

11262²ej

**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL COMPARATIVO DE LOS CONTACTOS
MIOENDOTELIALES EN LAS ARTERIAS CORONARIAS, MAMARIA INTERNA Y
VENA SAFENA DE RATAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA

EL ALUMNO VICTOR ARANA CONEJO

TUTOR: JORGE ANTONIO SOSA MELGAREJO MD, PhD

MEXICO, D.F.

1997

1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

La comunicación intercelular es un proceso esencial tanto para el desarrollo embriológico como para el mantenimiento de la fisiología normal de los tejidos. Los contactos mioendoteliales (MEC's) son las áreas de contacto más íntimo entre una célula de la túnica íntima y una célula de la túnica media de la pared vascular. Se puede asumir que los MEC's son sensores locales de tensión y que están involucrados en la coordinación de las múltiples actividades de los diversos componentes de la pared vascular de manera que funcionen como una unidad.

En este trabajo se estudiaron las arterias coronarias y mamaria interna y la vena safena de ratas Sprague-Dawley mediante microscopía electrónica de transmisión para investigar la relación estrecha entre la célula endotelial y la célula muscular lisa en estos vasos y describimos por primera vez la presencia de contactos mioendoteliales en ellos. Se encontraron tres tipos de MECs: a) los que se caracterizan por proyecciones citoplásmicas procedentes de la célula endotelial, b) aquellos cuya proyección citoplásmica se origina en la célula muscular lisa y c) otros en que las proyecciones citoplásmicas proceden tanto de la célula endotelial como de la célula muscular lisa. Se describe por primera vez la presencia de fascículos musculares en la vena safena. Se midió el espacio intercelular y éste fue similar en los tres vasos. Además se estudió la densidad de MEC's y se encontró mayor densidad en la vena safena que en los vasos arteriales.

RESUMEN

La comunicación intercelular es un proceso esencial tanto para el desarrollo embriológico como para el mantenimiento de la fisiología normal de los tejidos. Los contactos mioendoteliales (MEC's) son las áreas de contacto más íntimo entre una célula de la túnica íntima y una célula de la túnica media de la pared vascular. Se puede asumir que los MEC's son sensores locales de tensión y que están involucrados en la coordinación de las múltiples actividades de los diversos componentes de la pared vascular de manera que funcionen como una unidad.

En este trabajo se estudiaron las arterias coronarias y mamaria interna y la vena safena de ratas Sprague-Dawley mediante microscopía electrónica de transmisión para investigar la relación estrecha entre la célula endotelial y la célula muscular lisa en estos vasos y describimos por primera vez la presencia de contactos mioendoteliales en ellos. Se encontraron tres tipos de MECs: a) los que se caracterizan por proyecciones citoplásmicas procedentes de la célula endotelial, b) aquellos cuya proyección citoplásmica se origina en la célula muscular lisa y c) otros en que las proyecciones citoplásmicas proceden tanto de la célula endotelial como de la célula muscular lisa. Se describe por primera vez la presencia de fascículos musculares en la vena safena. Se midió el espacio intercelular y éste fue similar en los tres vasos. Además se estudió la densidad de MEC's y se encontró mayor densidad en la vena safena que en los vasos arteriales.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias al Fundamento de todo lo existente que me ha dado la oportunidad de indagar un poco en un fragmento de su obra.

Expreso mi agradecimiento a mi tutor Dr. Jorge Antonio Sosa Melgarejo, PhD. quien con gran generosidad y disposición ha compartido conmigo su amplia experiencia y conocimiento científicos y bajo cuya dirección y guía ha sido apasionante trabajar.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de una beca otorgada por el IMSS, así como un donativo otorgado por el CONACYT.

La investigación se llevó a cabo en los siguientes Servicios y Unidades de Investigación del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del IMSS: Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Cardiología, Bioterio, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología y Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades. Unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud.

Agradezco a las Sritas. Patricia Rosa Aley Medina, Patricia Piña Sánchez, Rita Socorro Mota Domínguez, Química Elizabeth Mravko Maldonado, Bióloga Elizabeth

García Toris, Biólogo Jorge Ramón Toledo García y Sr. Manuel Palacios Arenas por su asistencia técnica, así como al Sr. Eduardo Ramón López Rodríguez por su asistencia en fotografía.

Deseo agradecer a los Doctores José Ramón Paniagua Sierra, Dante Amato Martínez, Juan Raúl Flores Miranda y Joel Benítez Sánchez por su apoyo y orientación durante la elaboración de este trabajo.

Finalmente, agradezco a mi madre y demás familiares cuya existencia es para mí estímulo constante de superación así como a la memoria de mi padre.

CONTENIDO

	Página
Título	1
Resumen	2
Agradecimientos	3
Contenido	5
Lista de figuras	9
Lista de tablas	11
Abreviaturas usadas en esta tesis	12
CAPITULO 1: Introducción	13
1.1 Propósitos de la tesis	14
1.2 Organogénesis de los vasos	16
1.3 Organización estructural de la pared vascular	17
1.4 Nutrición de la pared vascular	19
1.5 Microarquitectura de la túnica media	19
1.6 La célula endotelial	20
1.7 La célula muscular lisa	22
1.7.1 Proteínas del citoesqueleto	23
1.7.2 Cuerpos densos y bandas densas	24
1.7.3 Matriz extracelular de la pared vascular	25
1.7.4 Actividades de síntesis	26

1.7.5 Fenotipo contráctil y sintético	28
1.7.6 La membrana plasmática	29
1.7.7 Contactos intercelulares entre las células musculares lisas	30
1.8 Interacciones entre las células endoteliales y las células musculares lisas	31
1.8.1 Mecanismos humorales	32
1.8.2 Contactos mioendoteliales (MEC's)	34
1.8.3 Remodelación vascular	37
1.9 Arterias coronarias	39
CAPITULO 2: Planteamiento del problema	43
2.1 Problemas generales	44
2.2 Problemas específicos	44
CAPITULO 3: Objetivos	46
3.1 Objetivos generales	47
3.2 Objetivos específicos	47
CAPITULO 4: Hipótesis	49
4.1 Hipótesis generales	50
4.2 Hipótesis específicas	50
CAPITULO 5: Material y métodos	52
5.1 Animales	53
5.2 Técnica anestésica	53
5.3 Perfusión intravital de los vasos	53
5.4 Microscopía electrónica de transmisión convencional	54

5.5	Identificación de los contactos mioendoteliales	55
5.6	Identificación de las variables	55
5.7	Definición operativa de las variables	56
5.8	Sistema de análisis de imagen	57
5.9	Tamaño de la muestra	57
5.10	Análisis estadístico	58
CAPITULO 6: Resultados		62
6.1	La arteria coronaria	63
6.1.1	Microscopía de luz	63
6.1.2	Microscopía electrónica	64
6.1.2.1	Contactos mioendoteliales	65
	A Aspectos morfológicos	65
	B Espacio intercelular	67
	C Densidad	68
6.2	La arteria mamaria interna	74
6.2.1	Microscopía de luz	74
6.2.2	Microscopía electrónica	74
6.2.2.1	Contactos mioendoteliales	75
	A Aspectos morfológicos	75
	B Espacio intercelular	76
	C Densidad	77
6.3	La vena safena	84

6.3.1	Microscopía de luz	84
6.3.2	Microscopía electrónica	84
6.3.2.1	Contactos mioendoteliales	85
	A Aspectos morfológicos	85
	B Espacio intercelular	86
	C Densidad	87
	CAPITULO 7: Discusión	96
7.1	Preparación de los especímenes	98
7.2	Contactos mioendoteliales	99
7.3	Contactos mioendoteliales y regulación del tono vasomotor	103
7.4	Contactos mioendoteliales y mecanotransducción	108
7.5	Contactos mioendoteliales y remodelación vascular	110
7.6	Contactos mioendoteliales y cirugía de revascularización coronaria (bypass)	116
	CAPITULO 8: Conclusiones	123
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	126

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1 Citoplasma de la célula endotelial con cuerpos de Weibel-Palade	42
1.2 Célula muscular lisa de la túnica media vascular con cuerpos densos y membrana basal	42
5.1 Quirófano del bioterio con rata Sprague-Dawley preparada para el procedimiento de perfusión	59
5.2 Animal con los órganos de la cavidad torácica expuestos	59
5.3 Vena safena disecada de la rata Sprague-Dawley	60
5.4 Rata Sprague-Dawley con arteria mamaria interna <i>in situ</i>	60
5.5 Disección de los vasos sanguíneos del corazón de la rata	61
6.1 Histología de la arteria coronaria	69
6.2 Histología de la arteria coronaria con tinción de Tricrómico de Masson	69
6.3 Ultraestructura de la pared de la arteria coronaria	70
6.4 La célula endotelial y la célula muscular lisa de la arteria coronaria	70
6.5 Pared de la arteria coronaria de rata	71
6.6 Contacto mioendotelial (MEC) de la arteria coronaria con proyección citoplásmica con origen en la célula endotelial y en la célula muscular lisa	71
6.7 MEC de la arteria coronaria con proyección citoplásmica originada en la célula muscular lisa	72
6.8 MEC de la arteria coronaria con origen de la proyección citoplásmica en la célula endotelial	72

6.9 MEC de la arteria coronaria con origen de la proyección citoplásmica en la célula endotelial	73
6.10 Histología de la arteria mamaria interna	78
6.11 Ultraestructura de la pared de la arteria mamaria interna	79
6.12 Etapas de la formación de un MEC en la arteria mamaria interna	80
6.13 Histología de la vena safena	90
6.14 Ultraestructura de la pared de la vena safena	90
6.15 Citoplasma de la célula endotelial de la vena safena	91
6.16 Fascículo muscular en la pared de la vena safena	91
6.17 Diagrama de los MEC's en la vena safena	92
6.18 MEC de la vena safena con origen de la proyección citoplásmica en la célula endotelial	93
6.19 MEC de la vena safena con origen de la proyección citoplásmica en la célula muscular lisa	93
6.20 MEC de la vena safena con origen de la proyección citoplásmica en la célula endotelial y en la célula muscular lisa	94
6.21 y 6.22 Variaciones en la forma de presentación de MEC's en la vena safena	94 y 95
7.1 Diagrama del control de las actividades de la túnica media vascular por la inervación de la pared vascular y por el MEC	121
7.2 Diagrama de la interacción endotelio-músculo liso	122

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
6.1 Espacio intercelular de los MEC's en la arteria coronaria	67
6.2 Densidad de los MEC's en la arteria coronaria	68
6.3 Espacio intercelular de los MEC's en la arteria mamaria interna	76
6.4 Densidad de los MEC's en la arteria mamaria interna	77
6.5 Espacio intercelular de los MEC's en la vena safena	86
6.6 Densidad de los MEC's en la vena safena	87
6.7 Comparación del espacio intercelular de los MEC's en las arterias coronaria y mamaria interna y en la vena safena	88
6.8 Comparación de la densidad de los MEC's en las arterias coronaria y mamaria interna y en la vena safena	89

ABREVIATURAS USADAS EN ESTA TESIS

MEC	Contacto mioendotelial
LEI	Lámina elástica interna
PGI ₂	Prostaciclina
ET	Endotelina
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
IGF-I	Factor de crecimiento insulinoide I
IL-1	Interleucina 1
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
CSF	Factor estimulante de colonias
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica de monocitos
EGF	Factor de crecimiento endotelial
EDGF	Factor de crecimiento derivado del endotelio
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
NO	Oxido nítrico
EDRF	Factores relajantes derivados del endotelio
nm	Nanómetros
mm	Milímetros
μ	Micras
Da	Dalton

CAPITULO 1
INTRODUCCION

1.1 PROPOSITOS DE LA TESIS

Las formas de vida complejas consisten de masas de células conectadas entre sí, que se comunican unas con otras y establecen contacto e interactúan entre ellas y con su ambiente externo a través de su superficie (Sosa-Melgarejo, 1991). Las células se reconocen unas a otras, reciben estímulos, responden a ellos, se agrupan en conjuntos y forman tejidos que se combinan para formar órganos (Avers, 1991). Durante el desarrollo embrionario y antes de que el sistema circulatorio se establezca, el acoplamiento metabólico entre las células parece ser uniforme y vital. Después de que el sistema circulatorio llega a ser funcional, aparecen gradualmente restricciones en la comunicación intercelular con pérdida progresiva de la comunicación entre las capas germinales y entre grupos de células dentro de cada capa durante la organogénesis. La integridad estructural depende crecientemente de contactos especializados; durante el desarrollo temprano de la pared vascular los contactos intercelulares juegan un papel significativo en la comunicación entre las células y en mantenerlas unidas, pero conforme la presión arterial se incrementa con el establecimiento de la circulación, un sistema fibroso bien desarrollado se agrega a la arquitectura vascular (Sosa-Melgarejo, 1991).

La pared vascular se desarrolla bajo dos influencias, una determinada genéticamente sobre el patrón de la circulación y otra que depende de los efectos de la carga

hemodinámica y determina la naturaleza y disposiciones de los componentes murales (Berry, 1989).

Las arterias coronarias y mamaria interna son arterias musculares, de mediano calibre o de distribución. Su pared funciona como un órgano integrado compuesto por células endoteliales, músculo liso, fibroblastos y matriz extracelular acoplados entre sí por un complejo mecanismo de interacciones autócrino-parácrinas. Este funcionamiento depende de una interacción dinámica entre factores de crecimiento localmente producidos, sustancias vasoactivas y procesos hemodinámicos (Gibbons y Dzau, 1994). En este proceso son de importancia primordial los contactos entre las células endoteliales y las células musculares lisas de la túnica media de la pared vascular.

Los propósitos de los estudios desarrollados en esta tesis fueron:

Determinar la naturaleza de los contactos mioendoteliales en las arterias coronarias, mamaria interna y vena safena de ratas normales.

Determinar la densidad de los contactos mioendoteliales en las arterias coronarias, mamaria interna y vena safena de ratas normales.

Efectuar mediciones del espacio intercelular existente a nivel de los contactos mioendoteliales en las arterias coronarias, mamaria interna y vena safena de ratas, en caso de demostrar su presencia.

Comparar los resultados obtenidos en los tres vasos investigados.

1.2 ORGANOGENESIS DE LOS VASOS SANGUINEOS

Es evidente que el crecimiento del embrión requiere desde sus etapas primitivas el establecimiento de un sistema circulatorio para suministrar nutrientes y remover residuos del desarrollo de los tejidos (Berry, 1989). El sistema vascular del embrión humano aparece hacia la mitad de la tercera semana cuando se observan los primeros signos de formación de vasos en la forma de los llamados islotes en el saco vitelino. Estos acúmulos de células mesodérmicas forman tanto endotelio como células sanguíneas. Este proceso de angiogénesis se encuentra en todo el mesénquima y rápidamente se forman dos tubos endoteliales formando un sistema circulatorio primitivo (Langman, 1981). El corazón primitivo se forma similarmente de células mesenquimales en el área cardiogénica. Tubos longitudinales endoteliales se desarrollan después al final de la tercera semana y se empiezan a fusionar en el tubo cardíaco primitivo. Inicialmente, las aortas dorsales pareadas recorren la longitud completa del embrión, pero se fusionan pronto. Este proceso se inicia en la región

torácica, se extiende caudalmente y termina en el origen de las arterias ilíacas primitivas (Wilson, 1959).

La circulación sanguínea se inicia al final de la tercera semana y así el sistema cardiovascular es el primero en alcanzar un estado funcional (Sosa-Melgarejo, 1991).

Es evidente que en el hombre como en otros mamíferos, la colágena es el elemento estructural temprano que se establece en los vasos para proporcionar un almacén para el desarrollo vascular y la elastina aparece más tarde en respuesta al stress (Berry y col. 1972).

1.3 ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LA PARED VASCULAR

El sistema arterial formado por la división de la aorta en un gran número de arterias de diámetro decreciente, tiene una estructura básica de la pared vascular que consiste en las tunicas íntima, media y adventicia. Las arterias se dividen en tres tipos según la composición de su túnica media: arterias elásticas, arterias musculares y arteriolas (Berry, 1989).

La arteria elástica de mayor tamaño es la aorta. Desde un punto de vista funcional, las arterias elásticas sirven como tubos de conducción, pero también facilitan el movimiento de la sangre a lo largo del tubo. La túnica íntima es relativamente gruesa,

consiste de endotelio de revestimiento con su lámina basal, una capa subendotelial de tejido conectivo y una capa de material elástico: la membrana elástica interna (Ross y Romrell, 1992). Las células endoteliales son aplanadas, alargadas, orientadas con su eje longitudinal paralelo a la dirección de la arteria, unidas por uniones impermeables, uniones nexus y uniones adherentes. El endotelio y sus uniones impermeables son una barrera para el paso de sustancias. No obstante, el transporte transendotelial ocurre (Sosa-Melgarejo, 1991). La túnica media es la más gruesa de las tres capas. La túnica adventicia es una capa de tejido conectivo relativamente delgada en las arterias elásticas. En esta capa el principal componente extracelular es el tejido colágeno y las células son fibroblastos y macrófagos. Además contiene vasa vasorum y nervios (Ross y Romrell, 1992).

Las arterias de mediano calibre, musculares o de distribución están caracterizadas por una gruesa capa de tejido muscular con cantidades variables de material elástico y tejido colágeno. Una de sus características es la presencia de una membrana elástica interna prominente y una membrana elástica externa en el límite entre la túnica media y la adventicia.

Las arteriolas presentan una túnica íntima sin capa subendotelial y con una delgada membrana elástica interna. La túnica media tiene menor grosor y la adventicia es poco desarrollada.

1.4 NUTRICION DE LA PARED VASCULAR

Es probable que la íntima de los vasos grandes (arterias y venas) sea nutrida directamente desde la luz vascular (Berry, 1989). El ingreso desde la luz del vaso aparentemente es suficiente para nutrir los 0.5 mm más internos de la media (Sosa-Melgarejo, 1991). La media de todas las arterias con más de 29 unidades lamelares contiene vasa vasorum (Wolinsky y Glagov, 1967b). Aparentemente, los vasos sanguíneos de mamíferos pequeños tales como las ratas y conejos que contienen menos de 30 capas en su túnica media, reciben su nutrición principalmente por perfusión desde el lado de la íntima (Sosa-Melgarejo, 1991).

1.5 MICROARQUITECTURA DE LA TUNICA MEDIA

La unidad estructural lamelar propuesta por Wolinsky y Glagov (1967a) consiste de una lámina elástica y las células musculares lisas correspondientes y escleroproteínas. El número de estas unidades varía con el diámetro del vaso, aumentando progresivamente con el incremento en el tamaño y peso en los diferentes animales. Ellos consideraron que esta capa fibrocelular de la media, la unidad lamelar, es la unidad funcional y estructural de la arquitectura de la túnica media.

Clark y Glagov (1979) mostraron que la función coordinada de la media es atribuible a al menos tres formas de interacción de sus elementos estructurales el

primero de los cuales consiste de lámina basal y fibrillas colágenas formando acúmulos continuos sobre grupos celulares. El segundo consiste en sitios focales de adherencias fuertes entre los cuerpos densos periféricos de las células y las fibras elásticas adyacentes. Así mismo está la presencia de fibras elásticas en estrecha asociación con las fibras colágenas que aseguran elasticidad así como fuerza ténsil (Wolinsky y Glagov, 1967a). La estructura de la media está inmersa en una matriz ubicua, continua, de proteoglicanos que proporciona un tercer medio de transmisión y coordinación de stress. Sosa-Melgarejo y Berry (1988, 1989, 1992a, 1992b, 1995, 1996a), Berry y Sosa-Melgarejo (1989, 1993a, 1993b) y Sosa-Melgarejo y cols. (1988) han descrito y demostrado detalladamente la presencia y funcionamiento de los contactos intercelulares y célula-estroma en la túnica media y entre la túnica íntima y la túnica media como un cuarto sistema estructural cuya existencia es necesaria para la función coordinada de la pared vascular.

1.6 LA CELULA ENDOTELIAL

Las células endoteliales son aplanadas, con un núcleo que hace una protrusión luminal y con numerosas vesículas pinocíticas bajo la membrana celular. El citoplasma de las células endoteliales individuales contiene además de los organelos intracelulares habituales como retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias; los cuerpos de Weibel-Palade (figura 1.1). Estas estructuras alargadas están limitadas por membrana, su tamaño es de 0.1x2-3 micras y contienen componentes tubulares espaciados

regularmente y alineados en dirección paralela a su eje longitudinal. Almacenan y/o procesan componentes para el antígeno relacionado al factor VIII/proteína de Von Willebrand (Wagner y cols. 1982), que es sintetizada por los megacariocitos (Nachman y cols. 1977).

Las células endoteliales adyacentes están interconectadas por uniones impermeables, uniones nexus y uniones adherentes no desmosómicas (Hüttner y Gabiani, 1982; Cowin y cols. 1985). Las uniones impermeables forman sellos locales de permeabilidad entre las células y están íntimamente relacionadas a la función de barrera del endotelio vascular. Las uniones nexus son vías de baja resistencia para la comunicación intercelular. Las uniones adherentes, que muestran material electrodensó bajo la membrana plasmática, están involucradas en la cohesión intercelular (Sosa-Melgarejo, 1991).

Las células endoteliales juegan numerosos papeles fisiológicos incluyendo: (1) proveen de una superficie no trombogénica; (2) proporcionan una barrera de permeabilidad a través de la cual hay intercambio y transporte activo de sustancias hacia la pared arterial; (3) mantenimiento del tono vascular por liberación de moléculas pequeñas tales como prostaciclina y endotelina que modulan la vasodilatación y la vasoconstricción; (4) formación y secreción de moléculas reguladoras y citocinas; (5) mantenimiento de la colágena de la membrana basal y de los proteoglicanos; (6) provisión de una superficie no adherente para leucocitos, (7) capacidad para modificar

lipoproteínas de modo que puedan ser transportadas hacia el interior de la pared arterial, (8) regulación de la proliferación del músculo liso vascular mediante la secreción de factores de proliferación o inhibidores y (9) remodelación vascular y angiogénesis. El cambio en una o más de estas propiedades puede representar la manifestación más temprana de la disfunción endotelial (Ross, 1993, Yang y cols. 1996, Griendling y Alexander 1996).

1.7 LA CELULA MUSCULAR LISA

Las células musculares lisas en la pared arterial forman un componente multifuncional capaz de contracción activa. Son capaces de sintetizar elementos portadores de fuerza y de considerable actividad proliferativa después del daño.

Las células musculares lisas son largas, en forma de huso, tienen un solo núcleo y contienen tanto filamentos gruesos (miosina) como delgados (actina) alineados en la dirección del eje longitudinal de la célula (Somlyo, 1980). Sin embargo, estos filamentos no están dispuestos en el patrón estrictamente ordenado encontrado en el músculo cardíaco y esquelético y no parecen formar miofibrillas bien definidas.

La actina y la miosina del músculo liso producen contracción fundamentalmente en la misma forma que en el músculo estriado.

1.7.1 PROTEINAS DEL CITOESQUELETO

El citoesqueleto es un sistema organizado de proteínas fibrosas que están implicadas en el mantenimiento de la estructura y forma de la célula (Rawn, 1989).

Existen tres tipos de filamentos en las células musculares lisas vasculares: gruesos (miosina), delgados (actina) e intermedios. La organización filamentosa de la actina y la miosina es compatible con un mecanismo de deslizamiento de contracción como en el músculo esquelético y cardíaco (Somlyo, 1980).

Los filamentos de miosina tienen aproximadamente 15-19 nm de diámetro y su longitud es de 2.2 micras. La máxima fuerza desarrollada por el músculo liso es igual o mayor a la desarrollada por el músculo estriado a pesar de la concentración de miosina aproximadamente cinco veces más baja en el músculo liso (Devine y Somlyo, 1971).

Los filamentos de actina tienen 6 a 8 nm de diámetro y se encuentran en todas las células musculares así como en otros tipos de células.

Los filamentos intermedios son de 10 nm de diámetro. En las células musculares lisas diferenciadas de órganos viscerales predominan los filamentos intermedios de tipo de desmina (Lazarides, 1980; Anderton, 1981). En contraste a las células musculares

lisas no vasculares el principal filamento intermedio presente en las vasculares es la vimentina (Gabbiani y cols. 1981).

Estructuralmente los filamentos intermedios en las células musculares lisas están frecuentemente localizados en la proximidad de los cuerpos densos alrededor de los cuales pueden formar rosetas. Otros están reunidos en haces pequeños o están alineados debajo de bandas densas cerca de la superficie celular.

Aunque los filamentos intermedios no parecen penetrar en los cuerpos densos es probable una conexión mecánica entre ambas estructuras. Se ha sugerido que este tercer tipo de filamentos forma una red que da soporte a los miofilamentos.

1.7.2 CUERPOS DENSOS Y BANDAS DENSAS

Los cuerpos densos son estructuras electrodensas dispersas en el sarcoplasma de las células musculares lisas. Son alargados y paralelos a los miofilamentos. El material de los cuerpos densos parece ser similar al material que forma las bandas densas las cuales están adheridas a la membrana celular (figura 1.2). La distribución de los miofilamentos y la ocurrencia de las bandas densas probablemente son parte del mecanismo que permite el notable acortamiento que puede suplir una célula muscular lisa y probablemente también explican la notable amplitud de cambios en la forma de la célula (Gabella, 1984).

La transmisión de fuerza del aparato contráctil a la membrana celular en las células musculares lisas ocurre principalmente a través de la inserción de haces de filamentos de actina en las bandas densas (Gabella, 1984).

1.7.3 MATRIZ EXTRACELULAR DE LA PARED VASCULAR

La lámina basal está presente sobre la totalidad de la superficie de la célula muscular lisa (figura 1.2), excepto en sitios de estrecha aposición entre células musculares lisas. Microfibrillas de 11 nm de diámetro están insertas en la lámina basal y se extienden en las estructuras adyacentes. Otras microfibrillas de 11 nm se mezclan con aquellas distribuidas alrededor de las fibras elásticas.

Las microfibrillas extracelulares localizadas sobre bandas densas y coaxiales con haces de microfilamentos citoplásmicos, se extienden entre la fibrillas de colágena más cercanas y probablemente correspondan a fibronectina.

Se ha identificado a la laminina como uno de los principales componentes de enlace de la lámina basal (Kleinman y cols. 1981, Lethias y cols. 1996). Parece ser funcionalmente similar a la fibronectina (Yamada, 1983). Se ha pensado que la laminina une a las células a la lámina basal formando puentes a la colágena tipo IV.

Los principales componentes del estroma en la túnica muscular lisa son fibras colágenas y fibras elásticas dispuestas en lamelas. La mayor parte de la colágena corresponde a estructuras fibrilares. No obstante, parte de la colágena es no-fibrilar. La colágena tipo III es la predominante de la túnica media vascular normal. Las fibras elásticas habitualmente se ramifican extensamente y se unen entre ellas formando láminas continuas, acúmulos fenestrados o pequeñas placas elásticas. El material elástico está formado de bandas amorfas rodeadas por microfibrillas de 11 nm de diámetro (Muir y cols. 1976), que contienen un centro proteínico cubierto con fibronectina. Las microfibrillas frecuentemente están interpuestas entre las fibras elásticas y la lámina basal de las células musculares lisas.

1.7.4 ACTIVIDADES DE SINTESIS

Se ha demostrado que el único tipo celular presente en la túnica media de la pared vascular corresponde a las células musculares lisas. Ellas sintetizan las fibras colágenas y elásticas en la media de los vasos en desarrollo y maduros (Gerrity y cols. 1975) y producen proteoglicanos. Estas moléculas funcionan como importantes enlaces estructurales entre los componentes fibrosos y celulares (Chen y Wright, 1984).

La fibra elástica madura está constituida por dos estructuras morfológicamente distintas que representan a dos proteínas diferentes. El principal componente de la fibra elástica, la proteína elastina tiene una apariencia amorfa y se caracteriza por su

escasez de aminoácidos polares y por sus aminoácidos únicos de entrecruzamiento (desmosina e isodesmosina) derivados de enlaces cuaternarios de lisina. El segundo componente de la fibra elástica es una microfibrilla de aproximadamente 11 nm de diámetro. Esta microfibrilla es una glucoproteína rica en aminoácidos polares, contiene entre 30 y 80 residuos de cistina por 1 000 aminoácidos y tiene muchos enlaces cruzados disulfuro. Se ha demostrado que las células musculares lisas arteriales son capaces de formar ambos tipos de proteínas de las fibras elásticas (Narayanan y cols. 1976). Ellas secretan lisil oxidasa (Gonnerman y cols. 1981) una enzima que juega un papel clave en la formación de los enlaces cruzados que estabilizan las estructuras tanto de colágena como de elastina.

A nivel ultraestructural la síntesis de tejido conectivo se correlaciona con la presencia de retículo endoplásmico rugoso, complejo de Golgi y ribosomas libres en el citoplasma de las células musculares lisas (Sosa-Melgarejo, 1991).

Además de su capacidad para formar tejido conectivo de matriz, las células musculares lisas vasculares pueden sintetizar varios derivados de las prostaglandinas como PGI_2 (prostaciclina) y prostaglandina E (Moncada y cols. 1977). Las células musculares lisas contienen receptores para lipoproteínas de baja densidad (Chaid y cols. 1980) y para factores de crecimiento incluido el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Williams y cols. 1982), pueden acumular lípidos y tomar el aspecto de células espumosas.

Además, las células musculares lisas pueden producir: factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento insulinoide-I (IGF-I), interleucina 1 (IL-1), factor estimulante de colonias (CSF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y factor de crecimiento endotelial (EGF) entre otros (Ross, 1993).

Los lisosomas juegan un papel importante en el metabolismo catabólico dentro de las células y está demostrado que son importantes en los procesos celulares regulatorios. Se les ha identificado en las células musculares lisas vasculares tanto in situ como en cultivos (Robinson y cols. 1986).

1.7.6 FENOTIPO CONTRACTIL Y SINTETICO

La túnica media de las arterias está fundamentalmente compuesta por células musculares lisas contráctiles, es decir, células con filamentos contráctiles caracterizadas por la expresión de proteínas del citoesqueleto únicas de células musculares lisas vasculares diferenciadas (Somlyo, 1980; Gabbiani y cols. 1981).

Estas células musculares lisas, en cultivo sintetizan de cuatro a cinco veces la cantidad de moléculas de matriz extracelular de lo que lo hacen las células en estado contráctil. Morfológicamente, estas células pierden sus filamentos gruesos e incrementan la cantidad de organelos implicados en la síntesis tales como retículo

endoplásmico rugoso y ribosomas libres. Así, semejan células musculares lisas inmaduras y adquieren un fenotipo sintético (Thiberg y cols. 1985).

Todos estos datos sugieren la posibilidad de que el compromiso de las células musculares lisas para replicarse requiere un cambio del fenotipo contráctil a uno menos diferenciado sintético (Sosa-Melgarejo y Berry, 1996b).

1.7.7 LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La superficie de las células musculares lisas puede dividirse en tres dominios estructurales: i) la superficie de membrana "no especializada" que está ocupada parcialmente por bandas densas donde se insertan filamentos de actina y participan en la transmisión de fuerza en el músculo liso. ii) Las caveolas de superficie, que son invaginaciones de la membrana de superficie que comunican con el espacio extracelular. Se cuestiona si estas caveolas pueden separarse o si son capaces de actividad pinocítica, en contraste a la clatrina que reviste orificios o vesículas revestidas que contienen receptores de lipoproteínas de baja densidad y pueden ser internalizados (Goldstein y cols. 1979). Las caveolas de superficie representan una parte significativa (cerca de 25-50%) del área de membrana; aún se desconoce su significado en las células musculares lisas. iii) Las regiones que forman los contactos célula a célula.

1.7.8 CONTACTOS INTERCELULARES ENTRE CELULAS MUSCULARES LISAS

La proximidad entre las membranas plasmáticas de dos células adyacentes recibe el nombre de contacto intercelular. En ocasiones, existen además unas especializaciones estructurales localizadas en la membrana celular o el citoplasma adyacente a ella y a esta relación ultraestructural especializada entre dos células vecinas se le llama unión intercelular. Las uniones intercelulares proporcionan a las células la capacidad de unirse entre sí con seguridad y abrir o cerrar canales intercelulares para la comunicación y el transporte (Berry y Sosa-Melgarejo, 1993a, 1993b). Estas uniones se clasifican en tres categorías funcionales: i) uniones adherentes, que ligan mecánicamente a las células, como los desmosomas y las uniones intermedias; ii) uniones impermeables, que unen a las células entre sí y las sellan de manera que evitan el paso de moléculas a través del espacio existente entre las células adyacentes y iii) uniones de comunicación, que permiten que los iones y las moléculas pequeñas se muevan libremente de una célula a otra, por ejemplo, las uniones nexus o gap (Sosa-Melgarejo, 1991).

Una gran parte de la superficie de una célula muscular lisa está separada de las células vecinas por componentes de la matriz extracelular incluyendo colágena y fibras elásticas. Sin embargo, hay áreas donde tiene lugar un contacto más estrecho. En estudios de contactos celulares en músculo liso no vascular, se describen cuatro tipos: uniones nexus, uniones intermedias, aposiciones simples e interdigitaciones. En los

pocos estudios sobre células musculares lisas vasculares sólo se describen uno o dos tipos de contactos (Henderson, 1975; Grünwald y cols. 1982). Sosa-Melgarejo describe los cuatro tipos de contactos en aorta torácica de ratas (Sosa-Melgarejo, 1991).

1.8. INTERACCIONES ENTRE LAS CELULAS ENDOTELIALES Y LAS CELULAS MUSCULARES LISAS

La comunicación entre las células es un proceso esencial en el desarrollo embriológico y es importante para el mantenimiento de la fisiología normal de los tejidos. También es necesaria para cierto número de respuestas fisiopatológicas. En el tejido vascular, ocurren interacciones estructurales y metabólicas entre el endotelio y las células musculares lisas.

El contacto in-vivo entre las células endoteliales y las células musculares lisas ocurre por dos vías principales (Davies y cols. 1986), interacciones humorales y contactos músculo-endotelio. Las células endoteliales están separadas del músculo liso de la túnica media vascular por la lámina basal y otros componentes de la matriz extracelular. Sin embargo, hay sitios donde tiene lugar un contacto más íntimo entre los dos tipos de células, éstos son los contactos mioendoteliales (MEC's) (Sosa-Melgarejo y Berry, 1992a, 1992b, 1995, Berry y Sosa-Melgarejo 1993a, Sosa-Melgarejo y cols. 1988).

1.8.1 MECANISMOS HUMORALES

Dos de los mejores ejemplos de comunicación humoral entre las células endoteliales y las células musculares lisas vasculares son:

i) regulación de la proliferación de la célula muscular lisa por factores de crecimiento derivados del endotelio (EDGF) y factores inhibidores. Los EDGF son mitógenos y como una proporción significativa de ellos son similares a los factores de crecimiento derivados de plaquetas PDGF (Di Corletto y Bowen-Pope, 1983, Yang y cols. 1996), también se conocen como PDGF celulares (PDGF_c). Además del papel de un endotelio estimulado o alterado en la proliferación de la célula muscular lisa, el músculo liso vascular normal en reposo también puede sintetizar y liberar PDGF_c así como promover su propia proliferación en un patrón autócrino cuando sufre hiperplasia (Walker y cols. 1986). Esta situación se puede aplicar a la media en desarrollo normal y a la proliferación patológica de la íntima (Davies, 1986). Existe evidencia sustancial de que las células endoteliales producen inhibidores de la proliferación de músculo liso en estudios in vitro (Castelot y cols. 1986).

ii) Regulación de la vasoactividad por factores relajantes derivados del endotelio (EDRF), así como factores de contracción (Furchgott y Zawadski, 1980; Johnson, 1980; Palmer y cols. 1987; Yanagisawa y cols. 1988). En preparaciones aisladas de vasos sanguíneos, las células endoteliales son esenciales para la relajación de la célula

muscular lisa inducida por acetilcolina (Furchgott y Zawadski, 1980). Varios estudios sugieren que la vasodilatación inducida por ciertos compuestos (serotonina, histamina, bradicinina) depende de la estimulación de la liberación de un EDRF. Un EDRF se identificó como óxido nítrico (NO), el cual relaja el tejido vascular e inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria (Palmer y cols. 1987). El óxido nítrico es una molécula mensajera poco usual compuesta de un átomo de oxígeno y uno de nitrógeno; es una molécula con un electrón no apareado y puede difundir libremente a través de membranas celulares, es altamente reactiva con una vida media de 2-30 segundos que después de transmitir una señal se transforma espontáneamente en nitrito. Se produce por la acción de la sintasa de óxido nítrico que en una reacción poco usual convierte arginina y oxígeno en citrulina y óxido nítrico (Lowenstein y cols. 1994). Se ha sugerido que existen múltiples vías para la captación de L-arginina en las células vasculares y que el transporte de L-arginina y la formación de óxido nítrico se controlan diferencialmente en dichas células (Durante y cols. 1996). Un nuevo vasoconstrictor denominado endotelina se descubrió en células endoteliales porcinas como un péptido cíclico de 21 aminoácidos derivado de la molécula preproendotelina (Yanagisawa y cols. 1988; Ferro y Webb, 1996). Actualmente se sabe que las endotelinas son una familia de péptidos con efectos biológicos potentes (Lüscher, 1993; Wu-Wong y cols. 1994). Las endotelinas 1, 2 y 3 se forman a partir de moléculas precursoras (endotelina grande) vía la actividad de una enzima convertasa de endotelina. La endotelina-1 parece ser el principal producto de las células endoteliales. Tanto in vitro como in vivo, la endotelina-1 es un vasoconstrictor muy potente, pero bajo ciertas condiciones puede

producir vasodilatación (Dohi y cols. 1991). Además, la endotelina potencia los efectos de otras hormonas vasoconstrictoras (Yang y cols. 1990) y estimula la migración y proliferación de las células musculares lisas (Lüscher, 1993).

1.8.2 CONTACTOS MIOENDOTELIALES (MEC's)

Los contactos mioendoteliales (MEC's) se encuentran en las zonas de comunicación más estrecha entre una célula endotelial y una célula muscular lisa. Se presentan cuando las células endoteliales y las células musculares lisas emiten proyecciones celulares para formar zonas heterocelulares de contactos. Se han realizado estudios en la microcirculación (Rhodin, 1967; 1968) y algunos para vasos más grandes (Spagnoli y cols. 1982).

Se ha sugerido que los MECs pueden ser las vías de comunicación para las siguientes funciones: i) regulación de la proliferación celular del músculo liso debido a factores de crecimiento e inhibidores derivados del endotelio (Sosa-Melgarejo y Berry, 1992), ii) regulación de la vasoactividad por factores de contracción y relajación derivados del endotelio (Furchgott y Zawadski, 1980; Johnson, 1980; Palmer y cols. 1987; Yanagisawa y cols. 1988), y iii) regulación del metabolismo lipoproteico muscular (Davies y cols. 1985).

Los MEC's también han sido discutidos en el contexto de la respuesta miogénica en el mecanismo de Bayliss como el método de autorregulación de los lechos vasculares (Bayliss, 1902).

Se han realizado estudios sobre MEC's en la microcirculación de animales de experimentación (Taugner y cols. 1984; Sosa-Melgarejo y Berry, 1992a) y en el hombre (Sosa-Melgarejo y cols. 1988; Sosa-Melgarejo y Berry, 1992b, 1995; Biava y West, 1966; Jacobson y cols. 1966; Aydin y cols. 1991) En las arterias de mayor calibre sólo hay reportes en la arteria carótida de conejo (Spagnoli y cols. 1982) y en la aorta de ratas (Sosa-Melgarejo y Berry, 1992a).

En estudios previos, Sosa-Melgarejo y Berry (1992a) encontraron evidencia morfológica en aortas torácicas de ratas de que los MEC's aparecen tempranamente durante el desarrollo y observaron que en la mayoría de los casos, las prolongaciones citoplásmicas del MEC procedían de las células musculares lisas. El espacio entre las membranas plasmáticas de los MEC's fue de 6-15 nm de ancho. La mayoría mostraron vesículas sobre el lado citoplásmico de las membranas plasmáticas involucradas.

Sosa-Melgarejo y cols. (1988) al estudiar las arteriolas renales humanas describen en ellas tres tipos de MEC's ocurriendo a través de perforaciones de la lámina basal. A estos los clasificaron en tres tipos principales: i) proyecciones citoplásmicas que se originan de las células endoteliales (la mayoría), ii) proyecciones

citoplásmicas que se originan de las células musculares lisas (menos frecuentes) y iii) procesos que se originan de ambas células (raros). El espacio intercelular fue de 6.9-13 nm.

Los MEC's también han sido estudiados por Sosa-Melgarejo y cols. (1992b) en arteriosclerosis en biopsias renales humanas y observaron que aunque hay un incremento en la separación intercelular, el espacio intercelular permanece en promedio, igual que en los vasos normales y que el MEC se rompe sólo que la placa arteriosclerótica tenga más de 2.5 micrómetros y el rompimiento de los contactos puede ser responsable del deterioro de la comunicación entre la túnica íntima y la media en la pared vascular en la arteriosclerosis.

Los trabajos descritos por Sosa-Melgarejo y cols. (1988, 1992a, 1992b, 1993b), apoyan la sugerencia de que los MEC's están localizados en sitios de tensión en la pared vascular y que pueden estar involucrados también en la transmisión de fuerza, sugiriendo que los MEC's pueden ser la base morfológica y actuar como sensores de tensión en la pared vascular.

En reportes previos, Sosa-Melgarejo y cols. (1992b) demostraron en vasos humanos que este sensor de tensión puede ser afectado por la hipertensión. En vasos normotensos, los MEC's muestran aposiciones simples; pero en los estados hipertensivos muestran MEC's con material electrodensito submembranoso sobre el

lado citoplásmico de las membranas celulares involucradas. Este tipo de contacto con electrodensidad tiene algunas semejanzas a las uniones intermedias donde hay asociación con microfilamentos de actina (Geiger y cols. 1983; Sosa-Melgarejo y cols. 1988, 1991).

Los MEC's también han sido estudiados por Sosa-Melgarejo y Berry en la aorta fetal humana (1995) y en este estudio establecieron la presencia de este tipo de comunicación en la aorta de feto humano de 10 semanas de edad, donde usualmente las proyecciones citoplásmicas procedían de las células musculares lisas. La naturaleza de los contactos célula a célula fue vía aposiciones simples y el espacio intercelular fue de 6-15 nm.

1.8.3 REMODELACION VASCULAR

La vasculatura es capaz de detectar cambios en su medio, integrando señales a la comunicación intercelular, transformándose a sí misma a través de mediadores que influyen tanto la estructura como la función. Este proceso depende de una interacción dinámica entre factores de crecimiento localmente producidos, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos. El proceso biológico de la remodelación vascular se divide en los siguientes componentes: a) la detección de señales debidas a cambios en las condiciones hemodinámicas (sensores), b) la liberación de señales dentro de la célula y a células adyacentes (transductores), c) la síntesis y liberación o

activación de sustancias que influyen el crecimiento, muerte o migración celular, o la composición de matriz extracelular (mediadores) y d) los cambios estructurales resultantes en la pared vascular (Gibbons y Dzau, 1994).

El endotelio juega un papel prominente en el proceso de remodelación vascular. La superficie endotelial está constantemente expuesta a factores humorales, mediadores inflamatorios y fuerza físicas. El balance homeostático se mantiene por sustancias endógenas vasoactivas (vasodilatadoras y vasoconstrictoras), mediadores procoagulantes y anticoagulantes, proinflamatorios y antiinflamatorios y promotores e inhibidores de la proliferación celular. Así el endotelio está estratégicamente situado para servir como célula detectora que evalúa señales hemodinámicas y humorales y como célula efectora provocando respuestas que pueden afectar eventualmente la estructura del vaso. Los efectos generalmente ocurren en la túnica media, para lo cual debe haber una comunicación entre las células endoteliales y las células musculares lisas que son las células blanco. Todo sugiere que esta comunicación está dada por los MEC's.

Un ejemplo de remodelación de la pared vascular en respuesta al daño es el del injerto venoso en la circulación arterial. Estos deben adaptarse a condiciones de alto flujo sufriendo dilatación para normalizar la fuerza de fricción. Un desequilibrio entre promotores e inhibidores del crecimiento endógenos puede permitir la oclusión de los injertos venosos, los cuales además tienen generación dañina de óxido nítrico por las

células endoteliales y actividad incrementada de la enzima convertasa de angiotensina (Lüscher y cols. 1988; O'Donohoe y cols. 1991).

En los eventos fisiológicos y fisiopatológicos de los vasos sanguíneos, la interacción endotelio-músculo liso juega un papel central y la evidencia sugiere la participación activa de los MEC's, mismos que no han sido estudiados en el proceso de remodelación vascular. Se ha demostrado que los injertos vasculares sufren el proceso de remodelación a fin de adaptarse a las condiciones que les son impuestas por el medio donde han de permanecer. Existe evidencia de que los MEC's pueden sufrir modificaciones en los estados hipertensivos, apoyando su papel de sensores de tensión. Esto hace importante su estudio en las arterias coronarias, mamaria interna y vena safena a fin de demostrar su presencia en estos vasos, conocimiento que posteriormente será de gran utilidad para evaluar la eficacia de los injertos coronarios (bypass).

1.9 ARTERIAS CORONARIAS

Las arterias coronarias son dos: una coronaria izquierda o anterior y otra coronaria derecha o posterior.

Arteria coronaria izquierda. Nace a la altura del seno izquierdo de Valsalva, al nivel del borde libre de la válvula o un poco por encima de ella. Se dirige a la depresión

profunda formada por la aorta y a la cara izquierda de la arteria pulmonar, por un lado y por el otro por la aurícula izquierda con su apéndice auricular. Se halla envuelta en una atmósfera de tejido adiposo que rodea también a la aorta en su origen. Alcanza después la extremidad superior del surco interventricular anterior, recorriéndolo hasta la punta del corazón a la cual bordea para terminar poco después. Origina diversos ramos vasculares destinados a las paredes de la aorta y de la pulmonar y emite también la arteria adiposa izquierda de Vieussens, que nace de la parte inicial de la arteria, atraviesa el tejido adiposo de la base del corazón y se dirige a la derecha y afuera para anastomosarse con la arteria infundibular derecha, rama de la coronaria derecha. Otras ramas de la arteria coronaria izquierda son: los ramos auriculares destinados a la pared y al apéndice auricular de la aurícula izquierda, la arteria auriculoventricular, las arterias ventriculares, las arterias anteriores del tabique y arterias perforantes anteriores. La arteria coronaria izquierda una vez que ha alcanzado la punta del corazón se anastomosa en el surco interventricular inferior con la coronaria derecha.

Arteria coronaria derecha. Nace inmediatamente por arriba de la válvula sigmoidea derecha y es más voluminosa que la coronaria izquierda. Poco después de su origen, se dirige hacia la derecha, pasa entre la arteria pulmonar y el apéndice auricular derecho y se dobla hacia abajo para introducirse en la porción derecha del surco auriculoventricular. Alcanza luego la extremidad posterior del surco interventricular inferior donde se acoda para introducirse en él y termina antes de

alcanzar el vértice del corazón al anastomosarse con la coronaria izquierda (Quiroz, 1977).

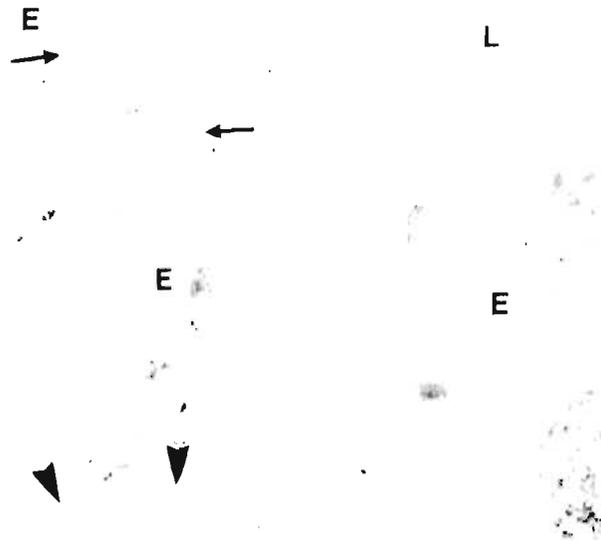


Figura 1.1 Fotomicrografía de la túnica íntima de la pared vascular. Se observan varias células endoteliales (E) que muestran cuerpos de Weibel-Palade (flechas) y numerosas vesículas (puntas de flecha) por debajo de la membrana celular L=Luz 40 000x



Figura 1.2 Fotomicrografía de las túnicas íntima y media de la pared de un vaso sanguíneo que muestra una célula muscular lisa con cuerpos densos (flechas) y la membrana basal que recubre a su membrana celular (puntas de flecha) 26 000x

CAPITULO 2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 PROBLEMAS GENERALES

2.1.1 ¿En las arterias coronarias, arteria mamaria interna y vena safena se establecen relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media a través de las estructuras denominadas MEC's?

2.1.2 ¿Las arterias coronarias, arteria mamaria interna y vena safena muestran semejanzas o diferencias en la relación ultraestructural entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media?

2.2 PROBLEMAS ESPECIFICOS

2.2.1 ¿En las arterias coronarias, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's?

2.2.2 ¿En la arteria mamaria interna las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's?

2.2.3 ¿En la vena safena las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's?

2.2.4 ¿Las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media observadas en las arterias coronarias son similares a las observadas en la arteria mamaria interna?

2.2.5 ¿Las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media observadas en las arterias coronarias son diferentes a las observadas en la vena safena?

CAPITULO 3
OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

3.1.1 Demostrar mediante microscopía electrónica de transmisión que en las arterias coronarias, mamaria interna y vena safena, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's.

3.1.2 Demostrar mediante microscopía electrónica de transmisión que las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media en las arterias coronarias son similares a las de la arteria mamaria interna y diferentes a las de la vena safena.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.2.1 Demostrar mediante microscopía electrónica de transmisión que en las arterias coronarias, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's.

3.2.2 Demostrar mediante microscopía electrónica de transmisión que en la arteria mamaria interna, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's.

3.3.3 Demostrar mediante microscopía electrónica de transmisión que en la vena safena, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's.

3.3.4 Demostrar mediante microscopía electrónica de transmisión que las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media en la arterias coronarias son similares a las observadas en la arteria mamaria interna.

3.3.5 Demostrar mediante microscopía electrónica de transmisión que las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media en las arterias coronarias son diferentes a las observadas en la vena safena.

CAPITULO 4
HIPOTESIS

4.1 HIPOTESIS GENERALES

4.1.1 En las arterias coronarias, mamaria interna y vena safena, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's.

4.1.2 Las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media en las arterias coronarias son similares a las observadas en la arteria mamaria interna y diferentes a las observadas en la vena safena.

4.2 HIPOTESIS ESPECIFICAS

4.2.1 En las arterias coronarias, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's.

4.2.2 En la arteria mamaria interna, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's.

4.2.3 En la vena safena, las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media se establecen a través de MEC's.

4.2.4 Las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media en las arterias coronarias son similares a las observadas en la arteria mamaria interna.

4.2.5 Las relaciones ultraestructurales entre las células de la túnica íntima y las células de la túnica media en las arterias coronarias son diferentes a las observadas en la vena safena.

CAPITULO 5
MATERIAL Y METODOS

5.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley del Bioterio del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del IMSS. Se trató de animales de 12-20 semanas de edad, con un peso aproximado de 250-350 g, mantenidos bajo condiciones controladas de luz y temperatura y alimentados ad libitum.

5.2 TECNICA ANESTESICA

Se utilizó ketamina a dosis de 30 mg/kg y droperidol 1 mg/kg administrados por vía intramuscular. La duración de la anestesia fue suficiente para llevar a cabo los procedimientos quirúrgicos (figura 5.1).

5.3 PERFUSION INTRAVITAL DE LOS VASOS

Se procedió a realizar tricotomía de la región toracoabdominal y de la cara anteroexterna del tercio inferior de ambas extremidades posteriores. Se procedió a efectuar disección por planos de esta región hasta localizar la vena safena que fue referida mediante hilo de sutura. Posteriormente con el animal en posición supina se realizó incisión subcostal transversa con hoja de bisturí en la cara anterior del tórax inmediatamente por debajo de los arcos costales, se disecó por planos hasta exponer la parrilla costal. A nivel de la unión costocondral se realizó sección de la misma hasta

llegar al tercer arco costal para permitir la exposición de los órganos del mediastino. Al visualizarse el corazón se procedió a realizar la fijación de los vasos de la siguiente manera: con aguja del número 18, conectada a un equipo de venoclisis y a su vez con un frasco de 500 ml con glutaraldehído al 2.5 % colocado a una altura de 1.20 mts sobre el nivel del animal se procedió a efectuar punción del ventrículo izquierdo a nivel de la punta de la punta del corazón y se permitió el paso libre de la solución fijadora por un tiempo de 30 minutos (figura 5.2). Simultáneamente, se realizó una incisión a nivel de la aurícula derecha a fin de permitir el vaciamiento de la sangre. Posteriormente mediante el uso de microscopio estereoscópico se removió a las arterias coronarias, mamaria interna y vena safena y fueron colocadas en solución fijadora de glutaraldehído al 2.5 % en buffer de cacodilato a pH de 7.4 a fin de completar el proceso de fijación. Las muestras fueron después lavadas en buffer de fosfato.

5.4 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION CONVENCIONAL

Bajo un microscopio estereoscópico de disección, se cortaron pequeños bloques de 1 mm³ de las arterias coronaria izquierda, mamaria interna y vena safena (figuras 5.3, 5.4 y 5.5). Los especímenes fueron post-fijados en tetróxido de osmio al 1% por 1.5 horas, deshidratados en series graduales de etanol e incluidos en epon. Se hicieron cortes semifinos en un ultramicrotomo Reichert, se seleccionaron y se montaron en portaobjetos. Estos cortes fueron teñidos con paragon, se observaron a la microscopía de luz y se seleccionó un área para cortes ultrafinos. Estos se efectuaron con el mismo

ultramicrotomo se montaron sobre rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Estos cortes se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10 y en uno Zeiss M 906.

5.5 IDENTIFICACION DE LOS CONTACTOS MIOENDOTELIALES

En las rejillas para estudio se estudió la totalidad del perímetro correspondiente a la superficie endotelial con búsqueda intencionada de los sitios de mayor aproximación de su membranas celulares con las membranas celulares de las células musculares lisas en las áreas de perforación de la lámina elástica interna. Las fotografías de bajo poder de resolución se tomaron a x2 000 y se aumentaron a una amplificación total de x6 000. Los sitios con probable contacto mioendotelial fueron examinados y fotografiados a una resolución de x22 000, e impresos a una amplificación de x70 000 a x100 000 para su identificación y medición.

5.6 IDENTIFICACION DE LAS VARIABLES

Independiente

Tipo de vaso sanguíneo.

A. Arteria coronaria.

B. Arteria mamaria interna.

C. Vena safena.

Dependiente

1. Contacto mioendotelial.

5.7 DEFINICION OPERATIVA DE LAS VARIABLES

Independiente

Tipo de vaso sanguíneo

A. Arteria coronaria: Es arteria muscular o de distribución. Se mide en escala nominal dicotómica, sus unidades de medición son presencia o ausencia. Se identificó por disección anatómica utilizando microscopio estereoscópico a x16.

B. Arteria mamaria interna: Es arteria muscular o de distribución. Se mide en escala nominal dicotómica, sus unidades de medición son presencia o ausencia. Se identificó por disección anatómica utilizando microscopio estereoscópico a x16.

C. Vena safena: Es vena de calibre intermedio. Se midió en escala nominal dicotómica, sus unidades de medición fueron presencia o ausencia. Se identificó por disección anatómica utilizando microscopio estereoscópico a x16.

Variable dependiente

Contacto mioendotelial: Area de contacto más íntimo entre una célula de la túnica íntima y una célula de la túnica media de la pared vascular. Es una variable nominal dicotómica (presente o ausente). Cuando estuvo presente se midió su densidad considerando número de contactos por perímetro estudiado (escala numérica discreta) y se midió el espacio intercelular en nm (escala numérica continua). Para considerarlo

como verdadero contacto, se estableció como requisito la no existencia de membrana basal para ninguna de las dos membranas celulares en aposición estrecha. Además, se estudiaron otras características como la procedencia de las prolongaciones citoplásmicas (de una célula endotelial, de una célula muscular lisa o de ambas), forma del contacto y número de células que hicieron contacto entre sí.

5.8 SISTEMA DE ANALISIS DE IMAGEN

Las rejillas fueron montadas en el microscopio electrónico de transmisión el cual a su vez estaba conectado a un sistema computarizado de análisis de imagen. El perímetro del vaso por su superficie luminal se midió trazando una línea usando un cursor, y los contactos se contaron manualmente después de eso se determinó el número de contactos por milímetro estudiado. Las medidas del espacio intercelular de cada uno de los contactos se efectuaron sobre las microfotografías impresas mediante un "Ultrastructure size calculator".

5.9 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se perfundieron un total de cinco animales, de cada uno de ellos se obtuvieron cinco especímenes de cada vaso sanguíneo que correspondieron a un total de 75 muestras.

5.10 ANALISIS ESTADISTICO

La densidad de los contactos en los tres tipos de vasos se comparó mediante ANOVA de Kruskal Wallis por tratarse de unidades de medición numéricas discretas.

Para la medición de los espacios intercelulares en nanómetros la comparación para los tres tipos de vasos se realizó mediante ANOVA de Kruskal Wallis porque aunque se trató de variable cuantitativa continua la distribución de los valores no correspondió a la curva normal.

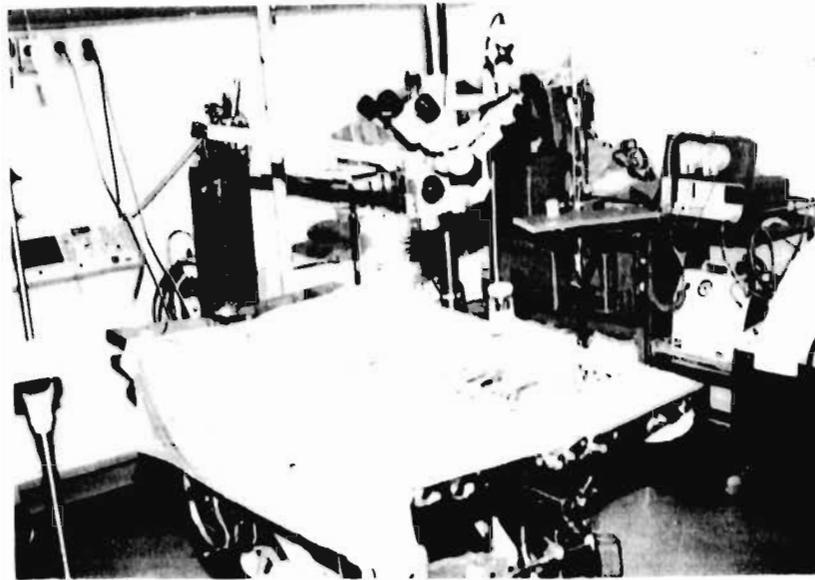


Figura 5.1 Sala de quirófano del bioterio con la rata Sprague-Dawley previamente anestesiada y el instrumental quirúrgico necesario para iniciar el procedimiento de perfusión vascular con la solución fijadora

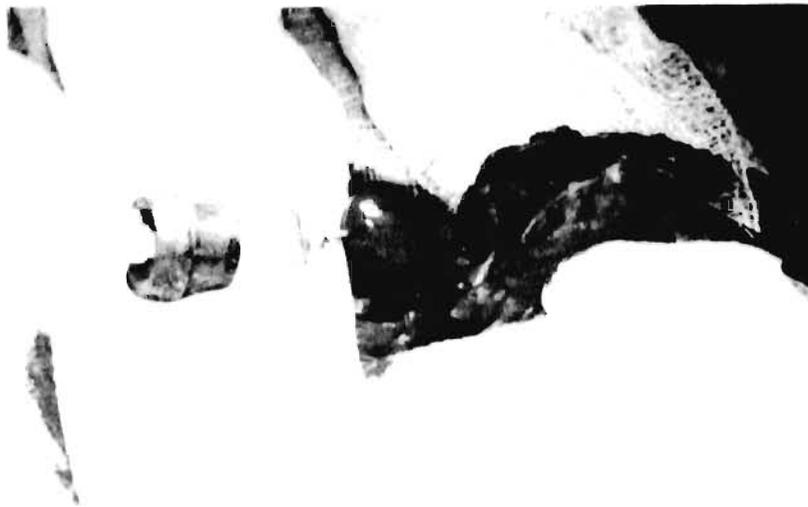


Figura 5.2 Rata Sprague-Dawley con exposición de las estructuras anatómicas del mediastino y catéter del número 18 introducido en el ventrículo izquierdo. El fijador (glutaraldehído) penetra por el ventrículo izquierdo y desde allí circula por todo el árbol vascular



Figura 5.3 Vena safena (flecha) de la rata Sprague-Dawley referida con hilo de sutura



Figura 5.4 Parrilla costal de la rata donde se observa la arteria mamaria interna (flecha)

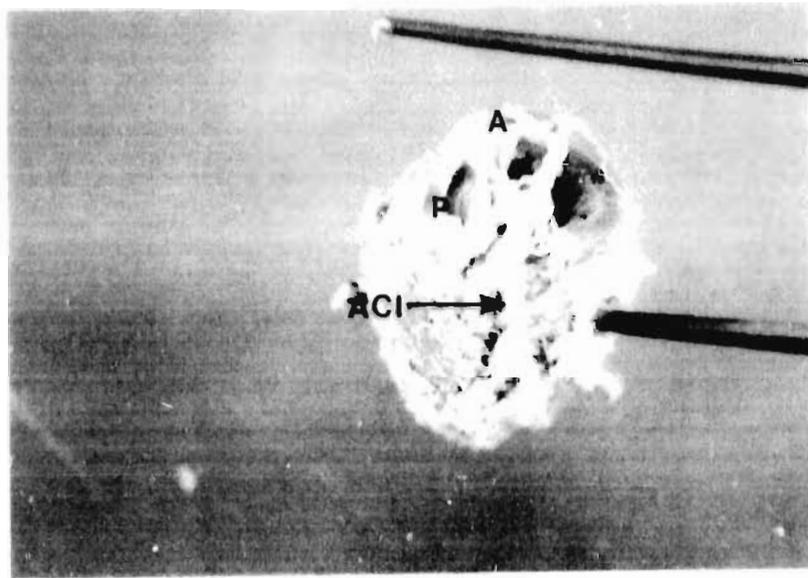


Figura 5.5 Estructuras anatómicas del corazón de rata. Se observa la arteria aorta (A) con sus ramas, arteria pulmonar (P) y la arteria coronaria izquierda (ACI).

CAPITULO 6
RESULTADOS

6.1 LA ARTERIA CORONARIA

6.1.1 MICROSCOPIA DE LUZ

La pared de la arteria coronaria consiste de las tres capas o tunicas habituales que se observan en todo vaso sanguíneo: la capa más interna que es la túnica íntima; la túnica media que es la capa muscular lisa vascular y la capa externa, la adventicia (figura 6.1).

La túnica íntima está formada por un revestimiento de células endoteliales aplanadas orientadas en la dirección del flujo sanguíneo que se encuentran en la superficie luminal y una banda de fibras elásticas, la lámina elástica interna, por el lado de la superficie subendotelial (figura 6.2).

La túnica media está constituida casi totalmente por células musculares lisas dispuestas circunferencialmente cuyos núcleos son alargados y orientados en la misma dirección. Hay escasas fibras elásticas y colágenas dispersas entre las células de esta túnica; en la parte más externa de ella se encuentra una banda de fibras elásticas relativamente desarrollada, la lámina elástica externa (figura 6.2).

La adventicia consiste principalmente de fibras colágenas y pueden observarse algunos fibroblastos.

6.1.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA

Mediante la microscopía electrónica de transmisión convencional, se confirma con mayor detalle la presencia de tres tunicas en la pared vascular de la arteria coronaria: la íntima, la media y la adventicia (figura 6.3).

En la túnica íntima, el endotelio consta de una monocapa de células fusiformes aplanadas con su eje longitudinal en la dirección de la corriente sanguínea. Las células endoteliales son continuas y están interconectadas entre sí por uniones impermeables que forman sellos locales. El citoplasma de las células endoteliales individuales, además de los organelos usuales tales como retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias localizados principalmente en la región paranuclear, contiene cuerpos de Weibel-Palade propios de éstas células. Estas estructuras son vesículas rodeadas de membrana que miden 0.1x2-3 micras y contienen componentes regularmente espaciados alineados en forma paralela a su eje longitudinal. Una característica notable de las células endoteliales es que una parte relativamente importante de ellas está ocupada por vesículas de aproximadamente 70 nm de diámetro con un rango de 50-90 nm. Estas vesículas aparecen ya sea como unidades aisladas en el citoplasma, como cadenas de vesículas fusionadas o como vesículas abiertas hacia la luz vascular o hacia la superficie subendotelial (figura 6.4). Entre el endotelio y la túnica media se observa la lámina elástica interna que tiene un espesor promedio de 0.817 micras con un rango de 0.750 a 0.922 micras.

La túnica media está formada por tres a cuatro capas de células musculares lisas (figura 6.5). En ellas hay acúmulos de mitocondrias, complejos de Golgi y retículo endoplásmico que ocupan un área adyacente al núcleo. Se observan cuerpos densos centrales dispersos en el citoplasma y cuerpos densos periféricos asociados a la membrana celular. El resto de la célula contiene miofilamentos asociados a los cuerpos densos. En el lado citoplásmico de la membrana celular, alternando con los cuerpos densos se observan caveolas intracelulares. Sobre la superficie de todas las células musculares lisas hay una membrana basal que separa a las células individuales unas de otras; ésta membrana basal no se observa en los sitios en que existen contactos célula a célula. Entre las células de la túnica media hay escasos componentes de matriz extracelular como fibras de colágena, fibras de elastina, proteoglicanos y glicoproteínas.

En la adventicia existe gran cantidad de colágena y fibroblastos.

6.1.2.1 CONTACTOS MIOENDOTELIALES

A. Aspectos morfológicos

Los contactos mioendoteliales son las áreas de contacto más íntimo entre una célula de la túnica íntima y una célula de la túnica media de la pared vascular. Se localizan en las zonas de perforación de la lámina elástica interna. Las membranas

celulares de las células en aposición estrecha carecen de membrana basal en el sitio en que se establece el contacto. Los contactos entre las células endoteliales y las células musculares lisas están irregularmente distribuidos a lo largo de la pared del vaso. Se observaron tres tipos de MEC's según el tipo celular de donde proceden las proyecciones citoplásmicas que lo constituyen:

i) Proyecciones citoplásmicas que se originan a partir de la célula endotelial por un lado y de la célula muscular lisa del lado opuesto (61.1%) (figura 6.6).

ii) Proyecciones citoplásmicas que se originan de las células musculares lisas (25%) (figura 6.7).

iii) Proyecciones citoplásmicas que se originan a partir de la células endotelial (13.9%) (figuras 6.8 y 6.9).

Las proyecciones citoplásmicas fueron variables en tamaño y forma, desde proyecciones citoplásmicas alargadas y angostas hasta superficies redondeadas con mayor extensión de la zona de contacto.

B. Espacio intercelular

Se midió el espesor del espacio intercelular en nm de ocho MEC's tomados al azar y los resultados se muestran en la tabla 6.1.

TABLA 6.1 ESPACIO INTERCELULAR DE LOS CONTACTOS MIOENDOTELIALES
EN LA ARTERIA CORONARIA (nm)

10.42	16.00
11.11	16.30
13.90	17.20
14.46	17.50

Media: 14.61.

Desviación estándar: 2.677.

Sesgo: -0.67 Curtosis: -0.944

C. Densidad de los contactos mioendoteliales

El número de contactos observado por perímetro de superficie luminal de la túnica íntima, en cortes transversales de la arteria, se expresa en contactos por mm a fin de expresarlo con unidades enteras. Los resultados se muestran en la tabla 6.2.

TABLA 6.2 DENSIDAD DE LOS CONTACTOS MIOENDOTELIALES EN LA ARTERIA
CORONARIA

RATA	NUMERO DE MEC's*	LONGITUD ESTUDIADA EN μ	MEC's/ mm
1	10	295.4	33
2	16	272.0	58
3	19	593.0	32
4	13	433.3	30
5	5	87.2	57

*MEC's: Contactos mioendoteliales

Media:42

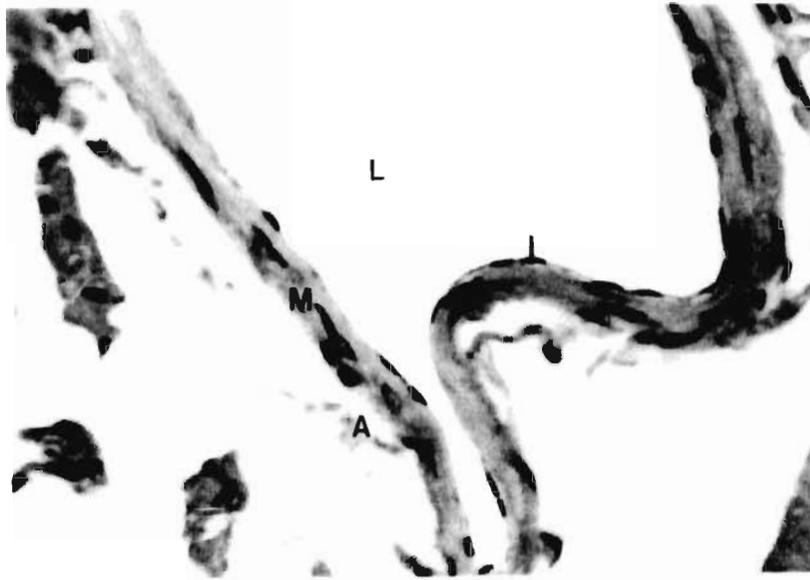


Figura 6.1 Pared de la arteria coronaria de rata. Se observa la luz (L) del vaso y las tres capas de la pared vascular: la tunica intima (I), la tunica media (M) y la adventicia (A). Hematoxilina-eosina. 40x.

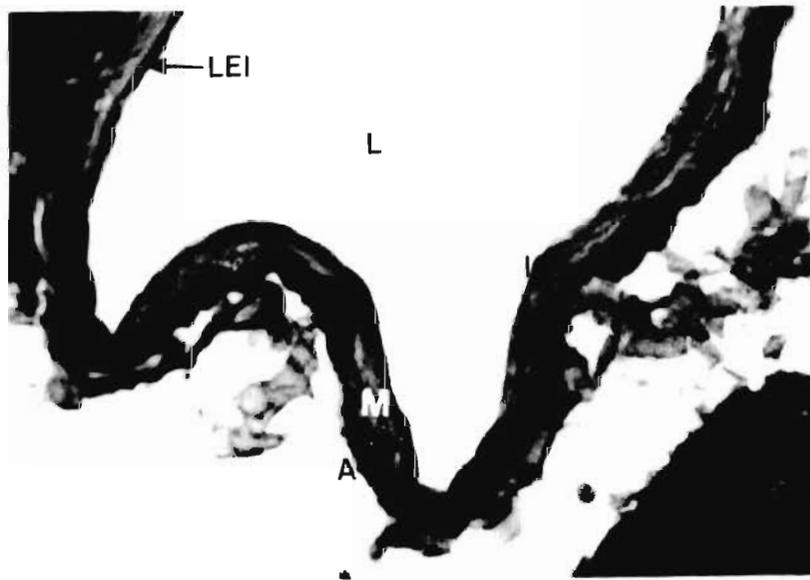


Figura 6.2 Pared de la arteria coronaria izquierda de rata. La intima (I) es delgada, la tunica media (M) es la capa predominante, y entre ambas esta situada la lamina elastica interna (LEI). La capa mas externa es la adventicia (A). Tricromico de Masson. 40x.

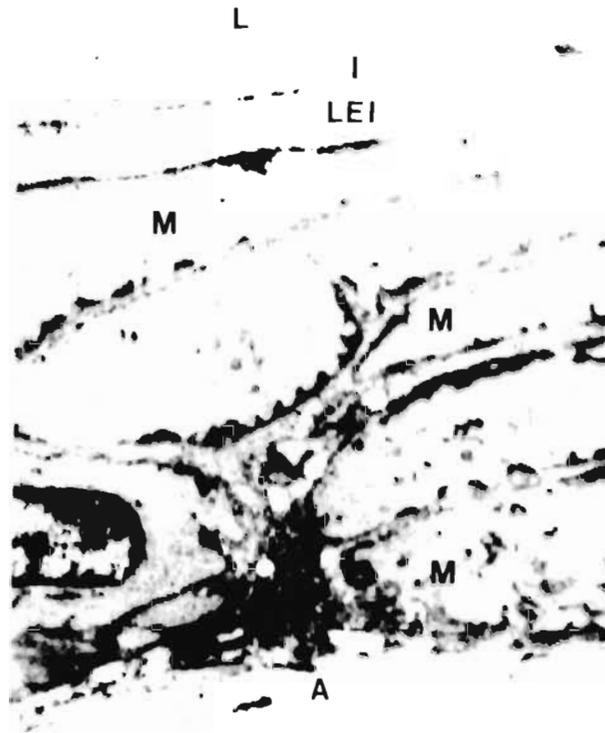


Figura 6.3 Microfotografía electrónica de la pared de la arteria coronaria de rata. Se observa la luz (L), la túnica intima (I), la lámina elástica interna (LEI) y la túnica media (M) que está formada por cuatro capas de células musculares lisas. A=Adventicia. 11 000x.

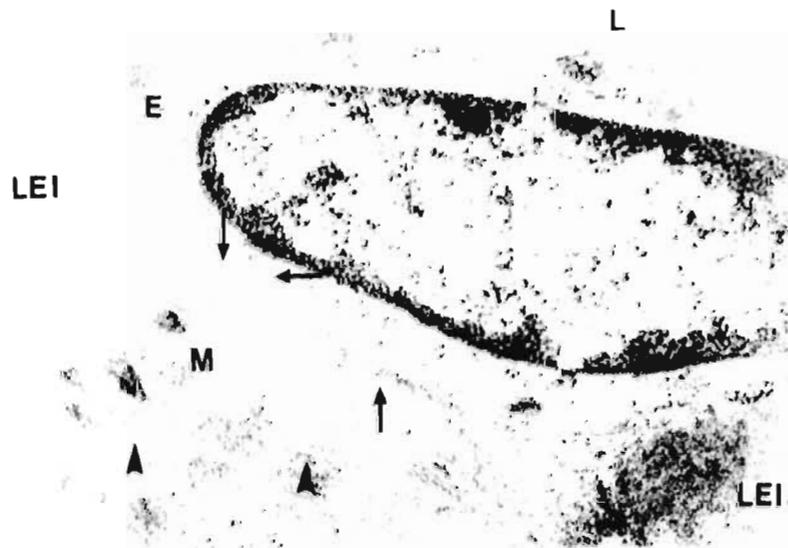


Figura 6.4 Arteria coronaria izquierda de rata. Se observan múltiples vesículas (flechas) submembranales en la célula endotelial (E) y en la célula muscular lisa (M), la cual además muestra miofilamentos (puntas de flecha). L=Luz. LEI=Lámina elástica interna. 35 000x.



Figura 6.5 Pared de la arteria coronaria de rata L=Luz. E=Endotelio. LEI=Lámina elástica interna M=Túnica media 13 300x

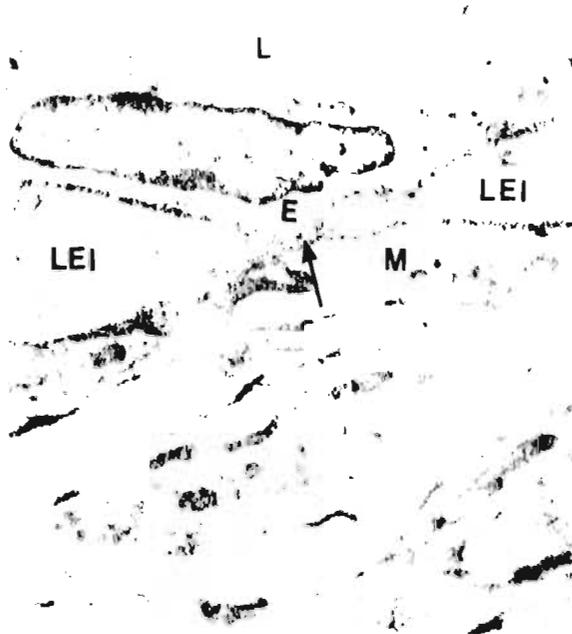


Figura 6.6 Contacto mioendotelial (flecha) en la arteria coronaria de rata en que se observan proyecciones citoplásmicas procedentes tanto de la célula endotelial (E) como de la célula muscular lisa (M) L=Luz. 16 000x.

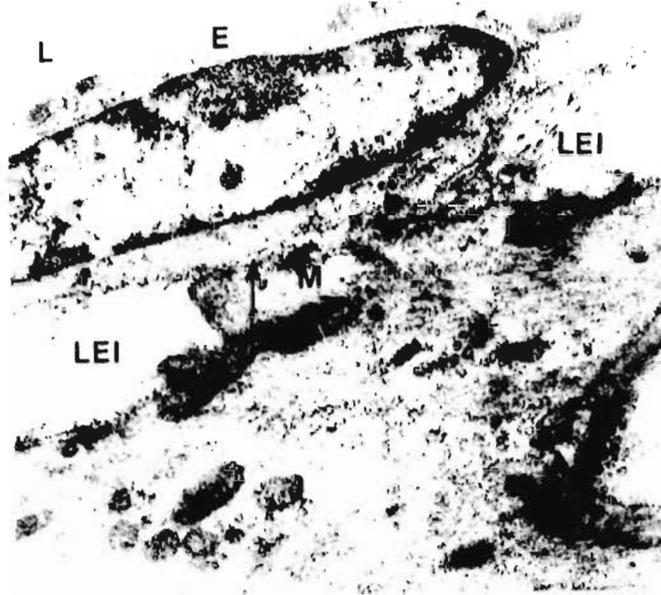


Figura 6.7 Arteria coronaria de rata que muestra un MEC (flecha) donde la proyección citoplasmica procede de la célula muscular lisa (M). L=Luz. E=Célula endotelial LEI=Lámina elástica interna 20 000x



Figura 6.8 Un MEC (flecha) de la arteria coronaria de rata que muestra la proyección citoplasmica procedente de la célula endotelial (E) 67 000x

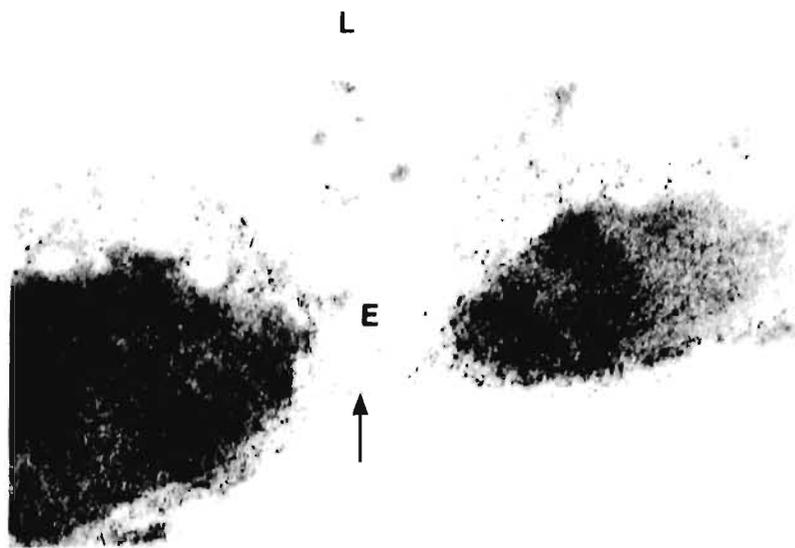


Figura 6 9 Pared de la arteria coronaria de rata. Se observa un MEC (flecha) caracterizado por el origen endotelial de la proyección citoplásmica. E=Célula endotelial. L=Luz 70 000x.

6.2 LA ARTERIA MAMARIA INTERNA

6.2.1 MICROSCOPIA DE LUZ

Con el microscopio óptico se observan tres capas bien delimitadas en la pared arterial: la túnica íntima, la media y la adventicia.

La túnica íntima consiste de células endoteliales aplanadas en la dirección del flujo sanguíneo y la lámina elástica interna. La túnica media consta de células musculares lisas dispuestas en capas bien definidas, separadas por una lámina elástica. En la parte exterior se observa la lámina elástica externa. La adventicia muestra tejido colágeno y fibroblastos (figura 6.10).

6.2.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA

Con el poder de resolución del microscopio electrónico se observaron con mayor definición las tres túnicas de la pared del vaso así como las láminas elásticas que delimitan a cada una de ellas (figura 6.11).

En la túnica íntima las células endoteliales presentan los organelos habituales, aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico, cuerpos de Weibel-Palade y numerosas vesículas subyacentes a la membrana celular y en otras áreas del

citoplasma. Es notable la presencia de una lámina elástica interna gruesa de 1.92 ± 0.22 μ de espesor promedio con un rango que va de 1.7 a 2.3 μ .

La túnica media muestra cuatro capas de células musculares lisas. Aproximadamente a la mitad del espesor de esta túnica se observa una gruesa lámina elástica que mide en promedio 2.2 ± 0.40 micras de ancho con un rango de 1.8 a 2.6 micras y que divide a esta túnica en dos unidades lamelares. La separación entre la túnica media y la adventicia está dada por la lámina elástica externa de 1.7 micras de espesor promedio con un rango de 1.4 a 1.9 micras. Entre las células musculares lisas individuales, se observa gran cantidad de tejido colágeno, así como en las áreas adyacentes a las láminas elásticas. La adventicia contiene fibras colágenas y fibroblastos.

6.2.2.1 CONTACTOS MIOENDOTELIALES

A. Aspectos morfológicos

Se observaron tres tipos de MEC's (figuras 6.12 a 6.15) según el origen de las proyecciones citoplásmicas: i) origen en ambas células, endotelial y muscular lisa (50%), ii) origen en la célula muscular lisa (42.86%) y iii) origen en la célula endotelial (7.14%). En todos casos las proyecciones fueron alargadas y los bordes celulares en contacto, redondeados.

B. Espacio intercelular

Las medidas en nanómetros del espacio intercelular de 8 MEC's se muestran en la tabla 6.3.

TABLA 6.3. ESPACIO INTERCELULAR DE LOS CONTACTOS MIOENDOTELIALES
EN LA ARTERIA MAMARIA INTERNA (nm)

12.00	15.63
13.17	16.10
13.30	17.20
14.80	18.00

Media: 15.03

Desviación estándar: 2.095

Sesgo: -0.02

Curtosis: -1.22

C. Densidad de los contactos mioendoteliales

El número de MEC's por mm se muestra en la tabla 6.4.

TABLA 6.4. DENSIDAD DE LOS CONTACTOS MIOENDOTELIALES EN LA ARTERIA
MAMARIA INTERNA

RATA	NUMERO DE MEC's*	LONGITUD ESTUDIADA EN μ	MEC's/mm
1	1	628.8	1.5
2	2	1071.2	0.9
3	3	1190.8	2.5
4	2	882.5	2.2
5	2	588.4	3.4

N=5

*MEC's: Contactos mioendoteliales.

Media: 2.10

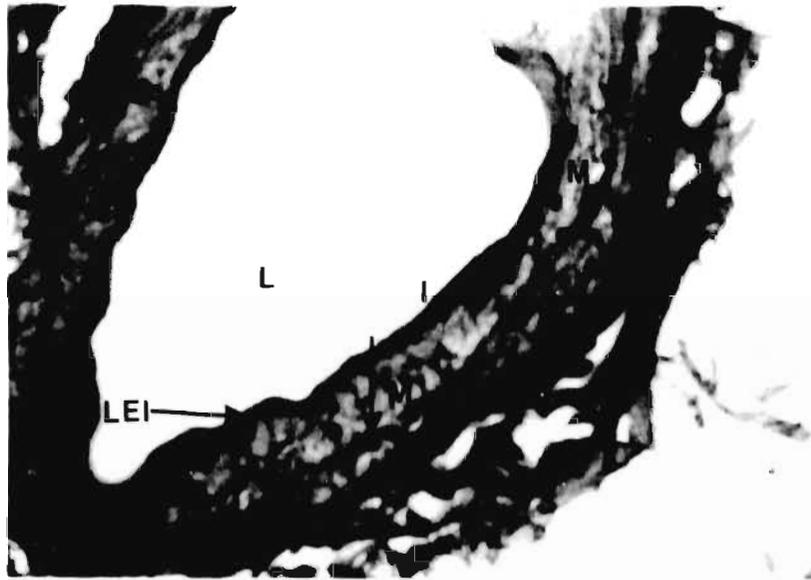
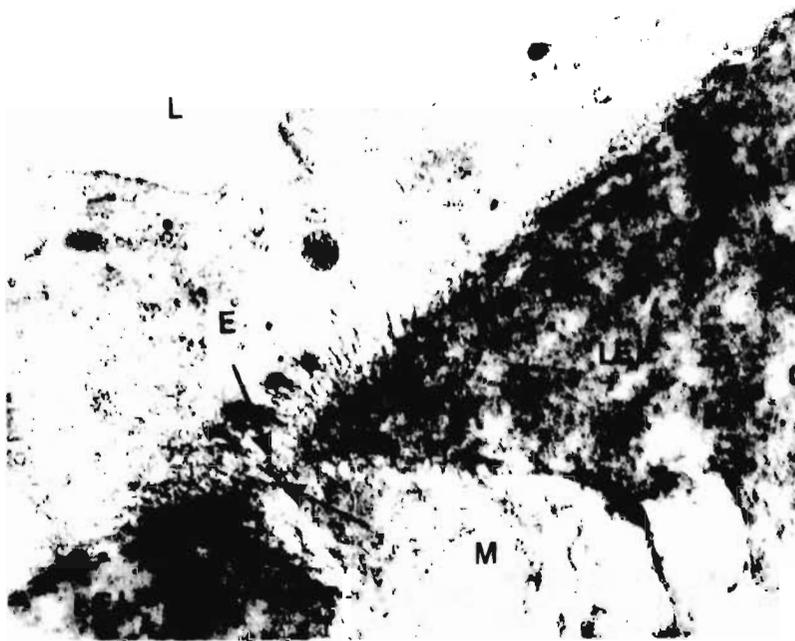


Figura 6.10 Pared de la arteria mamaria interna de rata. Se observan los nucleos apianados de las celulas endoteliales de la tunica intima (I) separada de la tunica media (M) por la lamina elastica interna (LEI). En la media se observa una banda bien definida de tejido elástico (flecha) que la divide en dos unidades lamelares. Tricromico de Masson. 60x.



Figura 6 11 Microscopia electrónica de la arteria mamaria interna de rata Muestra las células musculares lisas en la túnica media (M) Hay dos láminas elásticas (*) 9 000x



Figuras 6.12 (a-d) Esta serie de micrografías de la pared de la arteria mamaria interna de rata ilustran las secuencias desde la perforación de la lámina elástica interna hasta la integración del MEC rodeado de membrana basal.

Figuras 6.12 a) Micrografía que muestra una etapa en la formación de un MEC. La lámina elástica interna (LEI) presenta un sitio donde su espesor ha disminuido notablemente (flechas) sin que se observe aún una perforación completamente establecida. L=Luz del vaso. M=Túnica media. 48 000x

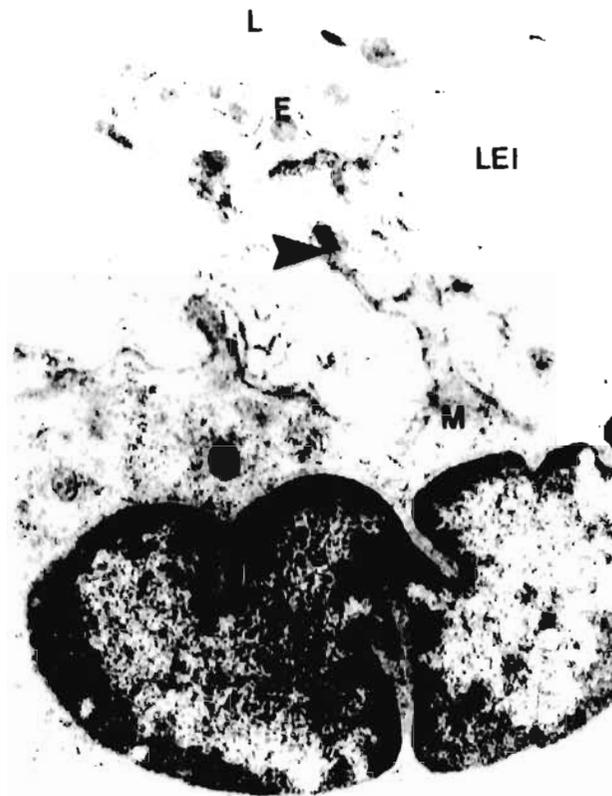


Figura 6.12 b) En esta micrografía se observa la perforación de la lámina elástica interna (LEI) a través de la cual pasa una proyección citoplásmica de la célula muscular lisa (punta de flecha). Entre las membranas celulares de la célula endotelial (E) y de la célula muscular lisa (M) hay material intercelular que impide que se establezca el contacto. La perforación mide 240 nm. L=Luz. LEI=Lámina elástica interna. 21 600x.

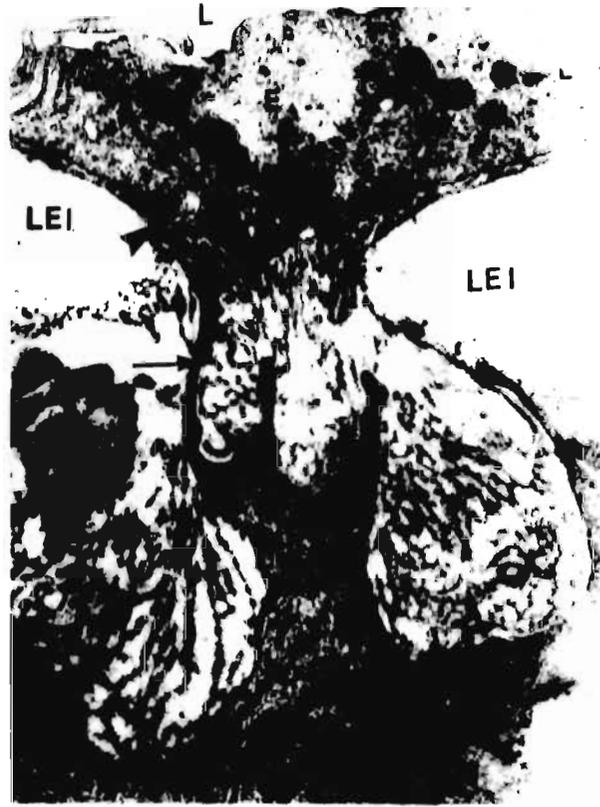


Figura 6 12 c) Micrografía donde se muestra la proximidad de la proyección citoplásmica de la célula muscular lisa (flecha) con la membrana de la célula endotelial (E). Ambas membranas celulares están separadas por membrana basal (puntas de flecha). L=Luz. LEI=Lámina elástica interna. M=Célula muscular lisa. 20 000x.

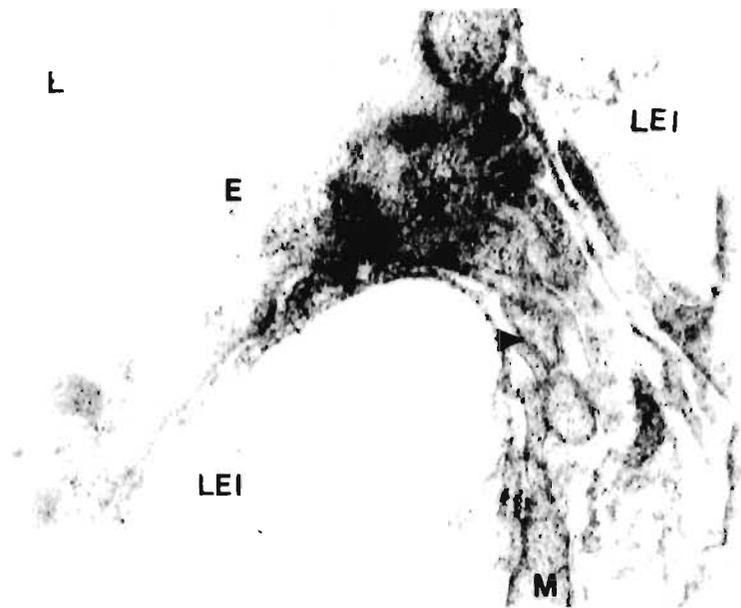


Figura 6.12 d) Arteria mamaria interna de rata que muestra un MEC (punta de flecha) donde las proyecciones citoplásmicas proceden de ambas células. M=Célula muscular lisa muscular lisa. L=Luz. E=Endotelio. 36 000x

6.3 LA VENA SAFENA

6.3.1 MICROSCOPIA DE LUZ

La pared del vaso está formada por las tres tunicas características de todos los vasos sanguíneos. A diferencia de las arterias coronaria y mamaria interna no se observa lámina elástica externa entre la media y la adventicia (figura 6.13).

6.3.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA

La presencia de las tres capas que constituyen la pared de los vasos sanguíneos pudo demostrarse claramente mediante el uso de la microscopía electrónica de transmisión (figura 6.14).

Las células endoteliales son de aspecto vesiculoso; contienen los mismos organelos observados en las células endoteliales de las arterias coronaria y mamaria interna (figura 6.15). La lámina elástica interna mide en promedio 1.412 micras de espesor con una desviación estándar de 2.45 y un rango de 1.20 a 1.43 micras.

La túnica media consta de dos a tres capas de células musculares lisas separadas entre sí por cantidades variables de fibras de colágena y de elastina sin llegar a formar verdaderas unidades lamelares. En esta túnica se observan fascículos

musculares constituidos por 3-5 células, rodeados lateralmente por proyecciones citoplásmicas procedentes de células endoteliales. A su vez, las células musculares lisas del fascículo se comunican entre sí a través de contactos intercelulares (figura 6.16).

La adventicia está compuesta por colágena y fibroblastos.

6.3.2.1 CONTACTOS MIOENDOTELIALES

A. Aspectos morfológicos

En la vena safena se observó gran variedad de formas de MEC's, desde puntiformes hasta los de bordes redondeados y con una amplia zona de contacto (figura 6.17). En algunos casos, las proyecciones citoplásmicas fueron cortas y en otros alargadas. Se observaron tres tipos de MEC's de acuerdo al origen de las proyecciones citoplásmicas al igual que en las arterias coronaria y mamaria interna (figuras 6.18, 6.19 y 6.20) y la mayoría fueron aquellos cuyo origen corresponde a la célula endotelial. Aunque en la mayor parte de los casos una sola célula endotelial hace contacto con una célula muscular lisa, en la vena safena se observaron las siguientes variantes: i) contacto de una célula endotelial con dos células musculares lisas (figura 6.21), ii) contacto de una célula muscular lisa con varias células endoteliales (figura 6.22).

En algunos casos, las membranas celulares que forman el MEC no están bien definidas debido a la presencia de vesículas que comunican hacia el espacio intercelular.

B. Espacio intercelular

Se midió el espacio intercelular de 8 MEC's en nm y los resultados se muestran en la tabla 6.5.

TABLA 6.5 ESPACIO INTERCELULAR DE LOS CONTACTOS MIOENDOTELIALES
(nm)

10.89	14.30
11.56	14.80
11.70	14.90
12.90	15.36

Media: 13.30

Desviación estándar: 1.57

Sesgo:-0.2210

Curtosis: -2.017

C. Densidad de los contactos mioendoteliales

El número de MEC's por mm, se presenta en la tabla 6.6.

TABLA 6.6 DENSIDAD DE LOS CONTACTOS MIOENDOTELIALES

RATA	NUMERO DE MEC's*	LONGITUD ESTUDIADA EN μ	MEC's/mm
1	34	605.3	56
2	20	400.0	50
3	38	599.5	63
4	32	411.4	77
5	55	471.0	110

*MEC's: Contactos mioendoteliales

Media: 71.20

En esta tesis se estudiaron las arterias coronaria, mamaria interna y la vena safena y se compararon los MEC's tanto respecto al espacio intercelular como a la densidad de los mismos. Los resultados comparados se muestran en las tablas 6.7 y 6.8

TABLA 6.7 ESPACIO INTERCELULAR EN nm DE LOS CONTACTOS
MIOENDOTELIALES

ARTERIA CORONARIA	A. MAMARIA INTERNA	VENA SAFENA
10.42	12.00	10.89
11.11	13.17	11.56
13.90	13.30	11.70
14.46	14.80	12.90
16.00	15.63	14.30
16.30	16.10	14.80
17.20	17.20	14.90
17.50	18.00	15.36

Se efectuó análisis de varianza de Kruskal-Wallis debido a que la distribución de los valores no correspondió a la de la curva normal, y no se encontraron diferencias significativas para los tres grupos, por lo que se concluye que los vasos sanguíneos estudiados no difieren entre si respecto al espesor de los MEC's con una p de 0.05.

TABLA 6.8 DENSIDAD DE LOS CONTACTOS MIOENDOTELIALES POR MILIMETRO

RATA	A. CORONARIA	A.MAMARIA INTERNA	VENA SAFENA
RATA 1	33	1.5	56
RATA 2	58	0.9	50
RATA 3	32	2.5	63
RATA 4	30	2.2	77
RATA 5	57	3.4	110

Por tratarse de una variable cuantitativa discreta se realizó ANOVA de Kruskal-Wallis y se encontró diferencias significativas entre los tres grupos con una $p=0.00007$. Para aislar el grupo o grupos que hacen la diferencia se efectuaron procedimientos de comparación múltiple y se encontró que persistieron las diferencias.



Figura 6 13 Pared de la vena safena de rata. Se observan las tres tunicas de la pared vascular intima (I) con los núcleos alargados de las células endoteliales, la media (M) que es la más desarrollada y la adventicia (A). L=Luz Van Gieson, 40x

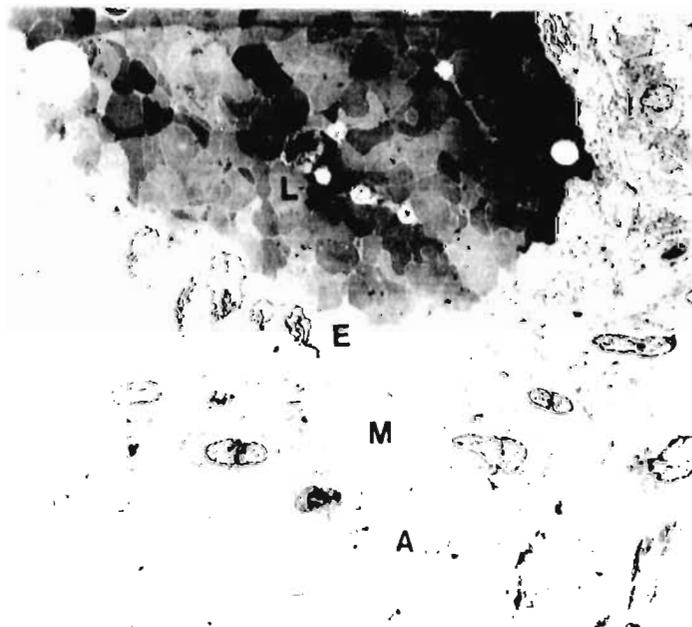


Figura 6 14 Fotomicrografía de la vena safena de rata que muestra las tres capas de la pared del vaso L=Luz E=Endotelio M=Músculo liso A=Adventicia 4 000x.

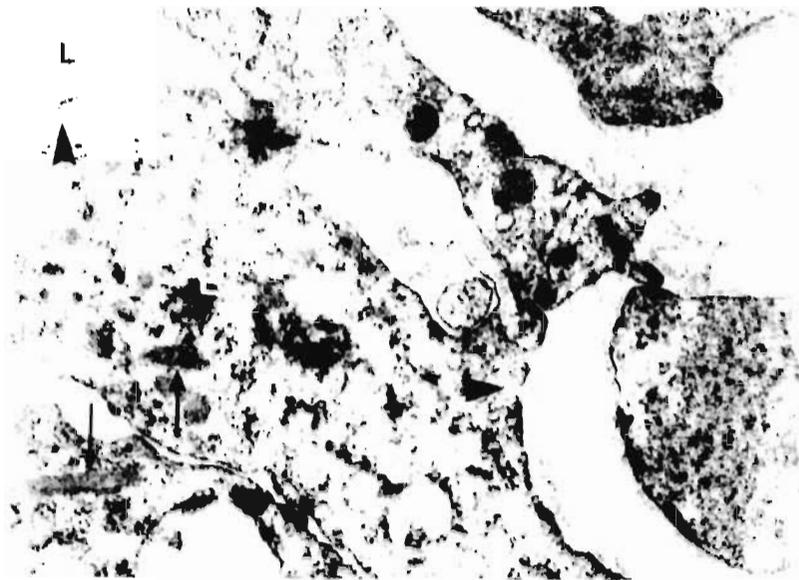


Figura 6 15 Fotomicrografía de la vena safena de rata que muestra células endoteliales (E) donde se observan cuerpos de Weibel-Palade (flechas) y vesículas citoplásmicas tanto en la superficie luminal como en la superficie subendotelial de la membrana celular (puntas de flecha). 40 000x

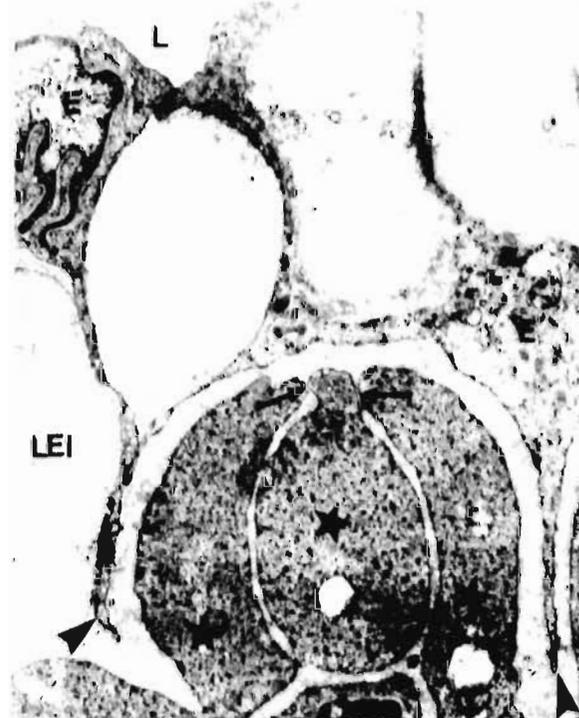


Figura 6 16 Esta fotomicrografía de la vena safena de rata muestra en la túnica media un fascículo muscular constituido por células musculares lisas (*) que establecen contacto entre si (flechas), rodeado por proyecciones citoplásmicas (puntas de flecha) procedentes de células endoteliales (E) L=Luz LEI=Lámina elástica interna. 17 000x

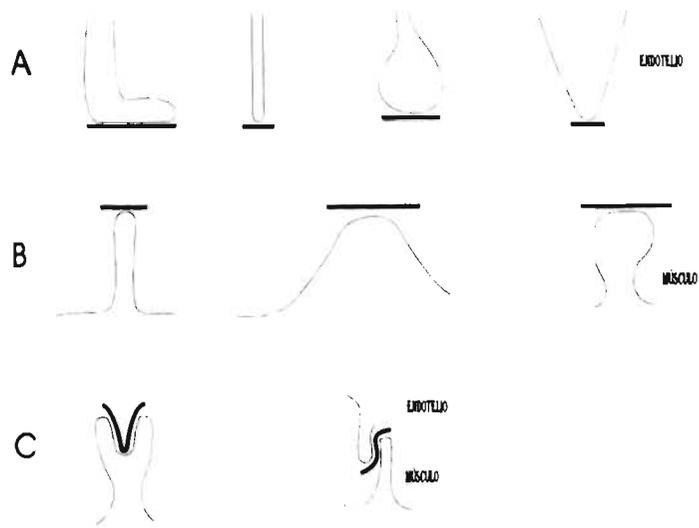


Figura 6.17 En este diagrama se muestra el origen de las proyecciones citoplásmicas y la diversidad de formas de los MEC's que se observan en la vena safena de rata. A) Las proyecciones de la parte superior proceden de la célula endotelial. La línea recta representa la membrana de la célula muscular lisa. B) Las proyecciones citoplásmicas proceden de la célula muscular lisa y en la parte superior las líneas rectas corresponden a la membrana celular endotelial. C) Las proyecciones citoplásmicas procedentes de ambas células son de forma más irregular.



Figura 6.18 MEC (flecha) de la vena safena de rata caracterizado por una proyección citoplásmica procedente de la célula endotelial (E). L=Luz. M=Túnica media. 19 000x.



Figura 6.19 Fotomicrografía de la vena safena de rata donde se observa un MEC (flecha) con la proyección citoplásmica procedente de una célula muscular lisa (M). Las membranas celulares a nivel del MEC no son bien definidas debido a la presencia de numerosas vesículas submembranales (puntas de flecha) L=Luz. 51 600x.

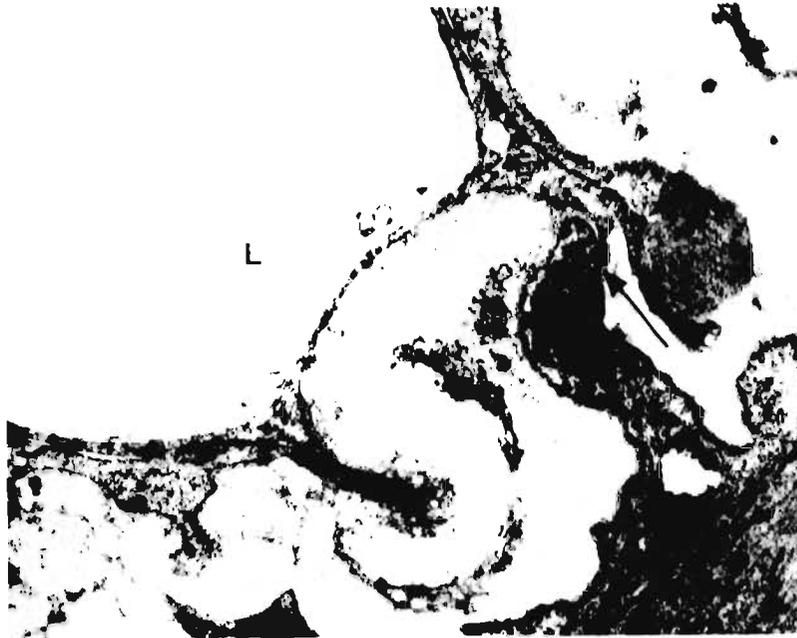


Figura 6.20 MEC (flecha) de la vena safena de rata. Las proyecciones citoplásmicas proceden de ambas células, endotelial (E) y muscular lisa (M) L=Luz 21 000x



Figura 6.21 Pared de la vena safena de rata que muestra una variante de MEC (flechas) en que una célula endotelial (E) establece contacto con dos células musculares lisas (M). 8 000x

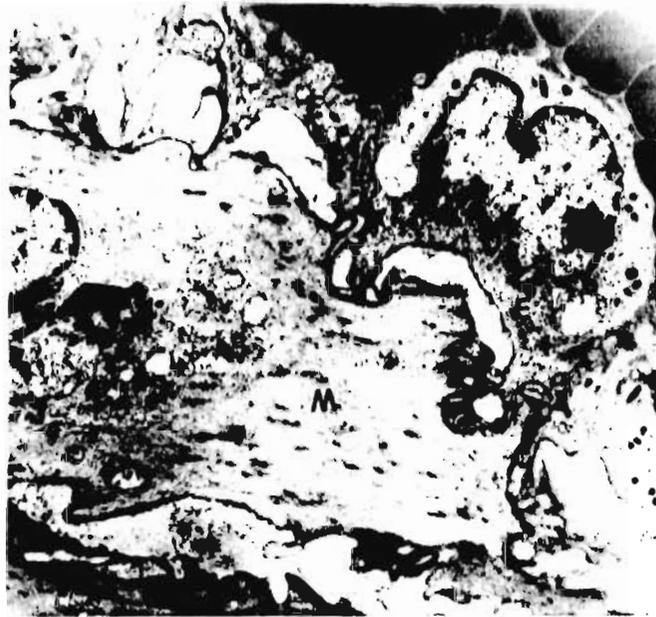


Figura 6.22 Esta fotomicrografía muestra variantes de MEC's en la vena safena de rata. Varias células endoteliales (E) establecen contacto (puntas de flecha) con la misma célula muscular lisa (M) 10 000x

CAPITULO 7

DISCUSION

La pared vascular funciona como un órgano integrado el cual, conservando ciertas características estructurales básicas determinadas genéticamente, muestra gran dinamismo y plasticidad. Se modifica a sí mismo en respuesta a señales extrínsecas e intrínsecas para adaptarse a las condiciones fisiológicas o patológicas que le impone su ambiente (Christ y cols. 1996). Para que esto ocurra entran en juego múltiples elementos tanto estructurales como funcionales en una compleja red de interacciones y de mecanismos de retroalimentación. De estos elementos podemos mencionar los siguientes: factores hemodinámicos, factores neurohumorales y elementos estructurales (Shireman y Pearce, 1996). Cada uno de los componentes estructurales posee múltiples funciones y se relaciona morfológicamente con los otros a través de uniones y contactos intercelulares. Sin la presencia de tales contactos y uniones, dichas funciones no podrían coordinarse para actuar como un todo. De manera específica son muy importantes los contactos intercelulares que se establecen en la interfase entre las células endoteliales y las células musculares lisas, los contactos mioendoteliales (MEC's).

Los contactos mioendoteliales son de primordial importancia en procesos tales como la remodelación vascular que está presente desde el desarrollo embrionario hasta la edad adulta (Cowan y Langille, 1996; Wong y Langille, 1996). Estos procesos implican múltiples eventos como: transducción de un tipo de energía a otro, actividades secretorias de las células endoteliales y musculares lisas, división celular, inhibición de la división celular, expresión o represión de genes, aumento o disminución del calibre

vascular y del espesor de la pared del vaso, regulación del tono vasomotor, etc. (Osol, 1995). Todos estos eventos ocurren tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. De estas últimas podemos mencionar la aterosclerosis (Sosa-Melgarejo y Berry; 1992b; Busse y Fleming, 1996), la hipertensión (Sosa-Melgarejo y cols. 1988), los aneurismas y las situaciones en que por razones terapéuticas se sustituye un segmento vascular por otro como ocurre en la cirugía de revascularización coronaria (bypass) (Barner, 1994).

7.1 Preparación de los especímenes

En el examen morfológico de los contactos entre las células endoteliales y las células musculares lisas de las paredes vasculares, los cortes observados mostraron buena conservación y se observaron satisfactoriamente las relaciones intercelulares de las diferentes tunicas de los vasos estudiados.

Se ha utilizado cierto número de fijadores en el estudio de los contactos intercelulares. En los primeros estudios de Palade (1952), se usó tetróxido de osmio como fijador primario. Este método se empleó por Pease y Paule en 1960 quienes estudiaron la aorta torácica de rata, pero desafortunadamente, las membranas celulares no se conservaron adecuadamente y no pudo obtenerse información acerca de los contactos intercelulares. Actualmente, el tetróxido de osmio sólo se usa para post-fijación.

Dewey y Barr en 1962 describieron por primera vez uniones nexus entre células musculares lisas después de la fijación del intestino delgado de perro con permanganato de potasio. Sin embargo, al parecer, los especímenes fijados con permanganato perdieron detalle celular (Yamauchi y Burnstock, 1969).

Para esta investigación se utilizó el método empleado por Sosa-Melgarejo y Berry (1988) para el estudio del músculo liso vascular. Este consiste en fijación con glutaraldehído seguida por post-fijación con tetróxido de osmio a temperatura ambiente, lo cual permitió una buena preservación de las relaciones intercelulares y de los organelos citoplásmicos.

7.2 Contactos mioendoteliales

Se examinaron los especímenes obtenidos de arteria coronaria, arteria mamaria interna y vena safena mediante microscopía electrónica de transmisión convencional para investigar las relaciones entre las células endoteliales y las células musculares lisas. Se observaron tres tipos de contacto a través de las perforaciones en la lámina elástica interna. Estos se clasificaron de acuerdo a su origen, de una célula endotelial, de una célula muscular lisa o de ambas. En esta discusión se les denominará contactos mioendoteliales (MEC's).

Los contactos mioendoteliales se describieron en los vasos de la microcirculación de la fascia de los músculos del muslo de conejo por Rhodin (1967) quien los clasificó como uniones nexus. Desde entonces ha habido controversia respecto al tipo de unión en el sitio del MEC, las fotografías en el artículo de Rhodin muestran aposiciones simples, por lo cual fueron mal clasificados. En el material presentado en esta tesis se observó que los contactos no muestran ningún tipo de unión conocido, lo cual concuerda con resultados previos obtenidos para otros vasos sanguíneos por Sosa-Melgarejo y Berry (1988, 1992a, 1992b, 1995); Sosa-Melgarejo y cols. (1988).

Los primeros estudios de MEC's fueron en riñón humano (Biava y West, 1966, Jacobsen y cols. 1966); sin embargo, estos estudios no proporcionaron detalles morfológicos. Spagnoli y cols. (1982) estudiaron los MEC's en arteria carótida de conejos y Taugner y cols. (1984) en riñón de rata y ratón. Estos autores sugieren la presencia de uniones nexus en los MEC's, pero sin presentar evidencias contundentes. Estudios detallados de MEC's han sido efectuados por Sosa-Melgarejo y cols. en arteriolas pequeñas normales e hipertensivas de riñón humano (1988); Sosa-Melgarejo y Berry en aterosclerosis (1992b), en aorta torácica de fetos de rata (1992a) y en aorta fetal humana (1995). Se han efectuado otros estudios de MEC's en vena safena de humanos (Svendsen y cols. 1990), en arteriolas de cerebro humano (Aydin y cols. 1991), en vasos sanguíneos pulmonares de perro (Michel y cols. 1995). Kristek y Gerová (1992) estudiaron las relaciones del endotelio con las células musculares lisas

en arterias coronarias de perro y de conejo; sin embargo, estos autores lo hicieron a través de microscopía electrónica de barrido y después de haber desprovisto a la pared vascular de su túnica íntima, por lo cual no muestran verdaderos MEC's en su material fotográfico.

Si se consideran las sustancias que pueden pasar a través de los MEC's, la mayoría de ellas son moléculas grandes de más de 1 200 Da, como el factor de crecimiento derivado del endotelio con un peso molecular de 27 Kda (Davies, 1986), el factor endotelial inhibidor de la proliferación de células musculares lisas de 40 Kda (Fritze y cols. 1985). Las uniones nexus proporcionan la principal vía para moléculas de aproximadamente 1 200 Da, pero son incapaces de acomodar moléculas más grandes. En este caso, la estrecha relación proporcionada por los MEC's permitiría a las moléculas llegar a la célula del lado opuesto por receptores en la membrana celular o por un mecanismo de endocitosis (Sosa-Melgarejo, 1991). Las numerosas vesículas observadas en las aposiciones simples de los vasos estudiados apoyan la sugerencia de que un activo proceso de transporte ocurre a través del contacto intercelular.

Se ha discutido el papel de los MEC's en la respuesta miogénica de las células musculares lisas en el mecanismo de Bayliss (Bayliss, 1902) como el método de autorregulación del lecho vascular. Este concepto de mecanismo o respuesta miogénica aplicado a los vasos sanguíneos, se refiere a una contracción del músculo liso vascular que es provocada por una aplicación de fuerza al músculo. *In vivo*, la

contracción se produce por un incremento en la presión intravascular o transmural. *In vitro*, la respuesta contráctil puede producirse por estiramiento de un fragmento de músculo excisionado. Este mecanismo parece ser un medio importante para mantener el tono vascular normal, y la presión intravascular prevalente es un estímulo suficiente para causar contracción parcial de las arteriolas (Sosa-Melgarejo, 1991).

Bouskela y Widerhielm (1979) observaron para todo tipo de vaso, que una disminución en la presión transmural produce vasodilatación, mientras que un incremento de la misma produce vasoconstricción. Parece razonable que un mecanismo de sensor de tensión esté relacionado a éstos fenómenos y que esté localizado en sitios de la pared vascular donde haya una mayor concentración de fuerza. La presencia de MEC's como sensores locales de tensión ha sido fuertemente apoyada por los trabajos de Sosa-Melgarejo y Berry (1988, 1991, 1992, 1995), quienes incluso demostraron que este sensor de tensión se puede ver afectado por la hipertensión.

Se han realizado co-cultivos de células endoteliales y células musculares lisas vasculares para investigar la diferenciación del músculo liso vascular (Chameley-Campbell y Campbell, 1981), el control de su crecimiento (Van Buul-Wortelboer y cols. 1986) y el metabolismo de las lipoproteínas (Davies y cols. 1985). En estos experimentos ambos tipos celulares mostraron una interdependencia que también se requiere para muchas respuestas fisiológicas de los vasos.

Todo lo previamente descrito demuestra de una manera convincente que los MEC's hacen que la íntima y la media trabajen como una unidad.

7.3 Contactos mioendoteliales y regulación del tono vasomotor

La coordinación de respuestas en la pared vascular es crítica para la modulación local del tono vasomotor y para la conservación de la homeostasis circulatoria. Debido a que el músculo liso vascular es el efector final del tono vasomotor un tema central de la investigación cardiovascular ha sido aclarar la regulación y función de las células musculares lisas vasculares. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de investigación efectuada, los mecanismos que permiten la generación de una respuesta coordinada entre las células musculares lisas en la pared vascular permanecen aun incompletamente comprendidos. De modo que, es relevante la comprensión de los principios que gobiernan la iniciación y propagación de los estímulos vasoactivos en las células musculares lisas vasculares. Christ y cols. (1996) sostienen la tesis de que además de la inervación neuronal y la excitabilidad eléctrica, la comunicación intercelular entre las células musculares de la túnica media vascular a través de uniones nexus es de primordial importancia y consideran los mecanismos mediante los cuales estos tres aspectos funcionan coordinadamente. Esto ha sido muy bien sustentado por Berry y Sosa-Melgarejo (1989) en su estudio de criofractura de las uniones nexus entre células musculares lisas vasculares de la túnica media de la aorta

torácica en ratas normales e hipertensas. En este estudio encontraron que las uniones nexus entre células musculares lisas vasculares en animales normotensos son redondas, ovales o alargadas y hubo 11.9 ± 5.8 uniones nexus por $1000 \mu\text{m}^2$ de membrana celular. En animales hipertensos, las uniones nexus fueron irregularmente más grandes que las de los animales normotensos y se observaron en un número de 30.6 ± 6.2 por $1000 \mu\text{m}^2$ de membrana celular. Con estos resultados demuestran la importancia del papel jugado por las uniones nexus como un sistema funcional acoplado eléctrica y metabólicamente en el control de la respuesta del músculo liso vascular a la tensión. Aunque Christ y cols. (1996), mencionan a los contactos entre las células endoteliales y las musculares lisas, no les dan mayor importancia y mantienen el concepto de que estos contactos corresponden a uniones nexus, no obstante los estudios detallados de Sosa-Melgarejo y cols. (1988) y Sosa-Melgarejo y Berry (1992a, 1992b, 1995) que demuestran lo contrario.

Se han identificado varios mecanismos para la activación sincicial del músculo liso vascular (Christ y cols. 1996): 1) inervación neuronal directa de cada una o de casi cada una de las células musculares lisas 2) la presencia de grupos de células musculares lisas excitables eléctricamente y 3) el movimiento pasivo de moléculas o iones como segundos mensajeros a través de uniones nexus desde células activadas directamente hasta células acopladas situadas distalmente.

El término inervación neuronal se refiere a cualquier componente del sistema nervioso autónomo que contribuye a la inervación perivascular de la vasculatura sistémica. Esto se da en la túnica adventicia. Esta inervación puede ser adrenérgica, colinérgica y no-adrenérgica, no-colinérgica. Raramente, la inervación penetra la túnica media muscular aunque se han observado excepciones (Somlyo y Somlyo, 1968; Burnstock y Relevic, 1993). Los nervios perivascuales coalescen en la interfase adventicia-túnica media muscular y forman un plexo que consiste de una extensa red de fibras terminales ramificadas. Los axones terminales son ricos en varicosidades (Burnstock y Relevic, 1993). Se supone que las varicosidades representan los sitios principales para la liberación de neurotransmisor durante la actividad neuronal. Debido a que los axones individuales pueden tener numerosas varicosidades, se espera que los impulsos que pasan a lo largo de un axón despolaricen sucesivamente una hilera de varicosidades. La inervación de los vasos más grandes difiere de la de los vasos pequeños. Las distancias neuromusculares (que tienen un rango de 50-2000 nm), así como el volumen relativo de músculo liso que es inervado por nervios perivascuales son usualmente mucho más grandes en las arterias elásticas que en las arterias musculares más pequeñas (Bevan y Torok, 1970; Burnstock y Relevic, 1993). Por lo tanto en las arterias elásticas una mayoría de las células musculares lisas pueden no ser inervadas directamente. Los patrones de inervación diferencial y las distancias neuromusculares en los vasos sanguíneos grandes y pequeños pueden tener implicaciones importantes con respecto a las distancias de difusión del neurotransmisor y a las concentraciones efectivas del neurotransmisor logradas en los sitios de los

receptores postsinápticos (Hirst y Edwards, 1989; Bevan y Torok, 1970; Gibbins y cols. 1988). Christ y cols. (1996) concluyen que la inervación neural y la activación por el neurotransmisor del músculo liso vascular proporcionan claramente un mecanismo importante para la modulación del tono vasomotor sin que haya una evidencia completa de que la sola estimulación nerviosa en ausencia de otros mecanismos, pueda activar a la mayoría de las células musculares lisas de la pared de arterias elásticas y musculares.

En esta tesis hemos estudiado tres tipos diferentes de vasos, dos arteriales (arterias coronaria y mamaria interna) y uno venoso (vena safena). En todos los especímenes estudiados, los MEC's no mostraron ninguna de las uniones intercelulares reportadas para la pared arterial tanto en condiciones normales como patológicas (Sosa-Melgarejo y Berry, 1988, 1989, 1991; Berry y Sosa-Melgarejo, 1989, 1993a, 1993b; Sosa-Melgarejo y cols. 1991). y sólo fueron observadas aposiciones simples. Al medir la distancia entre las membranas de la células que participan en un contacto mioendotelial encontramos que las medias de los espacios intercelulares varían de 13.30 a 15.03 nm, con un rango de 10.42 a 18.00 nm para los tres vasos estudiados sin que haya diferencias significativas entre ellos. Sosa-Melgarejo y cols. en estudios previos encontraron una distancia de 6.9 a 13 nm en arteriolas pequeñas de riñón humano (1988) y de 6-15 nm en aorta fetal humana (Sosa-Melgarejo y Berry, 1995). Si comparamos la distancia entre la célula endotelial y la célula muscular lisa a nivel del MEC vemos que esta distancia es mucho menor que la que se informa que

existe entre las terminaciones nerviosas de la adventicia y las células musculares lisas que reciben de ellas los estímulos nerviosos.

El endotelio juega un papel integral en el control del tono vasomotor por la síntesis de al menos tres factores vasodilatadores diferentes (prostaciclina, NO y factor hiperpolarizante derivado del endotelio) y tres vasoconstrictores (endotelina, tromboxano y enzima convertidora de angiotensina). La liberación de la prostaciclina se estimula por la fuerza de rozamiento o por mediadores endógenos como la serotonina, la bradicinina y la trombina. El NO se sintetiza en respuesta a la fuerza de rozamiento fisiológica y sustancias vasoactivas como acetilcolina, bradicinina y trombina. El factor hiperpolarizante derivado de endotelio se libera por estimulación de la célula endotelial por acetilcolina. La endotelina se libera durante el infarto agudo del miocardio, shock cardiogénico o cirugía. La acumulación de lipoproteínas de baja densidad oxidadas en placas puede incrementar la liberación de endotelina-1 y a su vez los niveles locales elevados de ella pueden contribuir al desarrollo de aterosclerosis (Shireman y Pearce, 1996).

Al integrar las contribuciones de los autores arriba mencionados concluimos que la modulación de el tono vasomotor requiere de la acción conjugada de la inervación neuronal a nivel de la interfase adventicia-músculo liso vascular y de la acción de la célula endotelial sobre las células musculares lisas de la túnica media por la liberación

de sustancias vasodilatadoras o vasoconstrictoras que actuarían a través de los contactos mioendoteliales. Esto se muestra esquemáticamente en la figura 7.1.

7.4 Contactos mioendoteliales y mecanotransducción

En un estudio reciente, Osol (1995) revisa los factores que intervienen en la mecanotransducción por el músculo liso vascular y la define como la respuesta de la célula muscular lisa (contracción, secreción, crecimiento, división) a la presión o a la elongación transmural.

El músculo liso vascular responde a las fuerzas mecánicas en una gran variedad

factores de crecimiento o colágena respectivamente) y 3) cambios en la proporción y el patrón de crecimiento y división celular (hipertrofia/hiperplasia). Estas funciones se ven afectadas por fuerzas mecánicas como la presión transmural, la tensión de la pared vascular inducida por la presión pulsátil, la tensión circunferencial y axial de la pared, la compresión radial y la fuerza de rozamiento.

Sosa-Melgarejo y cols. han estudiado los MEC's en tres situaciones distintas en que la pared vascular está sometida a fuerzas mecánicas diversas: en hipertensión en arteriolas de riñón humano (1988), en arteriosclerosis (1992b) y en aorta fetal de rata (1992a) y aorta fetal humana (1995). En su estudio de los MEC's en arteriolas de riñón humano, Sosa-Melgarejo y cols. (1988) observaron tres tipos principales: a) proyecciones citoplásmicas originándose de células endoteliales (la mayoría), b) proyecciones citoplásmicas originándose de células musculares lisas (menos comunes) y proyecciones citoplásmicas originándose de ambas células (raras). En aorta ascendente fetal humana, las proyecciones citoplásmicas de los MEC's se originan generalmente de las células musculares lisas (Sosa-Melgarejo y Berry, 1995). En este último estudio, los autores mencionados apoyan con sus resultados la importancia de los MEC's en la transducción de las fuerzas mecánicas que actúan sobre los vasos en desarrollo, determinando la naturaleza y disposición de los componentes murales. Ellos mencionan que la pared vascular está expuesta normalmente a dos fuerzas hemodinámicas principales, el shear stress que actúa principalmente en la interfase sangre-endotelio y la fuerza ténsil que actúa a través de la pared del vaso y está

relacionada directamente con la presión y el radio. En este trabajo, donde estudiamos tres tipos de vasos sometidos a distintas condiciones hemodinámicas, observamos que en la arteria coronaria los MEC's más frecuentes fueron aquellos en que las proyecciones citoplásmicas se originan a partir de ambas células, endotelial y muscular lisa. Lo mismo ocurrió en la arteria mamaria interna. En la vena safena, la mayoría de los MEC's correspondió a proyecciones citoplásmicas que se originan en la célula endotelial. Se observaron gran variedad de formas de MEC's como ya se describió en el capítulo anterior, con menor área de contacto en la vena safena.

Los resultados presentados en esta tesis, demuestran que el contacto mioendotelial juega un papel muy importante en la relación aferente-eferente que existe entre las células endoteliales y las células musculares lisas siendo el paso obligado para la mecanotransducción y pivote de esa relación (figura 7.2).

7.5 Contactos mioendoteliales y remodelación vascular

El sistema vascular sufre remodelación a lo largo de toda la vida, primero, cuando los vasos sanguíneos primitivos se forman y reorganizan; después, cuando la circulación se adapta a los requerimientos cambiantes de perfusión tisular. Investigaciones recientes que han tenido como objeto a los receptores de tirosina cinasas han esclarecido mecanismos fundamentales que están involucrados en la formación y reestructuración de los vasos sanguíneos (Cowan y Langille, 1996).

Receptores distintos para factor de crecimiento endotelial y otros receptores tirosina cinasas parecen regular aspectos muy diferentes de la formación vascular temprana incluidos la diferenciación de la célula endotelial, la formación del tubo y la diferenciación de los vasos sanguíneos en microvasculatura versus vasos grandes. En el desarrollo tardío y en la circulación adulta, la remodelación adapta las arterias a los cambios crónicos en la función hemodinámica. La transcripción de genes sensibles a fuerzas físicas ocurre por factores de transcripción previamente caracterizados que se ligan tanto a elementos responsivos establecidos como nuevos en regiones promotoras de genes relevantes. Ahora hay evidencia de que uno o más de estos factores puede regular la expresión genética en respuesta a una sola fuerza física como la fuerza de rozamiento (Cowan y Langille, 1996). Estudios recientes enfatizan el papel de la degradación de matriz y la muerte celular además de la síntesis de matriz y la proliferación celular. La importancia de la muerte celular y la degradación de matriz también se pone de relieve en la patogénesis de las enfermedades vasculares. Como resultado de estos hallazgos, el papel de la remodelación vascular se considera como un factor primario estrechamente ligado a la patogénesis de la aterosclerosis, la hipertensión y la reestenosis después de angioplastia (Sheridan y Pearce, 1996).

En su estudio Cowan y Langille (1996), concluyen que los receptores endoteliales específicos tirosina cinasas son reguladores críticos de la diferenciación de la célula endotelial y de la remodelación vascular.

Sosa-Melgarejo y cols. han estudiado los MEC's en la hipertensión (1988), en la arteriosclerosis (1992) y en el desarrollo fetal en ratas (1992a). Todos ellos implican procesos de remodelación vascular.

En su estudio sobre los MEC's en arteriolas pequeñas de riñón humano, Sosa-Melgarejo y cols. (1988) observaron material electrodensó sobre el lado citoplásmico de las membranas celulares musculares lisas involucradas en el contacto mioendotelial en los vasos hipertensivos. Ellos concluyeron que sus resultados apoyan el papel de los MEC's como sensores locales de tensión y que por lo tanto, las situaciones que implican cambios en la presión sobre la pared vascular pueden alterar la forma de la misma. Publicaciones ulteriores han confirmado sus aseveraciones: Gibbons y Dzau (1994), mencionan que los vasos hipertensivos en animales y en humanos se caracterizan por engrosamiento de la túnica media, reducción de la luz vascular y un incremento en la matriz extracelular de la pared del vaso. Estos cambios, los relacionan con disfunción endotelial caracterizada por disminución de la relajación dependiente del endotelio, expresión incrementada de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β -1 y sustancias vasoactivas locales como la angiotensina II.

El estudio de Sosa-Melgarejo y Berry (1992b) realizado en biopsias renales humanas con aterosclerosis, muestra que las células musculares lisas están separadas de las células endoteliales en los vasos ateroscleróticos por una considerable cantidad de material extracelular. Al comparar vasos control con vasos ateroscleróticos

encontraron que la separación entre la túnica íntima y la túnica media las en los vasos control fue de 0.09-0.27 micras y en los vasos ateroscleróticos fue de 1.0-2.42 micras, siendo esta diferencia, significativa. Observaron que conforme se incrementa la separación en la aterosclerosis, las proyecciones citoplásmicas del MEC se alargan, pero se conserva la estructura del mismo así como el espacio intercelular que es de 10-15 nm. En los casos de aterosclerosis avanzada, encontraron una gran zona de detritus necróticos entre la capa de células endoteliales y la capa de células musculares lisas y en estos casos el único signo de un MEC antiguo fue la presencia de una proyección citoplásmica a mitad del área de necrosis. Su estudio sugiere que el límite más allá del cual se pierde el contacto mioendotelial es cuando la separación entre ambas túnicas alcanza una magnitud de 2.42 micras.

Si se considera toda la serie de sustancias a través de las cuales la célula endotelial actúa sobre la célula muscular lisa, además del papel del MEC como sensor local de tensión y en la mecanotransducción es obvia la trascendencia que tiene para el buen funcionamiento de la pared vascular, la pérdida de contactos entre ambos tipos de células. Además, otros estudios (Gibbons y Dzau, 1994; Osol, 1995; Shireman y Pearce, 1996) sugieren un papel preponderante de la célula endotelial y por consiguiente, del contacto mioendotelial en la génesis de la aterosclerosis. El concepto de un funcionamiento alterado del endotelio como iniciador del proceso de la enfermedad ha empezado a ganar terreno después de informes de que la disfunción endotelial puede ocurrir previamente a cualquier engrosamiento apreciable de la túnica

intima y esto se ha hecho ya evidente en pacientes con historia familiar de aterosclerosis. Esto se ha asociado con una aparente disminución en la producción del vasodilatador NO. La naturaleza de la disfunción endotelial resultante en una atenuación de las respuestas mediadas por óxido nítrico no se conoce, pero se sugieren como posibilidades: disminución del sustrato, disminución de la expresión de la sintasa de óxido nítrico, desequilibrio entre la producción de los factores de constricción y de relajación derivados del endotelio, producción de un inhibidor endógeno de la sintasa de óxido nítrico y sobreproducción de radicales libres derivados de oxígeno (Busse y Fleming, 1996). También se ha sugerido el papel del endotelio en la iniciación de la aterogénesis por regulación de la infiltración de células mononucleares a través de la expresión de moléculas de adhesión y factores quimioattractantes selectivos, así como por la secreción de factores de crecimiento autócrino-parácrinos (Gibbons y Dzau, 1994; Shireman y Pearce, 1996).

En su estudio acerca de los MEC's en aortas torácicas fetales de rata, Sosa-Melgarejo y Berry (1992a) demostraron la presencia de los mismos desde el desarrollo temprano. Cowan y Langille (1996), muestran que desde estas etapas el sistema vascular sufre remodelación, misma que implica respuestas a factores hemodinámicos y metabólicos para adaptarse a demandas variables de requerimientos de perfusión tisular. El estudio mencionado de Sosa-Melgarejo y Berry (1992a) resalta la importancia de los contactos mioendoteliales para participar en estos eventos desde las edades tempranas al descubrir su presencia bien definida en la etapa fetal.

En esta tesis, en que estudiamos la microarquitectura de las arterias coronaria, mamaria interna y vena safena nosotros también ponemos de relieve la importancia de los contactos mioendoteliales para la comunicación de la célula endotelial hacia la célula muscular lisa cuyas actividades dirige. Encontramos que además de los MEC's que habitualmente se establecen entre una sola célula endotelial y una sola muscular lisa, hay variaciones en que una célula endotelial establece contacto con dos células musculares lisas y en ocasiones varias células endoteliales hacen contacto con una sola célula muscular lisa. Esto tiene importancia en procesos patológicos de remodelación vascular como la aterosclerosis. En esta, al romperse un MEC por la presencia de una placa aterosclerótica, es factible que la misma célula endotelial conserve uno de sus MEC's a través del cual envíe señales a la célula muscular lisa, o que una célula muscular lisa que ha perdido contacto con una célula endotelial, reciba señales de otra célula endotelial con la que se haya conservado el MEC. Cowan y Langille (1996), además de otros autores ya mencionados (Rhodin, 1967; Spagnoli y cols. 1982; Taugner y cols. 1984) sugieren que la naturaleza de estos contactos corresponde a uniones nexus o uniones por hendidura, naturaleza que como ya se discutió ampliamente no concuerda con los estudios realizados en este trabajo donde encontramos únicamente aposiciones simples sin especialización de las membranas celulares que participan en el contacto ni del citoplasma subyacente a las mismas, lo cual está de acuerdo con los estudios previamente mencionados de Sosa-Melgarejo y Berry (1992a, 1992b, 1995) y Sosa-Melgarejo y cols. (1988).

7.6 Contactos mioendoteliales y cirugía de revascularización coronaria (bypass)

Las propiedades específicas de la pared vascular de los vasos sanguíneos empleados como bypass coronario juegan un papel importante en el comportamiento a corto y largo plazo de estos conductos. La heterogeneidad de funciones de las células endoteliales y musculares lisas en vasos distintos puede asignarle a vasos específicos propiedades que favorecerán su uso como conductos de bypass. Dzimir y cols. (1996) discuten cómo varía la reactividad vascular de los diversos conductos vasculares utilizados en cirugía de bypass aorto-coronario y las implicaciones clínicas de sus hallazgos en términos de modulación de flujo en respuesta a mediadores vasoactivos tanto fisiológicos como exógenos así como de viabilidad a largo plazo. Aquí se ve claramente que además de todos los aspectos ya considerados se le da gran importancia a la localización del vaso sanguíneo dentro del árbol vascular y por lo tanto al hecho de si se trata de un vaso arterial o venoso.

Previamente Barner (1994) realizó una revisión de los vasos alternativos utilizados para cirugía de bypass tales como la arteria radial, la arteria gastroepiploica y la arteria epigástrica inferior, además de los vasos usualmente empleados, la vena safena y la arteria mamaria interna. Todos estos estudios muestran la inquietud por encontrar el conducto vascular idóneo para este tipo de cirugía y la necesidad de conocer con más detalle la estructura y funcionamiento de los vasos sanguíneos

utilizados tanto en condiciones normales como patológicas. Siendo el MEC la estructura que regula las funciones de los diferentes elementos que constituyen la pared vascular es de primordial importancia el conocimiento de su presencia, morfología, distribución y densidad en los distintos vasos mencionados.

Con estos datos hemos demostrado cómo los MEC's, en las arterias coronarias, mamaria interna y vena safena se encuentran en un sitio crucial dentro de la encrucijada de eventos biofísicos y bioquímicos que regulan el funcionamiento de la pared vascular.

El uso de vena safena como bypass aortocoronario fue desarrollado por De Bakey en los 1960s y mejorado en los 1970s. Esto ayudó dramáticamente a modificar el manejo de los pacientes con enfermedad cardíaca isquémica. Sin embargo, el papel de estos injertos permanece en controversia a pesar de numerosos ensayos clínicos (Virmani y cols. 1991). La utilización de la arteria mamaria interna fue introducida por Kolesov (1967) y usada rutinariamente por Green (1968). Sin embargo, no fue hasta mediados de la década de los 1980s en que se acumularon datos que mostraban la ventaja clínica de la arteria mamaria interna sobre la vena safena en términos de ocurrencia de eventos isquémicos tales como: angina, infarto, hospitalización y reintervención para angioplastia. Sin embargo, en contraste con la vena safena, los conductos arteriales son más difíciles de obtener, se dañan más fácilmente por su mayor fragilidad y tamaño más pequeño y sufren con mayor frecuencia vasoespasmo o

error técnico, lo cual puede resultar en oclusión o hipoperfusión miocárdica (Barner, 1994). El uso de injertos venosos autólogos es en la actualidad un procedimiento quirúrgico común. Es también un experimento biológico interesante, puesto que después del trasplante, la vena está sujeta a fuerzas físicas que son totalmente de carácter arterial. Muchos estudios han documentado las alteraciones estructurales en el tiempo, de la pared venosa. Brevemente, los cambios histológicos incluyen áreas de descamación endotelial, edema de la media y necrosis de músculo liso vascular. Con el tiempo (semanas a meses), se hace evidente un engrosamiento o hiperplasia de la íntima, con proliferación y migración de células musculares lisas, así como cambios en la vascularización y la inervación. El espesor de la media no varía de manera notoria, debido a que conforme esta túnica sufre una transformación fibrosa con depósito de colágena, hay una disminución relativa en el número de células musculares lisas. Los cambios funcionales en segmentos de bypasses venosos de animales incluyen una disminución progresiva en la sensibilidad vasoconstrictora a la norepinefrina y un incremento sostenido en la sensibilidad a la serotonina. También se ha observado una reactividad vascular y actividad miogénica aumentadas en los injertos de vena safena (Osol, 1995).

Las controversias anteriormente descritas nos llevaron a seleccionar para su estudio ultraestructural a la arteria coronaria y a los vasos más comúnmente usados en la cirugía de bypass: la arteria mamaria interna y la vena safena. Este estudio pretende aportar nuevos elementos de juicio para seleccionar el vaso más adecuado para este

tipo de cirugía. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y descritos en el capítulo correspondiente, el vaso sanguíneo más similar a la arteria coronaria es la vena safena, debido a que cuenta con una densidad de contactos mioendoteliales en promedio de 71.20 contactos por mm de longitud estudiada, con un rango de 50-110 por mm, más similar a la densidad de la arteria coronaria con un promedio de 42 contactos por mm de longitud estudiada. La arteria mamaria interna mostró una densidad de contactos muy inferior a la de los otros vasos estudiados con un promedio de 2.10 contactos por mm de longitud estudiada. Surge la pregunta de cuál es la razón de que un vaso venoso sea más semejante ultraestructuralmente a la arteria coronaria y para intentar contestarla, resultará útil recordar brevemente algunos aspectos de la embriogénesis de las arterias coronarias. Como se mencionó ya en la introducción de esta tesis, en el área cardiogénica se forma inicialmente por la tercera semana el tubo cardíaco primitivo que será el futuro corazón. Hacia la cuarta semana se forman acúmulos de células mesenquimales llamadas islotes sanguíneos los cuales pronto se transforman en un plexo vascular que se extiende sobre las diversas estructuras embrionarias incluido el epicardio del tubo cardíaco primitivo como vasos adventiciales tipo vasa vasorum. Para el final de la sexta semana, las arterias coronarias se han desarrollado como brotes endoteliales que emergen del lado derecho e izquierdo de este tubo cardíaco primitivo.

Estos nuevos vasos se fusionan con el plexo superficial original y así se forma el patrón de la circulación coronaria (Corliss, 1984). Estos conocimientos de que las

arterias coronarias se desarrollan como vasa vasorum del corazón, tal vez nos expliquen el hecho de que la vena safena muestre mayor semejanza ultraestructural a la arteria coronaria que la arteria mamaria interna como podría esperarse.

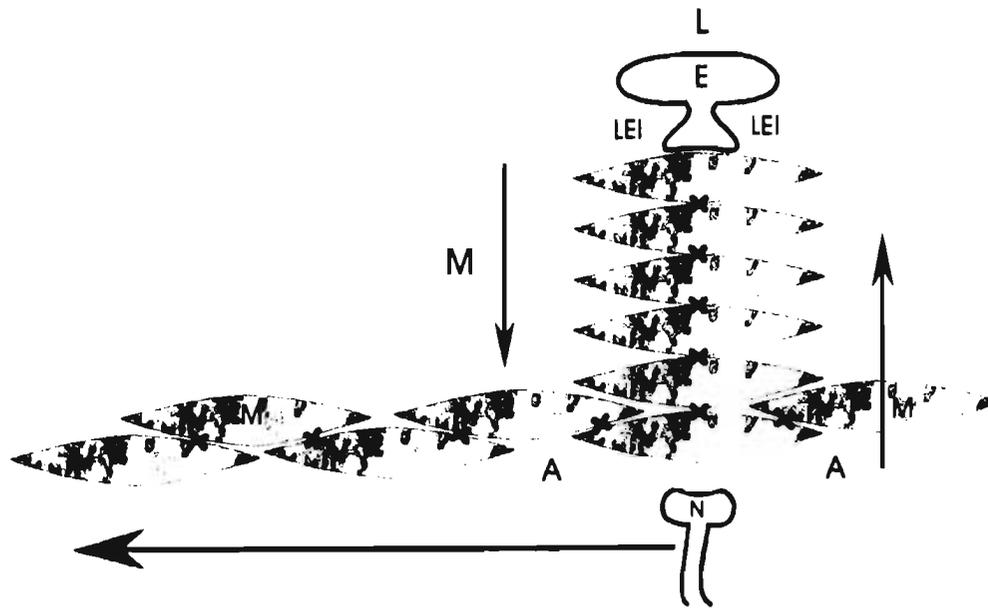


Figura 7.1 Descripción gráfica de las características estructurales de la pared vascular en un corte longitudinal. La túnica media (M) formada por varias capas de células musculares lisas está separada del endotelio (E) por la lámina elástica interna (LEI). Cerca de la superficie celular del músculo liso que está hacia el lado de la adventicia (A) se observa una terminación neuronal (N). Las flechas que se inician en la adventicia indican el sentido de la propagación del estímulo nervioso longitudinal y transversalmente a través de las uniones nexus (x). Por el lado de la superficie luminal (L), se observa un MEC a través del cual, la célula endotelial envía señales diversas (flecha) a la célula muscular lisa y la actividad se propaga al resto de la musculatura también a través de uniones nexus (Modificado de Christ y cols. 1996).

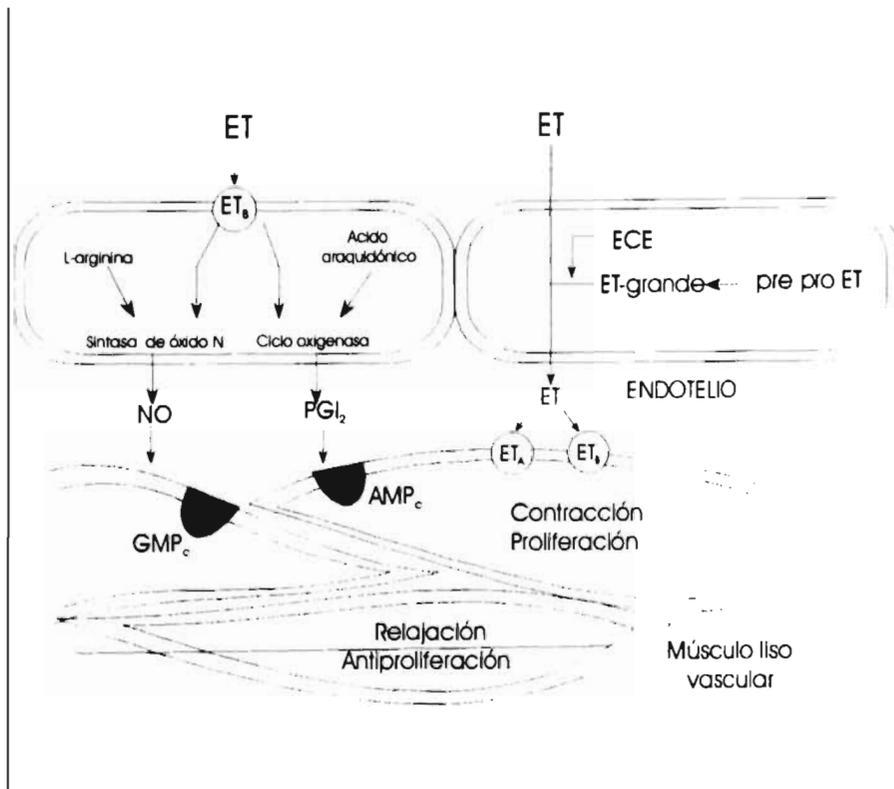


Figura 7.2 Esquema de la relación aferente-eferente de la célula endotelial respecto a la célula muscular lisa vascular en que se muestra la interacción de la endotelina (ET) y sus receptores. Los receptores ET_A y ET_B en músculo liso median la contracción y la proliferación muscular. Los receptores ET_B en la célula endotelial están relacionados con la formación de NO y prostaciclina PGI₂. Estos mediadores son responsables de la vasodilatación a través del incremento de GMP_c y AMP_c. (Modificado de Lüscher, 1993).

CAPITULO 8
CONCLUSIONES

La fijación de las muestras con glutaraldehído y su postfijación con tetróxido de osmio dio una buena preservación de los especímenes para el estudio de los MEC's con microscopía electrónica de transmisión.

Se demostró la presencia de contactos mioendoteliales en las arterias coronaria, mamaria interna y vena safena de ratas Sprague-Dawley y se demostró que la naturaleza de estos contactos corresponde en todos los casos a aposiciones simples.

El espacio intercelular para los MEC's en los tres vasos sanguíneos estudiados no mostró diferencias significativas entre ellos.

Se describió por primera vez la presencia de fascículos musculares en la túnica media de la vena safena.

El vaso sanguíneo con mayor densidad de MEC's fue la vena safena.

El vaso sanguíneo con menor densidad de MEC's fue la arteria mamaria interna.

Desde el punto de vista de los MEC's el vaso sanguíneo más parecido ultraestructuralmente a la arteria coronaria es la vena safena.

Todo vaso sanguíneo que se desee utilizar como un bypass coronario debe ser sometido a un estudio detallado de los MEC's mediante microscopía electrónica de transmisión.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Anderton BH (1981) Intermediate filaments: a family of homologous structures. *J Muscle Res Cell Motil* 2:141-166.

Avers CJ (1991) *Biología Celular*, 2a.edición, Grupo Editorial Iberoamérica, México, p 155-156.

Aydin F, Roseblum WI, Povlishock JT (1991) Myoendothelial junctions in human brain arterioles. *Stroke* 22:1592-1597.

Bayliss WM (1902) On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol (Lond)* 28:220-231

Barner HB (1994) Arterial conduits for coronary bypass. *Coron Art Dis* 5:799-802.

Bauriedel G, Kandolf R, Schluckebier S, Welsch U (1996) Ultrastructural characteristics of human atherectomy tissue from coronary and lower extremity arterial stenosis. *Am J Cardiol* 77:468-474.

Berry CL (1989) Organogenesis of the arterial wall. In: *Diseases of the arterial wall: Camilleri JP, Berry CL, Fiessinger JN, Bariety J (Eds). Springer-Verlag, London, p 55-70.*

Berry CL, Looker T and Germain J (1972) Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta. *J Pathol*, 108:265-274.

Berry CL, Sosa-Melgarejo JA (1989) Nexus junctions between vascular smooth muscle cells in the media of the thoracic aorta in normal and hypertensive rats. A freeze-fracture study. *J Hypert* 7:507-513.

Berry CL, Sosa-Melgarejo JA (1993a) Structure and function of the arterial system in hypertension. In: *Hypertension and the arterial system with pathophysiology and therapeutical implications*, Safar M, O'Rourke MF (Eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, p 55-72.

Berry CL, Sosa-Melgarejo JA, Greenwald SE (1993b) The relationship between wall tension, lamellar thickness and intercellular junctions in the fetal and adult aorta; its relevance to the pathology of dissecting aneurysm. *J Pathol* 169:15-20.

Biava CG, West M (1966) Fine structure of normal human juxtaglomerular cells. Y. General structure and intercellular relationships. *Am J Pathol* 49:679-721.

Bevan JA, Torok J (1970) Movement of norepinephrine through the media of rabbit aorta. *Circ Res* 27:325-331.

Burnstock G, Relevic V (1993) Neural-Endothelial Interactions in the Control of Local Vascular Tone. Austin Tex: RG Landes Co.

CastellotJJ, Vhoay J, Lormeau J-C, Petitou M, Sache E, Karnovsky MJ (1986) Structural determinants of the capacity of heparin to inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells. II. Evidence for a pentasaccharide sequence that contains a 3-O-sulfate group. J Cell Bio 102:1979-1984.

Chait A, Ross R, Alberts JJ, Bierman EL (1980) Platelet-derived growth factor stimulates activity of low density lipoprotein receptors. Proc Natl Acad Sci USA 77:4084-4088.

Chamley-Campbell JH, Campbell GR (1981) What controls smooth muscle phenotype? Atherosclerosis 40:347-357.

Chen K, Wight TN (1984) Proteoglycans in arterial smooth muscle cell cultures: an ultrastructural histochemical analysis. J Histochem Cytochem 32:347-357.

Christ GJ, Spray DC, El-Sabban M, Moore LK, Brink PR (1996) Gap junctions in vascular tissues: Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotore tone. Cir Res 79:631-646.

Clark JM, Glagov S (1979) Structural integration of the arterial wall. 1. Relationships and attachments of medial smooth muscle cells in normally distended and hyperdistended aortas. *Lab Invest* 40:587-602.

Corliss CE (1984) Embriology of blood circulation. In: Abramson DI, Dobrin PB (Edits): *Blood Vessels and Limphatics in Organ Systems*. Academic Press Inc (London), p 362-363.

Cowan DB, Langille BL (1996) Cellular and molecular biology of vascular remodeling. *Current Opinion in Lipidol* 7:94-100.

Cowin P, Kapprell H-P, Franke WW (1985) The complement of desmosomal plaque proteins in differents cell types. *J Cell Biol* 101:1442-1454.

Davies PF (1986) *Biology of disease: vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis*. *Lab Invest* 55:5-24.

Davies PF, Ganz P, Diehl PS (1985) Reversible microcarrier-mediated junctional communication between endothelial and smooth muscle cell monolayers: an in vitro model of vascular cell interactions. *Lab Invest* 85:710-718.

Devine CE, Somlyo AP (1971) Thick filaments in vascular smooth muscle. *J Cell Biol* 49:636-649.

Dewey MM, Barr L (1962) Intercellular connection between smooth muscle cells: the nexus. *Science* 137:670-672.

Di Corletto PE, Bowen-Pope DF (1983) Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1919-1923.

Dohi Y, Lüscher TF (1991) Endothelin-1 in hypertensive resistance arteries: intraluminal extraluminal dysfunction. *Hypertension* 18:543-549.

Durante W, Liao L, Iftikhar Y, O'Brien WE, Schafer AI (1996) Differential regulation of L-arginine transport and nitric oxide production by vascular smooth. *Cir Res* 78:1075-1082.

Dzimiri N, Chester AH, Allen SP, Duran C, Yacoub MH (1996) Vascular reactivity of arterial coronary artery bypass grafts: implications for their performance. *Clin Cardiol* 19 (3):165-171.

Ferro CJ, Webb DJ (1996) The clinical potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular medicine. *Drugs* 51(1):12-27.

Fritze LMS, Reilly CF, Rosenberg RD (1985) An antiproliferative heparan sulfate species produced by postconfluent smooth muscle cells. *J Cell Biol* 100:1041-1049.

Furchgott RF, Zawadzky JV(1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.

Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, Chastonay C, Vanderkerckhove J, Weber K, Franke WW (1991) Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:298-302.

Gabella G (1984) Structural apparatus for force transmission in smooth muscle cells. *Physiol Rev* 64:455-477.

Geiger B, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ (1980) Vinculin an intracellular protein localized at specialized sites where microfilaments bundles terminate at cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4127-4131.

Gerrity RG, Adams EP, Cliff WJ (1975) The aortic tunica of the developing rat. II. Incorporation by medial cells of 3H-proline into collagen and elastin: autoradiographic and chemical studies. *Lab Invest* 32:585-600.

Gibbins IL, Morris JL, Furness JB, Costa M (1988) Innervation of systemic blood vessels. In: Burnstock G, Griffith SG, eds. Noradrenergic Innervation of Blood Vessels. Boca Raton, Fla: CRC.

Gibbons GH, Dzau VJ (1994) The emerging concept to vascular remodeling. *N Engl J Med* 330:1431-1438.

Glagov, S (1994) Intimal hyperplasia, vascular modeling, and the restenosis problem. *Circulation* 89:2888-2891.

Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS (1979) Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279:679-685.

Gonnerman WA, Ferrara R, Franzblau C (1981) Measurement of medium lysyl oxidase activity in aorta smooth muscle cells. Effects of multiple medium changes and inhibition of protein synthesis. *Biochemistry* 20:3864-3867.

Green GE, Stertzer SH, Reppert EH (1968) Coronary arterial bypass grafts. *Ann Thorac Surg* 5:443-450.

Griendling KK, Alexander RW (1996) Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J* 10:283-292.

Grünwald J, Robenek H, Mey J, Hauss WH (1982) In vivo and in vitro cellular changes in experimental hypertension. Electronmicroscopic and morphometric studies of aortic smooth muscle cells. *J Exp Mol Path* 36:164-176.

Henderson RM (1975a) Cell to cell contacts. In: *Methods in Pharmacology, Vol 3; Smooth muscle*. Daniel EE, Paton DM (Eds). Plenum Press, New York, p 47-77.

Henderson RM (1975b) Types of cell contacts in arterial smooth muscle. *Experientia* 31:103-105.

Hirst GDS, Edwards FR (1989) Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 69:546-604.

Hüttner Y, Gabbiani G (1982) Vascular endothelium: recent advances and unanswered questions. *Lab Invest* 47:409-411.

Jacobson NO, Jorgensen F, Thomsen °AC (1966) An electron microscopic study of small arteries and arterioles in the normal human kidney. *Nephron* 3:17-39.

Johnson PC (1980) The myogenic response. In: Handbook of physiology; section II. The cardiovascular system; vol 2: Vascular smooth muscle. Am Physiol Soc, Bethesda, Maryland. p 409-442.

Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J Cell Bio 88:473-485.

Kolesov VI (1967) Mamary artery coronary artery anastomosis as treatment for angina pectoris. J Thorac Cardiovasc Surg 54:535-539.

Kristek F, Gerová M (1992) Myoendothelial relations in the conduit coronary artery of the dog and rabbit. J Vasc Res 29:29-32.

Langman J (1981) Derivatives of mesodermal germ layer. In: Medical embryology. Langman J (De). Williams and Wilkins. Baltimore, London. p 59-64.

Lazarides E (1980) Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature 283:249-256.

Lethias C, Labourdette L, Willems R, Comte J, Herbage D (1996) Composition and organization of the extracellular matrix of vein walls: collagen networks. Int Angiol 15(2):104-113.

Lowenstein CJ, Dinerman LJ, Snyder H (1994) Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120:227-237.

Lüscher TF (1993) Do we need endothelin antagonists? *Cardiovasc Res* 27:2089-2093.

Lüscher TF, Diedrich D, Siebenmann R (1988) Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 319:462-467.

Michel RP, Hu F, Meyrick BO (1995) Myoendothelial junctional complexes in postobstructive pulmonary vasculopathy: A quantitative electron microscopic study. *Exp Lung Res* 21:437-452.

Moncada S, Herman AF, Higgs EA, Vane JR (1977) Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall: an explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 11:323-344.

Mulvany MJ, Aalkjaer C (1990) Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 70:921-961.

Muir L, Bornstein WP, Ross R (1976) A presumptive subunit of elastic fiber microfibrils secreted by arterial smooth muscle cells in culture. *Eur J Biochem* 64:105-114.

Nachman R, Levine R, Jaffe EA (1977) Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megacaryocytes. *J Clin Invest* 60:914-921.

Narayanan S, Sandeberg LB, Ross R, Layman DL (1976) The smooth muscle cell. III. Elastin synthesis in arterial smooth muscle cell culture. *J Cell Biol* 68:411-419.

O'Donohoe MK, Schwartz LB, Radic ZS, Mikat EM, McCann RL, Hagen PO (1991) Chronic ACE inhibition reduces intimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Surg* 214:727-732.

Osol G (1995) Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 32:275-292.

Palade GE (1952) A study of fixation for electron microscopy. *J Exp Med* 95:285-298.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.

Pease DC, Paule WJ (1960) Electron microscopy of elastic arteries: the toracic aorta of the rat. *J Ultrastruct Res* 3:469-483.

Pease DC, Molinari S (1960) Electron microscopy of muscular arteries: pial vessels of the cat and monkey. *J Ultrastruct Res* 3:447-468.

Quiroz-Gutiérrez F (1977) *Tratado de Anatomía Humana, Tomo II*, Edit Porrúa, México, p 36-39.

Rawn, JD (1989) *Bioquímica, Vol II*, Edit Interamericana, México, p 1077.

Rhodin JAG (1962) Fine structure of vascular walls in mammals. *Physiol Rev* 42 (suppl V):48-81.

Rhodin JAG (1967) The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. *J Ultrastruct Res* 18:181-123.

Rhodin JAG (1988) Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules and small collecting veins. *J Ultrastruct Res* 25-452-500.

Robinson JM, Okada T, Castellot JJ Jr, Karnovsky MJ (1986) Unusual lysosomes in aortic smooth muscle cells: presence in living and rapidly frozen cells. *J Cell Biol* 102:1615-1622.

Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ (1992) *Histología*, 2a. edición, Edit Médica Panamericana, p 279-285.

Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.

Shireman PK, Pearce WH (1996) Endothelial cell function: Biologic and physiologic functions in health and disease. *AJR* 166:7-13.

Somlyo AP (1983) Ultrastructure of vascular smooth muscle. In: *Handbook of physiology, section 2: the cardiovascular system, vol II: vascular smooth muscle*. Bohr DF, Somlyo AP, Sparks HV (Eds). American Physiological Society, Bethesda, p 33-67.

Somlyo AP, Somlyo AV (1968) Vascular smooth muscle, I: normal structure, pathology, biochemistry and biophysics. *Pharmacol Rev* 20:197-283.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1987) In vitro demonstration of a complicated atherosclerosis-like lesion. *Br J Exp Path* 68:687-693.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1988) Intercellular contacts in tumours of the vascular smooth muscle cells in man. *Virchows Archiv A* 413:373-380.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL, Dodd S (1988) Myoendothelial contacts in the small arterioles of human kidney. *Virchows Archiv A* 413:183-187.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1989) Contacts relationships between vascular smooth muscle cells. An in vivo and in vitro study. *J Pathol* 157:213-217.

Sosa-Melgarejo JA (1991) The function of intercellular contacts in vascular smooth muscle cells. Thesis of Doctor of Philosophy. Faculty of Medicine, University of London.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1991) Intercellular contacts in the media of the thoracic aorta of rat fetuses treated with beta-aminopropionitrile. *J Pathol* 164:159-165.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL, Robinson NA (1991) Effects of hypertension on the intercellular contacts between smooth muscle cells in the rat thoracic aorta. *J Hypert* 9:475-480.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1992a) Myoendothelial contacts in the thoracic aorta of rat fetuses. *J Pathol* 166:311-316.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1992b) Myoendothelial contacts in arteriosclerosis. *J Pathol* 167: 235-239.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1995) Myoendothelial contacts in the human fetal aorta. *Arch Med Res* 26(4):431-435.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1996a) Vascular smooth muscle cells cultured on elastin membranes. *Arch Med Res* 27(1):77-82.

Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1996b) Cell to stroma contacts in the tunica media of the hypertensive rat thoracic aorta. *Arch Med Res* 27(2):123-126.

Spagnoli LG, Villaschi S, Neri L, Palmieri G (1982) Gap junction in myo-endothelial bridges of rabbit carotid arteries. *Experientia* 38:124-125.

Svendsen E, Austarheim AMS, Haugen B, Dalen H, Dregelid E (1990) Myoendothelial junctions in human saphenous veins. *Acta Anat* 138:150-153.

Taugner R, Kirchheim H, Forssman WG (1984) Myoendothelial contacts in glomerular arterioles and in renal interlobular arteries of rat, mouse and tupaia belangeri. *Cell Tiss Res* 235:319-325.

Thyberg J, Nilsson J, Palmberg L, Sjolund M (1985) Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype. *Cell Tissue Res* 239:69-74.

Van Buul Bortelboer MF, Brinkman HJM, Dingemans KP, De Groot PG, Van Aken WG, Mourik JA (1986) Reconstitution of the vascular wall in vitro. *Exp Cell Res* 162:151-158.

Virmani R, Atkinson JB, Forman MB (1991) Aortocoronary Bypass Grafts and Extracardiac conduits. In: *Cardiovascular Pathology: Chapter 42*; Silver MD (Ed). Churchill Livingstone, London, Vol 2, second edition, p 1607-1647.

Wagner DD, Olmstead JB, Marder VJ (1982) Immunolocalization of Von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 95:355-360.

Walker LN, Bowen-Pope DF, Ross R, Reidy MA (1986) Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7311-7315.

Williams LT, Tremble P, Antoniades HN (1982) Platelet-derived growth factor binds specifically to receptors on vascular smooth muscle cells and the binding become nondissociable. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5867-5870.

Wilson JG (1959) Embriology of the heart and mayor vessels. In: Cardiology, Volume 1.

Luisada AA. McGraw-Hill, New York, p 3-19.

Wolinsky H, Glagov S (1967a) A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res* 20:99-111.

Wolinsky H, Glagov S (1967b) Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res* 20:409-421.

Wong LC, Langille, BL (1996) Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries. *Circ Res* 78:799-805.

Wu-Wong JR, Chiou WJ, Huang ZJ, Vidal MJ, Opgenorth TJ (1994) Endothelium receptors in human smooth muscle cells: antagonist potency differs on antagonist-evoked responses. *Am J Physiol* 267:C1185-C1195.

Yamada KM (1983) Cell surface interactions with extracellular materials. *Ann Rev Biochemical* 52:761-799.

Yamauchi A, Burnstock G (1969) Postnatal development of the innervation of the mouse vas deferens. A fine structural study. *J Anat* 104:17-32.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415.

Yang R, Thomas RG, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H (1996) Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:838-844.

Yang Z, Richard V, von Segesser L (1990) Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries: a new mechanism of vasospasm? *Circulation* 82:188-95.