

Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas

J.A. Páramo, I. Montero, J.A. Rodríguez y J. Orbe

Laboratorio de Aterosclerosis. Área de Fisiopatología Cardiovascular. Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA). Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra. España.

Las metaloproteasas son una familia de endopeptidasas que degradan proteínas de la matriz extracelular y desempeñan un papel importante en diversos procesos fisiológicos (p. ej., cicatrización de heridas) y patológicos, como cáncer, angiogenia y aterosclerosis. Existen evidencias experimentales y clínicas que sugieren que las metaloproteasas son relevantes en el remodelado vascular y degradación de la placa fibrosa, que complican la evolución de los pacientes con aterosclerosis al favorecer la trombosis y la formación de aneurismas. Se ha observado en arterias humanas un diferente patrón de expresión de metaloproteasas según el tipo de lesión aterosclerótica y del lecho vascular implicado. Asimismo, se ha encontrado un aumento de metaloproteasas en la circulación de pacientes con síndromes coronarios. Estudios experimentales indican que la inhibición de las metaloproteasas puede ser importante en la estabilización de la placa de ateroma y constituir nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de la aterosclerosis.

Palabras clave:

Metaloproteasas. Matriz extracelular. Aterosclerosis.

METALLOPROTEASES IN ATHEROSCLEROSIS: PATHOPHYSIOLOGIC AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS

Metalloproteases (MMPs) constitute a family of endopeptidases which break down extracellular

Correspondencia: Dr. J.A. Páramo.
Servicio de Hematología. Laboratorio de Aterosclerosis.
Universidad de Navarra. Irúnlarrea, 1. 31080 Pamplona. Navarra. España.
Correo electrónico: japaramo@unav.es

Recibido el 7 de enero de 2004 y aceptado el 26 de enero de 2004.

matrix proteins and play an important role in different physiologic (wound scarring) and pathologic processes such as cancer, angiogenesis and atherosclerosis.

Experimental and clinical evidence suggests that MMPs are important in vascular remodeling and fibrous plaque breakdown which complicate the evolution of patients with atherosclerosis by favoring thrombosis and aneurysm formation. A different MMP expression pattern depending on the type of atherosclerotic lesion and vascular bed involved has been observed in human arteries. Similarly, an increase in MMPs has been found in the bloodstream of patients with coronary syndromes. Experimental studies indicate that MMP inhibition may be important in atheromatous plaque stabilization and constitute new therapeutic targets in atherosclerosis management.

Key words:

Metalloproteases. Extracellular matrix. Atherosclerosis

Introducción

Es cada vez más evidente que alteraciones de la estructura y la composición de la matriz extracelular (MEC) desempeñan un papel clave en el proceso aterogénico. Lejos de ser una estructura estática, la MEC es un medio dinámico sometido a un continuo proceso de remodelado que afecta de un modo importante a su actividad funcional. En este sistema desempeñan un papel clave las metaloproteasas (MMP), enzimas especializadas en diversos procesos fisiológicos y patológicos, como cicatrización de las heridas, angiogenia y cáncer, pero también en el desarrollo y las complicaciones de enfermedades cardiovasculares de naturaleza aterotrombótica¹⁻⁵.

Tabla 1. Características y especificidad de las principales metaloproteasas (MMP)

MMP (tipo)	Denominación	Sustrato MEC	Sustrato no MEC
Colagenasas			
MMP-1	Colagenasa-1	Colágenos I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos, tenascina, entactina	α 1-AT, IL-1 β , pro-TNF, IGFBP-3, MMP-2, MMP-9
MMP-8	Colagenasa-2	Colágenos I, II, III, V, VIII y X, gelatina, aggrecan	α 1-AT, α 2-AP, fibronectina
MMP-13	Colagenasa 3	Colágenos I, II, III, IV, IX, X y XIV, gelatina, tenascina, fibronectina, aggrecan, osteonectina	MMP-9, PAI-2
Gelatinasas			
MMP-2	Gelatinasa A	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, aggrecan, versican, osteonectina, proteoglicanos	IL-1 β , α 1-PI, MMP-1, MMP-9, MMP-13
MMP-9	Gelatinasa B	Colágenos IV, V, VII, X, XIV, gelatina, elastina, aggrecan, versican, proteoglicanos, osteonectina	α 1-AT, IL-1 β , plasminógeno
Estromalisinas			
MMP-3	Estromalisina-1	Colágenos III, IV, V y IX, gelatina, aggrecan, versican, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, laminina, osteonectina	α 1-AT, ATIII, ovostatina, IL-1 β , amiloide A, IGFB-3, fibrinógeno, plasminógeno, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-13
MMP-10	Estromalisina-2	Colágenos III, IV, V, gelatina, caseína, aggrecan, elastina, proteoglicanos	MMP-1, MMP-8
MMP-11	Estromalisina-3	Caseína, laminina, fibronectina, gelatina, colágeno IV, transferrina	α 1-AT, caseína, IGFB-1
Tipo membrana			
MMP-14	MT1-MMP	Colágenos I, II y III, caseína, elastina, fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos, laminina, entactina	α 1-AT, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Tenascina, fibronectina, laminina	MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina	MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	ND	MMP-2
MMP-24	MT5-MMP	ND	MMP-2
MMP-25	MT6-MMP	ND	MMP-2
Otras			
MMP-7	Matrilisina	Colágenos IV y X, gelatina, aggrecan, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entactina, tenascina, caseína transferrina, integrina β_4 , osteonectina, elastina	MMP-1, MMP-2, MMP-9, plasminógeno, α 1-AT
MMP-12	Metaloelastasa	Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, laminina, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, entactina	α 1-AT, fibrinógeno y fibrina, plasminógeno, mielina
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina	ND
MMP-23A	MMP-21	ND	ND
MMP-23B	MMP-22	ND	ND
MMP-26	Matrilisina 2	Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina, caseína	MMP-9
MMP-27	ND	ND	ND
MMP-28	Epilisina	Caseína	ND

MEC: matriz extracelular; α 1-AT: α -1-antitripsina; ATIII: antitrombina; IGFB: factor de crecimiento similar a la insulina; PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; ND: no determinado.

Las MMP forman una familia de endopeptidasas dependientes del cinc, producidas por diversos tipos celulares, endoteliales, musculares lisas y monocitos, que degradan numerosos componentes de la MEC, así como otras proteínas no relacionadas^{6,7}. Las MMP son sintetizadas y secretadas como proenzimas inactivas, y poseen un dominio propeptídico rico en cisteínas, capaz de ligar Zn⁺⁺ al dominio catalítico, lo que conlleva inactivación de la enzima^{8,9}.

Se clasifican en subgrupos basados en su estructura, especificidad por el sustrato y unión a membranas (tabla 1): colagenasas (MMP-1, 8 y 13), estromalisinas (MMP-3, 10 y 11), gelatinasas (MMP-2 y 9), tipo membrana (MT-MMP) y otras MMP (matrilisina, metaloelastasa, etc.)^{7,9,10,11}. La actividad de las MMP está regulada intra y extracelularmente en 3 ámbitos: transcripcional, postranslacional y a través de interacción con inhibidores específicos. Diversos

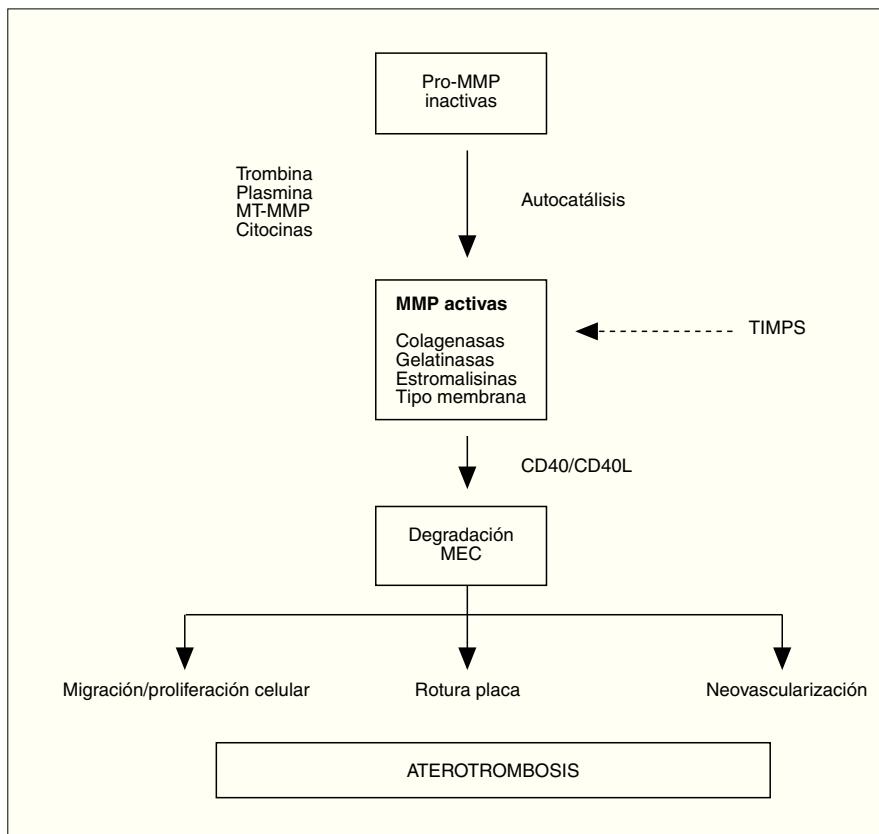


Figura 1. Proteólisis mediada por metaloproteasas en la aterotrombosis.

factores de crecimiento, citocinas y hormonas aumentan su expresión transcripcional, mientras que la heparina, el factor de transformación β (TGF- β) y los corticoides la inhiben. La activación extracelular de zimógenos latentes (Pro-MMP) representaría el segundo nivel de control: el principal activador fisiológico de las MMP es la plasmina, que convierte las formas latentes en activas mediante proteólisis del enlace cisteína-Zn⁺⁺ y exposición del dominio catalítico⁹. Otras enzimas, como trombina, el factor Xa y las propias MMP también poseen la capacidad de activar MMP¹²⁻¹⁴. Finalmente, existiría un control de la actividad de MMP mediado por inhibidores específicos (TIMPS), de los que se han descrito 4 miembros (TIMP-1, 2, 3 y 4). Los TIMP inhiben las MMP mediante unión irreversible a la forma activa de la enzima. En resumen, el balance proteolítico dependerá de la concentración relativa de activadores e inhibidores⁷⁻⁹ (fig. 1).

Funciones biológicas de las MMP

Diversos estudios experimentales y clínicos han permitido establecer un papel de las MMP en varios procesos fisiológicos.

Actividad del endometrio

La menstruación se caracteriza por la destrucción tisular como resultado de la degradación del endometrio funcional en el inicio del ciclo reproductivo femenino. Se ha observado un aumento de colagenasas y estromalisinas durante la fase menstrual en el endometrio humano¹⁵.

Cicatrización de heridas

La degradación proteolítica de la MEC es un requisito indispensable en numerosas fases del proceso de cicatrización, como la angiogénesis y la migración de queratinocitos. La expresión de MMP-1 se incrementa tras la lesión cutánea, continúa durante la cicatrización y persiste durante la reepitelización. Se ha demostrado que la actividad MMP-1 es esencial para la migración de queratinocitos a través del colágeno, proceso mediado por la integrina $\alpha_v\beta_3$ ¹⁶.

Actividad fibrinolítica celular

Las interacciones entre el sistema de MMP y el sistema plasminógeno/plasmina afectan la fibrinolisis celular. La MMP-3 (estromalisina-1) hidroliza

específicamente activadores del plasminogéno como la urocinasa (u-PA) en un fragmento de 17 kDa, que contiene el receptor para la enzima (u-PAR). Además, hidroliza la α_2 -antiplasmina, principal inhibidor fisiológico de la plasmina, así como el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), principal inhibidor de los activadores del plasminógeno. Como se ha señalado anteriormente, la plasmina es uno de los principales activadores de pro-MMP en enzimas activas¹⁷. Estas interacciones moleculares entre MMP y el sistema de activación del plasminógeno desempeñarán un papel fundamental en la regulación de la fibrinólisis celular^{3,18}.

Remodelado epitelial

Una de las funciones principales de la mucosa epitelial es actuar de barrera defensiva antimicrobiana y como componente de la inmunidad innata. La expresión de matrilixina en el epitelio mucoso, la más pequeña de las MMP descritas hasta la actualidad (28 kDa), sugiere que esta enzima sería responsable de la activación de prodefensinas, precursoras de sustancias que destruyen bacterias a través de una disruptión de su membrana¹⁹.

Envejecimiento

La edad es un factor de riesgo para las enfermedades vasculares, como la hipertensión y la aterosclerosis. Se ha observado desorganización en la lámina elástica interna en ausencia de lesión vascular en relación con la edad, por aumento de la expresión de diversas MMP con actividad elastasa, como MMP-2 y 9. Estímulos inflamatorios presentes en aortas de sujetos de edad avanzada, como TNF- α y TGF- β , están involucrados en una mayor activación de MMP a escala vascular. Estos cambios moleculares observados durante el proceso de envejecimiento pueden representar nuevas dianas para la prevención y tratamiento de enfermedades vasculares relacionadas con la edad²⁰.

Papel de las MMP en aterosclerosis: desarrollo de la lesión, rotura de la placa y formación deaneurismas

Alteraciones en la homeostasis de la MEC, como consecuencia de cambios en la síntesis y/o la degradación, se han asociado con enfermedades vasculares. Hay evidencia de que las MMP están involucradas en todas las fases del proceso aterosclerótico, desde la lesión inicial a la rotura y la trombosis. El espectro de MMP en la aterosclerosis estará condicionado por el tipo celular predominante, los factores solubles y la interacción células-MEC^{5,7,21,22}.

Las moléculas implicadas en la comunicación de los tipos celulares implicados en la proteólisis vascular no se conocen con precisión. Diversas citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y las interleucinas, así como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, aumentan la expresión de MMP por monocitos y células endoteliales *in vitro*²³⁻²⁶. Estudios recientes han implicado al sistema CD40/CD40L, ya que la unión de CD40 por células presentes en el ateroma causa activación de MMP^{27,28}. La hipoxia-reoxigenación y las especies reactivas del oxígeno pueden inducir la expresión de diversas MMP^{29,30}. La hiperglucemia puede aumentar la expresión de MMP-9 en células endoteliales³¹. Finalmente, la trombina es capaz de activar pro-MMP-2 *in vitro*, lo que sugiere una probable activación de MMP en los lugares de lesión vascular¹². En placas ateroscleróticas complicadas, la trombina podría promover su inestabilidad al incrementar la degradación de la MEC⁵. La activación combinada de trombina y MMP podría suponer un importante mecanismo de retroalimentación en los síndromes clínicos aterotrombóticos (fig. 1). Es importante señalar que no todas las MMP reaccionan de forma similar ante los mismos estímulos y que el impacto de varios factores puede ser específico del tipo celular implicado. Así, el TGF- β inhibe la expresión de MMP-12, pero aumenta la de MMP-2 y 9 en monocitos humanos^{9,22}.

Variaciones en la secuencia de la región promotora de genes que codifican MMP pueden ser otro de los mecanismos implicados en la regulación de la actividad proteolítica. Se ha descrito un polimorfismo C/T en la región promotora de la gelatinasa-B (MMP-9) que influye en la expresión de la proteína; la variante T es la que se asocia con mayor actividad proteolítica³². Asimismo, un polimorfismo 5A/6A en la región promotora de la MMP-3 origina cambios en la actividad del enzima, con un aumento 2 veces superior en los portadores del alelo 5A³³. Finalmente, un estudio reciente ha demostrado que el polimorfismo 5A-1171/6A en la estromalisina-1 se ha asociado con aumento significativo en la incidencia de infarto de miocardio en mujeres³⁴.

La formación de la placa ocurre como resultado de la migración y proliferación celular, acompañada de acumulación de MEC. La degradación de la MEC por acción de MMP promueve la migración y el desarrollo de la placa. Durante las fases iniciales, el remodelado de la MEC representa un mecanismo compensador que evita la estenosis arterial. En fases ulteriores del proceso aterosclerótico, la degradación de la capa fibrosa o la erosión endotelial mediada por MMP favorece la rotura y la desestabilización, y promueve la trombosis. La participación de

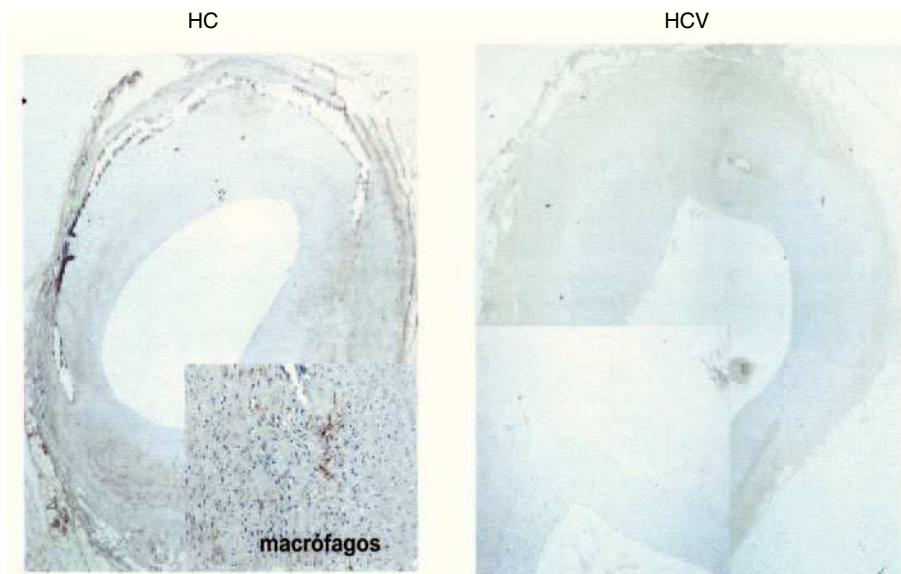


Figura 2. Modelo experimental de hipercolesterolemia más lesión ilíaca en cerdos. Marcado aumento de expresión de MMP-1 tras lesión vascular (izquierda) y efecto del tratamiento con vitaminas antioxidantes (derecha).

MMP se considera, por consiguiente, clave en estos procesos^{35,36}. Finalmente, la formación de aneurismas representaría una fase avanzada del proceso de remodelado arterial por degradación de la MEC mediada fundamentalmente por MMP-2 y 9^{37,38}.

Se ha observado, a escala experimental y clínica, mediante estudios inmunocitoquímicos y zimográficos, un aumento de la expresión de MMP en diferentes tipos de lesiones ateroscleróticas³⁹⁻⁴¹. Galis et al, en un modelo de lesión carotídea en ratones *knockout* para MMP-9, observaron descenso de la hiperplasia de la íntima y acumulación de colágeno intersticial en el sistema vascular⁴². En otro estudio, en ratones *knockout* para TIMP-1 (en los que la actividad MMP-1 estaba aumentada), se observó una reducción del tamaño de la placa aterosclerótica⁴³. La conclusión de estos estudios es que la inhibición de MMP podría contribuir a la estabilidad de la placa al promover un incremento del contenido de colágeno.

Nuestro grupo ha demostrado recientemente, en un modelo experimental de aterosclerosis en cerdos inducido por dieta más angioplastia en artería ilíaca, un marcado aumento de la expresión vascular de colagenasa (MMP-1) tras angioplastia (fig. 2), que se correlacionaba con una reducción del contenido de colágeno de la placa (fig. 3). También observamos un aumento de la actividad proteolítica sistémica en el grupo hipercolesterolémico, identificada como MMP-1 por *western-blot*⁴⁴. Estos resultados sugieren que la lesión vascular supone un potente estímulo para la expresión vascular y sistémica de MMP-1 en este modelo experimental de hipercolesterolemia porcina.

También hemos analizado el perfil proteolítico vascular en pacientes con lesiones ateroscleróticas avanzadas⁴⁵. Se obtuvieron segmentos vasculares de pacientes sometidos a cirugía de revascularización periférica y se determinó, mediante inmunohistoquímica, la expresión de MMP y TIMP. Se midió la expresión de MMP-1, 3 y 9, y de TIMP-1, así como el contenido de colágeno en secciones vasculares de pacientes sometidos a endarterectomía carotídea ($n = 11$) y revascularización periférica (femoral; $n = 23$), así como en secciones de arteria mamaria de pacientes sometidos a bypass aortocoronario ($n = 20$; grupo control). Se analizaron los resultados con relación al lecho vascular y tipo de lesión (occlusiva o aneurismática).

Nuestros resultados demostraron un incremento significativo de MMP en lesiones avanzadas, sobre todo en áreas con alto contenido en macrófagos y, por tanto con mayor inflamación⁴⁵. Además, se observó una alteración del balance proteolítico en relación con el lecho vascular (carótida o femoral) y el tipo de lesión aterosclerótica (trombótica o aneurismática). En concreto, observamos una mayor expresión de MMP-1, 3 y 9, que se correlacionó con una reducción del contenido de colágeno en las lesiones ateroscleróticas avanzadas, mayor expresión de MMP-1 y 3 en las lesiones aneurismáticas, aumento de TIMP-1 en las que mostraban calcificación y una mayor expresión de MMP-9 en lesiones carotídeas comparadas con femorales⁴⁵ (fig. 4). Estos resultados indican un papel preponderante de las MMP en lesiones ateroscleróticas avanzadas y que las diferencias observadas en el balance proteolítico en los distintos lechos vascula-

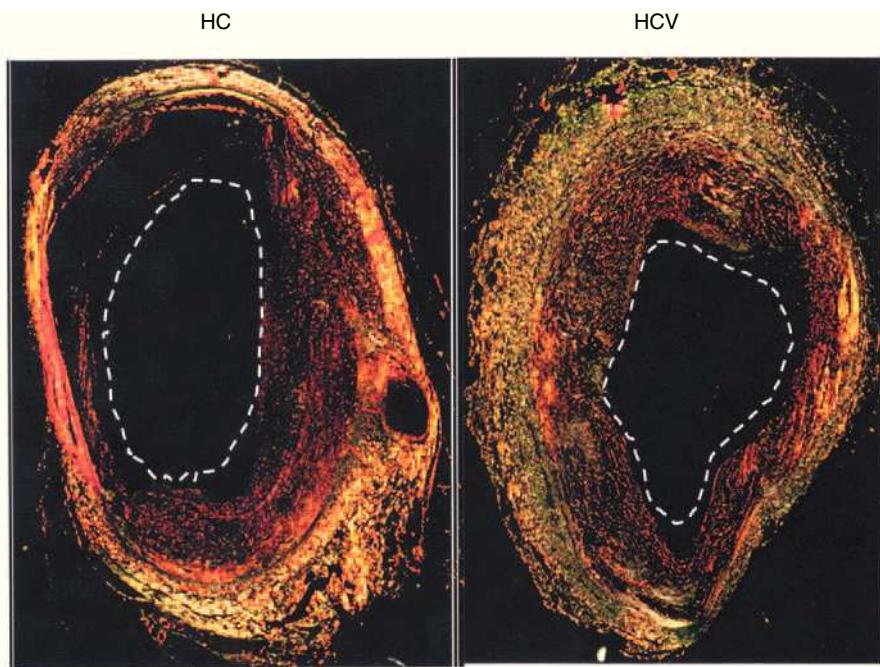


Figura 3. Modelo experimental de hipercolesterolemia más lesión ilíaca en cerdos. Reducción del contenido de colágeno en la placa de ateroma tras lesión vascular (izquierda) y aumento del colágeno tras tratamiento con vitaminas antioxidantes (derecha).

res pueden estar implicadas en la evolución final de la lesión aterosclerótica humana y en la formación de aneurismas^{37,38,46}.

Nuestros resultados estarían de acuerdo con otros estudios que han demostrado un aumento de MMP-9 en placas coronarias y carotídeas inestables⁴⁷. Además, se observó un incremento de los valores circulantes de MMP-9 en pacientes sometidos a endarterectomía con evidencia de embolización espontánea⁴⁷.

Asociación de MMP con síndromes coronarios agudos

Si bien, a escala vascular, existen evidencias de una estrecha asociación entre MMP y la vulnerabilidad de la placa, hay más controversia con los resultados observados en la clínica². Kai et al midieron las concentraciones de MMP-2 y 9 en 50 pacientes con síndromes coronarios. Los valores de MMP-9 estaban significativamente más elevados en aquellos con infarto agudo de miocardio (IAM)

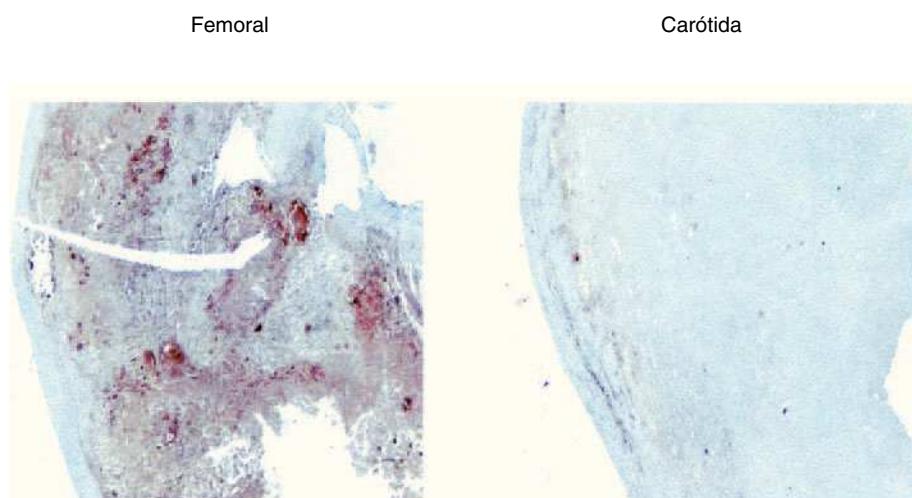


Figura 4. Diferente expresión de MMP-9 en la arteria carótida (izquierda) en relación con femorales (derecha).

y angina inestable que en los que presentaban angina estable⁴⁸. Otro estudio analizó los valores de MMP-9 y TIMP-1 en pacientes con lesiones coronarias diagnosticadas angiográficamente. Se observó un aumento significativo de ambos parámetros en sujetos con IAM y angina inestable en relación con aquellos con síndrome coronario estable⁴⁹. En un tercer trabajo se midieron los valores de MMP-1 y 2 en pacientes hospitalizados con IAM. Los valores de MMP-2 experimentaron un aumento significativo los días 14 y 21⁵⁰. Recientemente, Blankeberg et al demostraron una potente asociación entre los valores de MMP-9 y el riesgo de episodios coronarios fatales tras 4 años de seguimiento en 1.127 pacientes con enfermedad coronaria establecida⁵¹. En nuestro grupo también hemos observado una alteración del balance fibrinolítico/proteolítico en una serie de pacientes con angina estable y lesiones coronarias demostradas angiográficamente⁵². Sin embargo, existen importantes limitaciones en estos estudios derivadas del hecho de que no siempre la actividad proteolítica plasmática refleja la actividad de la placa y de la demostración de que la trombina, enzima causante de la formación del coágulo de fibrina, también puede activar MMP, por lo que el aumento observado en pacientes con síndromes coronarios sería la consecuencia, más que la causa de la trombosis intravascular^{7,22}.

MMP como dianas terapéuticas en la aterosclerosis

Teniendo en cuenta el papel de las MMP en la aterosclerosis no es sorprendente que su inhibición pueda representar una estrategia terapéutica potencial encaminada a la estabilización de las placas de ateroma, reduciendo la degradación de la MEC y restaurando el equilibrio MMP/TIMP. Teóricamente, los métodos de inhibición de MMP incluirían agentes inhibidores de la actividad y producción de MMP y aumento de TIMP-1^{53,54}, si bien existen resultados contradictorios sobre el efecto beneficioso de la inhibición selectiva de MMP⁵⁵.

Diversos fármacos empleados en el tratamiento de la aterosclerosis pueden tener un efecto modulador de la actividad proteolítica celular y/o sistémica. Inhibidores de la enzima HMGCoA-reductasa (estatinas) afectan la expresión de diversas MMP: la fluvastatina y la simvastatina reducen la secreción celular de MMP-1 y 9 *in vitro*⁵⁶. Experimentalmente, múltiples estatinas disminuyen la expresión de MMP-1, 3 y 9⁵⁷. Estudios recientes indican, asimismo, que compuestos del tipo de las tiazolidindionas (TZD, rosiglitazona) disminuyen la expresión de MMP-9, probablemente a través de la unión a PPAR- γ ⁵⁸.

En modelos animales en los que se indujo aumento de la expresión de TIMP-1 mediante terapia génica se observó una disminución en la formación de aneurismas, mientras que la transfección viral del gen *TIMP-2* previno el desarrollo de la íntima en ratones deficientes en apolipoproteína E⁵⁹.

Nuestro grupo ha demostrado recientemente que un régimen antioxidante incluyendo la combinación de vitaminas C y E reducía significativamente la expresión vascular de MMP-1 en el modelo de hipercolesterolemia porcina más angioplastia (fig. 2) y mejoraba el contenido de colágeno de la placa (fig. 3). Se observó, asimismo, una disminución de la actividad caseinolítica sistémica dependiente de MMP-1⁴⁴. Estos resultados sugieren un efecto beneficioso de las vitaminas C y E en el modelo porcino de aterosclerosis experimental. Teniendo en cuenta el papel del estrés oxidativo en la patogenia de la aterosclerosis, la reducción de la peroxidación lipídica podría ser uno de los mecanismos para explicar el efecto beneficioso de los antioxidantes^{60,61}.

Conclusiones

Existen evidencias clínicas y experimentales que sugieren que una alteración del balance entre MMP y sus inhibidores rompería el equilibrio entre síntesis/degradación de la MEC y conduciría a la rotura de la placa de ateroma que precede a los síndromes clínicos vasculares oclusivos, IAM y otros síndromes coronarios agudos e ictus isquémico, principales causas de mortalidad en los países occidentales. Existen diferencias en el balance proteolítico vascular, tanto en relación con el tipo de lesión como con el lecho vascular implicado, lo que podría ser de interés para explicar diferencias en las características de las placas de ateroma en relación con la región anatómica afectada. Finalmente, las MMP podrían ser dianas terapéuticas atractivas para prevenir la desestabilización de la placa y el desarrollo de complicaciones aterotrombóticas.

Bibliografía

- Libby P, Lee RT. Matrix matters. Circulation. 2000;102:1874-6.
- Shah PK, Galis ZS. Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture. Players keep piling up but questions remain. Circulation. 2001;104:1878-80.
- Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. Thromb Haemost. 2001;86:324-33.
- Benjamin IJ. Matrix metalloproteinases: from biology to therapeutic strategies in cardiovascular disease. J Invest Med. 2001;49: 381-97.
- Loftus IM, Naylor AR, Bell PRF, Thompson MM. Matrix metalloproteinases and atherosclerotic plaque instability. Br J Surg. 2002;89:680-94.

6. Ellerbroek SM, Wu YI, Overall CM, Stack MS. Functional interplay between type collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity. *J Biol Chem.* 2001;276:24833-42.
7. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res.* 2003;59:812-23.
8. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 1998;12:1075-95.
9. Nagasse H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-4.
10. D'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, et al. Membrane-type matrix 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.* 1997;250:751-7.
11. Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, et al. Increased expression of membrane-type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque. Role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation.* 2002;106:3024-30.
12. Galis ZS, Kranzhofer P, Fenton JW, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:483-9.
13. Knauper V, Smith B, Lopes-Otin C, Murphy G. Activation of pro-gelatinase B (pro-MMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). *Eur J Biochem.* 1997;248:369-73.
14. Rauch BH, Bretschneider E, Braun M, Shrör K. Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2. *Circ Res.* 2002;90:112-5.
15. Salamonsen LA, Zhang J, Hampton A, Lathburg L. Regulation of metalloproteinases in human endometrium. *Human Reprod.* 2000;15:112-9.
16. Ravanti L, Kahari V-M. Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int J Mol Med.* 2000;6:391-407.
17. Carmeliet P, Moons L, Lijnen HR, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, et al. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nature Genet.* 1997;17:439-44.
18. Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry.* 2002;67:92-8.
19. Ganz T. Immunology: defensins and host defense. *Science.* 1999; 286:420-1.
20. Li Z, Froelich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension.* 1999;33:116-23.
21. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 1995;77:863-8.
22. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251-62.
23. Galis ZS, Muszinski M, Sukhova GK, Simon-Morrisay E, Vnemuri N, Lark MW, et al. Cytokine stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994;75:181-9.
24. Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, et al. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane-type-1 matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:11924-9.
25. Mtairag EM, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB, et al. Effects of interleukin 10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP secretion. *Cardiovasc Res.* 2001; 49:882-90.
26. Huang Y, Song L, Wu S, Fan F, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL differentially regulates MMP-1 and TIMP-1 expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001;156:119-25.
27. Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage function related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation.* 1997;96:396-9.
28. Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Atkinson E, Levesque E, Herman M, et al. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40/CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1999;189:843-53.
29. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. *J Clin Invest.* 1996;98:2572-9.
30. Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res.* 2002;90:784-91.
31. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, et al. Diabetes mellitus enhanced vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res.* 2001;88:1291-8.
32. Zhang B, Ye S, Hermann SM, Eriksson P, De Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99:1788-94.
33. Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, et al. Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction. *Circulation.* 1999;99:2717-9.
34. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med.* 2002;347:1916-23.
35. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;90:775-8.
36. Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billinghurst RC, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1999;99:2503-9.
37. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinase 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2002;110:625-32.
38. Goodall S, Porter KE, Bell PR, Thompson MM. Enhanced invasive properties exhibited by smooth muscle cells are associated with elevated production of MMP-2 in patients with aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24:72-80.
39. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:8154-8.
40. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Louschin C, Isner JM. Identification of 91Kda gelatinase in human coronary atherosclerosis lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation.* 1994;21:2125-31.
41. Thompson RW, Holmes DR, Merters RA, Liau S, Botney MD, Mecham RP, et al. Production and localization of 92kda gelatinase in abdominal aortic aneurysms: an elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm infiltrating macrophages. *J Clin Invest.* 1995; 96:318-26.
42. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, et al. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res.* 2002;91:852-9.
43. Silence J, Collen D, Lijnen HR. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res.* 2002;90:897-903.
44. Orbe J, Rodríguez JA, Arias R, Belzunce M, Nespereira B, Pérez-Izarbe M, et al. Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: implications for plaque stabilization. *Atherosclerosis.* 2003;167:45-53.
45. Orbe J, Fernández L, Rodríguez JA, Rábago G, Belzunce M, Monasterio A, et al. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis.* 2003;170:269-76.
46. Carrell TW, Burnand KG, Wells GM, Clements JM, Smith A. Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 2002;105:477-82.
47. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crouwther M, Jones L, Bell PR, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke.* 2000;31:40-7.
48. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:368-72.

49. Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukuchi T, Kamada T, Okumura K, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 are increased in coronary circulation of patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J.* 2001;141:211-7.
50. Hirohata S, Kusachi S, Murakami M, Murakami T, Sano I, Watanabe T, et al. Time dependent metalloproteinase-1 and metalloproteinase-1 tissue inhibitor after successful reperfusion of acute myocardial infarction. *Heart.* 1997;78:278-84.
51. Blanckenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis in patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;107:1579-85.
52. Páramo JA, Orbe J, Fernández J. Fibrinolysis/proteolysis balance in stable angina pectoris in relation to angiographic findings. *Thromb Haemost.* 2001;86:636-9.
53. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase-B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2000;105:1641-9.
54. Bendeck MP. Targeting pericellular proteolysis in vascular disease. *Circ Res.* 2002;91:861-2.
55. Mukerjee R, Brinsford TA, Dowdy KB, Scott AA, Baskin JM, Deschamps AM, et al. Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation.* 2003;107:618-25.
56. Bellotta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1671-8.
57. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1,-2,-3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:769-75.
58. Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on non-traditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2002;106:697-84.
59. Cheng L, Mantle G, Pauly R, Nater C, Felici A, Monticoni R, et al. Adenovirus mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation.* 1998;98:2195-201.
60. Páramo JA, Rodríguez JA, Orbe J. Papel de los antioxidantes en la prevención de la enfermedad cardiovascular. *Med Clin (Barc).* 2001;116:629-35.
61. Páramo JA, Orbe J, Rodríguez JA. Estabilización de la placa de ateroma: un nuevo concepto basado en la biología dinámica de la aterosclerosis. *Med Clin (Barc).* 2003;121:583-7.