestabilidad cromosómica.

Otra explicación, que no necesariamente se opone a la anterior, es que las CML de la íntima derivan de CML maduras de la media y que en su traslado las CML con fenotipo contráctil serían moduladas por diversos estímulos y desarrollarían el fenotipo sintetizador encontrado en la íntima<sup>23</sup>. La expresión génica caracterizará los cambios fenotípicos y determinará los mecanismos que los regulen. Estudiados dicha expresión y los factores intrínsecos y extrínsecos que regulan su expresión se tendrá la mejor oportunidad para comprender y actuar terapéuticamente sobre las placas ateroscleróticas<sup>24</sup>.

Como ya se ha dicho, una de las características más importantes del progreso de la placa ateromatosa es la marcada proliferación de las CML, la cual es estimulada por diversos factores, como por ejemplo el PDGF. Este interviene en la migración de las CML vasculares<sup>25, 26</sup> mientras que el FGF-3 y otras citoquinas participan estimulando su proliferación<sup>26, 27</sup>. En este trabajo presentamos los resultados de investigaciones realizadas a distintos niveles del ciclo celular aplicadas en particular a las células musculares lisas. Estas células se identificaron, de acuerdo con estudios previos<sup>2, 3</sup>, mediante la determinación inmunohistoquímica de la expresión de actina muscular específica. El resto de los estudios se efectuó sobre la población de CML así delimitada. Los estudios de ADN demostraron que la citada población es diploide. La determinación de PCNA confirmó que en dicha población hay un alto índice de células en proceso de proliferación.

PCNA es una proteína nuclear relacionada directamente con la síntesis de ADN, su expresión, puesta en evidencia por la marcación, es indicador de una proliferación activa.

La proteína p53, codificada por el oncogen del mismo nombre ubicado en el brazo corto del cromosoma 17, participa en la regulación del ciclo celular actuando como inhibidor de la síntesis de ADN. En su estado salvaje tiene vida corta por lo que son muy escasas las células en las que se puede demostrar esta proteína por medio de técnicas inmunohistoquímicas. La inducción de alteraciones genéticas por distintos agentes conduce a la acumulación de p53 y a su mutación<sup>16, 17</sup>. Así la acumulación de p53 puede demostrarse con técnicas inmunoenzimáticas como evidencia de alteración del mecanismo de reparación del ADN génico.

En este trabajo encontramos un elevado porcentaje de CML positivas para p53 (74% positivas, 41% con positivo intenso). Este hallazgo permite suponer una mutación del gen p53 que conduce a que un clon celu-

lar portador de la misma adquiere ventaja proliferativa como se observa en las neoplasias benignas.

En este estudio encontramos un 71% de CML con anomalías del cromosoma 7, a predominio de trisomía, además de tetrasomía y polisomía. Esta alteración también nos lleva a considerar que se trata de una expansión de carácter clonal.

Debe destacarse que en el cromosoma 7 se encuentran codificados el EGF y el PDGF por lo que puede considerarse que sus alteraciones provocarían una producción en exceso de estos factores que estimularían la proliferación celular.

Coincidentemente, Vanni y col.<sup>10</sup> en un caso y Casalone y col.<sup>11</sup> en 18 casos, ya observaron trisomía del cromosoma 7 en las CML.

Además se constataron alteraciones a nivel del cromosoma 11 y amplificación del gen FGF-3. Kato<sup>28</sup> demostró que los genes que codifican para la apolipoproteína A-1, apo C-III y A-IV están localizados en el brazo largo del cromosoma 11. Las alteraciones de este cromosoma se asociaron con la aterosclerosis y con variabilidad en el perfil lipídico<sup>29</sup>.

El FGF es un potente mitógeno que estimula la angiogénesis, el desarrollo cerebral, la formación de cartílago y la reparación de tejidos blandos<sup>30</sup>. En los últimos años se han localizado numerosos factores de crecimiento en las lesiones ateroscleróticas (PDGF, FGF, TGFbeta, IGFs, PAF), lo que sugirió que los mismos juegan algún papel en la progresión de las lesiones<sup>31</sup>. El FGF-3 se codifica en el cromosoma 11, por lo que su expresión podría estar parcialmente representada en las placas inestables con monosomía del cromosoma 11. Sin embargo, tanto en los casos de ploidía normal como en los de monosomía se demostró la amplificación del gen FGF-3.

Estos hallazgos son un aporte al conocimiento de la evolución de la placa ateromatosa y avalan el concepto de que el componente muscular liso se comporta como una proliferación monoclonal, si bien no está claro si las citadas anomalías contribuyen a la proliferación celular, o si son la consecuencia de otros factores o estímulos.

## Conclusiones

En el desarrollo de la placa ateromatosa las CML cumplen un papel fundamental. Este componente tiene especial importancia en la producción de la placa inestable. Distintos factores: hemodinámicos (ver diferencias de hallazgos en coronarias), químicos, humorales (angiotensina, etc.) o agentes infecciosos (*Chlamydia*, *Helicobacter*, etc) producirían alteraciones genómicas clonales en las CML generando una proliferación selectiva. La importancia clínica de este proceso radica en el pasaje de placa estable a inestable.

La posibilidad de dirigir determinadas moléculas a sitios específicos, de alto riesgo, parece ser la aplicación futura de estos conocimientos a fin de tratar tanto la aterosclerosis primaria como la re-estenosis post-angioplastia<sup>1</sup>.

Se comprobó que las lesiones oclusivas ateroscleróticas pueden revertirse clínicamente luego de un tratamiento agresivo con drogas hipolipemiantes<sup>32, 33</sup>. Por lo tanto el reconocimiento de la importancia de la inflamación, de las CML, de los macrófagos, de la formación de tejido conectivo y de la acumulación lipídica junto con la modulación de los factores de crecimiento (y otras sustancias) que acompañan estos procesos brinda numerosos puntos de acción (blancos terapéuticos) para interferir selectivamente o inhibir el proceso aterosclerótico.

**Agradecimientos:** Este trabajo se realizó con el apoyo parcial del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y del Convenio de Cooperación entre las universidades de Buenos Aires y de Milán.

## Bibliografía

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
- Milei J, Parodi JC, Fernández Alonso G, et al. Carotid atherosclerosis. Immunocytochemical analysis of the vascular and cellular composition in endarterectomies. *Cardiología* 1996; 41: 535-42.
- Milei J, Parodi JC, Fernández Alonso G, Barone A, Grana D, Matturri L. Carotid rupture and intraplaque hemorrhage: Immunophenotype and role of cells involved. *Am Heart J* 1998; 136: 1096-1115.
- Segrest JP, Anantharamaiah GM. Pathogenesis of atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 1994; 9: 404-10.
- Watanabe T, Hirata M. Role of macrophages in atherosclerosis. *Lab Invest* 1985; 53: 80-90.
- Jonasson L, Holm J. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 1986; 6: 131-8.
- Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 1973; 180: 1332-9.
- Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994; 330: 1431-8.
- Kuvin JT, Kimmelstiel CD. Infectious causes of atherosclerosis. *Am Heart J* 1999; 137: 215-26.
- Vanni R, Cossu L, Licheri S. Atherosclerotic plaque as a benign tumor? *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 47: 273-4.
- Casalone R, Granata P, Minelli E, et al. Cytogenetic analysis reveals clonal proliferation of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques. *Hum Genet* 1991; 87: 139-43.
- Matturri L, Cazzullo A, Turconi P, Lavezzi AM. Cytogenetic aspects of cell proliferation in atherosclerotic plaques. *Cardiologia* 1997; 42: 833-6.
- Randone B, Sterpetri AV, Stupa F, et al. Growth Factors and myointimal hyperplasia in experimental aortic allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13: 66-71.
- Ross R. Atherosclerosis: a defense mechanism gone. *Am J Pathol* 1993; 143: 987-1002.
- Barret TB, Benditt EP. Platelet derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 85:

- 2810-4.
16. Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occurs in diverse tumor types. *Nature* 1991; 342: 705-8.
  17. Porter PL, Gown AM, Kramps SG, Coltrera M. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am J Pathol* 1992; 140: 145-53.
  18. Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis III: immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am J Pathol* 1992; 140: 907-14.
  19. Llorente Cortés V, Martínez González J, Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 738-46.
  20. Aikarawa M, Rabkin E, Voglic SJ, et al. Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res* 1998; 83: 1015-26.
  21. Schwartz SM, DeBlois D, O'Brien ERM. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Cir Res* 1995; 77: 445-65.
  22. Murry CE, Gipaya CT, Bartosek T, Benditt EP, Schwartz SM. Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1993; 151: 697-705.
  23. Neuville P, Geinoz A, Benzonana G, et al. Cellular retinol-binding protein-1 is expressed by distinct subsets of rat arterial smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 1997; 150: 509-21.
  24. Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth muscle heterogeneity. Patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 333-8.
  25. Yu SM, Hung LM, Linch CC. CGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation* 1997; 95: 1269-77.
  26. Newby AC, George SJ. Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11: 574-82.
  27. Hajiton A, Calberg-Bacq CM. Fibroblast growth factor-3 is tumorigenic for mouse mammary cells orthotopically implanted in nude mice. *Int J Cancer* 1995; 63: 702-9.
  28. Kato H. Apolipoprotein A I-C III-A IV deficiency. *Nippon-Rinsho* 1994; 52: 3253-6.
  29. Carrejo MH, Sharret R, Patsch W, Boerwinkle E. No association of apolipoprotein A-IV codon 347 and 360 variation with atherosclerosis and lipid transport in a sample of mixed hyperlipidemies. *Genet Epidemiol* 1995; 12: 371-80.
  30. Ibikiyama C. Angiogenesis. Angiogenic therapy using fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors for ischemic vascular lesions. *Jpn Heart J* 1996; 37: 285-300.
  31. Raines WE, Ross R. Multiple growth factors are associated with lesion of atherosclerosis: specificity or redundancy? *Bioessays* 1996; 18: 271-82.
  32. Shepherd J, Cobbe SM, Ford Y, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1301-7.
  33. 4S Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-9.

-----

4. Siendo la lengua el medio de que se valen los hombres para comunicarse unos a otros cuanto saben, piensan y sienten, no puede menos de ser grande la utilidad de la Gramática, ya que para hablar, de manera que se comprenda bien lo que decimos (sea de viva voz o por escrito), ya para fijar con exactitud el sentido de lo que otros han dicho; lo cual abraza nada menos que la acertada enunciación y la genuina interpretación de las leyes, de los contratos, de los testamentos, de los libros, de la correspondencia escrita; objetivos en que se interesa cuanto hay de lo más precioso y más importante en la vida social.

Andrés Bello (1781-1865) y Rufino J. Cuervo (1844-1911)

*Gramática de la lengua castellana*. Edición corregida y aumentada con un prólogo y notas de Niceto Alcalá-Zamora y Torres. 9na. Edición. Buenos Aires: Sopena, 1973, p 27