

# Papel de las plaquetas en la arteriosclerosis

Ginés Escolar Albaladalejo

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





# Unidad de TROMBOSIS y ARTERIOSCLEROSIS

Dr. C. A. Villaverde

INSTITUTO DE FARMACOLOGIA - C.S.I.C.

Jorge Girona Salgado, s/n. Tels. 204 06 00  
BARCELONA-34 204 42 44



CARLOS A. VILLAVERDE GROTE, INVESTIGADOR CIENTIFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, JEFE DE LA UNIDAD DE TROMBOSIS Y ARTERIOSCLEROSIS DEL INSTITUTO DE FARMACOLOGIA DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO DE BARCELONA, C.S.I.C.

CERTIFICA: Que Don Ginés Escolar Albañadejo, licenciado en Medicina, ha realizado bajo su supervisión y dirección la Tesis Doctoral que lleva por título: "Papel de las plaquetas en la arteriosclerosis".

Y para que conste donde convenga y a petición del interesado, expido el presente en Barcelona a treinta de Marzo de mil novecientos ochenta y tres.

**UNIDAD TROMBOSIS Y  
ARTERIOSCLEROSIS**  
INSTITUTO DE FARMACOLOGIA C. S. I. C.  
C/. Jorge Girona Salgado, s/n.  
BARCELONA - 34

Fdo. Carlos A. Villaverde Grote.

A mis padres

Tesis presentada por

Ginés Escolar Albaladejo

Licenciado en Medicina por la Universidad de Barcelona  
para optar al grado de Doctor.

PAPEL DE LAS PLAQUETAS  
EN LA ARTERIOSCLEROSIS

Barcelona, Marzo 1983

La parte experimental de esta tesis ha sido realizada en la Unidad de Trombosis y Arteriosclerosis del Consejo Superior de Investigaciones Cientificas de Barcelona que dirige el Dr. C.A. Villaverde.

La Microscopía electrónica de Scanning se ha llevado a cabo en :

El Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Central de Barcelona.

El Instituto de Investigaciones Pesqueras del Consejo Superior de Investigaciones Cientificas de Barcelona.

Quiero expresar mi agradecimiento :

Al Dr. C.A. Villaverde por su dirección y por el apoyo que me ha ofrecido a lo largo de mi carrera científica.

Al Profesor F.G. Valdecasas por la atención y facilidades que me ha brindado.

Al Dr. F. Vives, al Ingeniero Técnico D.A. Fauquet y al Ldo. D.R. Fontarnau por su colaboración en las observaciones con el Microscopio Electrónico.

A los técnicos D.J.C. Martinez, D. X. Soler y D. J. Rodriguez y al resto de mis compañeros, especialmente los Ldos. L. Almirall y C. Navarro sin cuya ayuda la elaboración de la parte experimental de esta tesis hubiera sido muy dificultosa.

A los Dres. E. Bastida, A. Ordinas y J. Renau por la orientación y asesoramiento que me han ofrecido.

A Dña. M.L. Bravo y E. Mallafré por la paciencia demostrada.

A los laboratorios Roger S.A. por haber sufragado los gastos de edición de esta tesis.

I N D I C E

	<u>Pags.</u>
1 - Actualización Bibliográfica . . . . .	7
1.1. Generalidades . . . . .	8
1.1.1. Definiciones. . . . .	9
1.1.2. Arteriosclerosis en el tiempo y la civilización . . . . .	10
1.1.3. Importancia epidemiológica. .	13
1.1.4. La arteriosclerosis en nuestro medio . . . . .	18
1.1.5. Magnitud actual del problema.	21
1.2. Morfología y Fisiología. . . . .	27
1.2.1. Arteria . . . . .	28
1.2.1.1. Clasificación y es- tructura general . . . . .	28
1.2.1.2. Endotelio. Morfología y funciones . . . . .	31
1.2.1.3. Media y célula muscu- lar lisa. . . . .	38
1.2.2. Plaquetas . . . . .	45
1.2.2.1. Ultraestructura y bio- química . . . . .	45
1.2.2.2. Fisiología . . . . .	51
1.3. Pared arterial lesionada . . . . .	63
1.3.1. Inicio de las lesiones. Lesio- nes precoces . . . . .	64
1.3.2. Evolución de las lesiones . .	70
1.4. Etiopatogenia . . . . .	78
1.4.1. Visión histórica . . . . .	79
1.4.2. Visión actual . . . . .	80
1.4.2.1. Sobrecarga hemodiná- mica y lesión endotelial . .	82
1.4.2.2. Pared arterial y lí- pidos . . . . .	83
1.4.2.3. Plaquetas . . . . .	89

1.5. Papel de las plaquetas . . . . .	90
1.5.1. Plaquetas/pared arterial y proliferación de células musculares lisas . . . . .	91
1.5.2. Plaquetas/pared arterial y sistema de las prostaglandi nas . . . . .	97
1.5.3. Factores de riesgo. Su posi ble implicación con las pla quetas . . . . .	100
1.6. Necesidad de los modelos experimen tales. . . . .	108
1.6.1. Métodos . . . . .	109
1.6.2. Animales. . . . .	109
1.6.3. Elección teórica. . . . .	115
2 - Experimental. . . . .	120
2.1. Programa de trabajo. . . . .	121
2.2. Material y método. . . . .	123
2.2.1. Material . . . . .	124
2.2.2. Métodos . . . . .	133
2.3. Resultados . . . . .	155
2.3.1. Desarrollo y características del modelo experimental . . . . .	155
2.3.2. Resultados por tiempos de ob servación . . . . .	168
2.3.2.1. Control . . . . .	168
2.3.2.2. Cuatro horas . . . . .	182
2.3.2.3. Veinticuatro horas . . . . .	196
2.3.2.4. Tres días. . . . .	208
2.3.2.5. Cinco días . . . . .	223
2.3.2.6. Diez días. . . . .	237
2.3.2.7. Quince días. . . . .	250
2.4. Analisis de los resultados . . . . .	265
2.4.1. Recuentos de plaquetas. . . . .	266
2.4.2. Respuesta de las plaquetas al ADP y Colágeno . . . . .	268

2.4.3. Producción de prostaciclina . .	273
2.4.4. Morfología. . . . .	276
2.5. Discusión. . . . .	279
2.6 Conclusiones . . . . .	286
3 - Bibliografía . . . . .	289

## 1. ACTUALIZACION BIBLIOGRAFICA

## 1.1. GENERALIDADES

### 1.1.1. DEFINICIONES

El término "arteriosclerosis" debe atribuirse a Lobstein, que lo creó en 1833 para referirse a lo que él denominaba: "un aumento del espesor y la dureza de las paredes arteriales".

Este término define pues las particularidades anatomopatológicas de la enfermedad y desde su introducción viene siendo utilizado para hacer referencia a una enfermedad o grupo de enfermedades que afectan característicamente a los vasos sanguíneos.

Etimológicamente, la palabra arteriosclerosis se trata de un nombre compuesto por arteria y "sklerosis" que significa espesamiento con induración. Sin embargo, en el lenguaje clínico corriente, se utilizan muy a menudo los conceptos arteriosclerosis o aterosclerosis y debe tenerse en cuenta que aunque ambos se emplean para referirse a la misma enfermedad; El término aterosclerosis propuesto por Marchand en 1904, está compuesto etimológicamente de "athera" que significa papilla, pulposo, etc. y "sklêrosis" o endurecimiento. El término aterosclerosis hace referencia al depósito lipídico y al endurecimiento que suelen darse en las arterias enfermas.

En 1.906, Klotz propone mantener el término arteriosclerosis como denominación general para todos los procesos de esclerosis o endurecimiento arterial y distinguir dentro de él ciertas variedades o subdivisiones: Ateromatosis, aterosclerosis, esclerosis de Mönckeberg y arteriosclerosis hiperplásica.

Desde este punto de vista, el término arteriosclerosis definiría una afectación general de la pared vascular con predominio de pérdida de elasticidad, mientras el término aterosclerosis haría referencia a alteraciones localizadas con depósitos de lípidos en la íntima arterial.

Aunque como se ha dicho, los términos atero y arteriosclerosis se empleen indistintamente en clínica, no es menos cierto que existe una tendencia al empleo del término aterosclerosis, tendencia posiblemente impulsada por la profusión de la literatura inglesa que prefiere este término.

Así la O.M.S., ha definido (1958) a la aterosclerosis como: Una combinación de modificaciones de la íntima de las arterias, que consiste en el acúmulo focal de lípidos, complejos de hidratos de carbono, sangre y productos hemáticos, tejido conjuntivo y depósito de calcio, asociados a alteraciones de la túnica media.

#### 1.1.2. ARTERIOSCLEROSIS EN EL TIEMPO Y LA CIVILIZACION

Existe una tendencia a considerar a la arteriosclerosis como una enfermedad íntimamente ligada a la vida moderna y nada más lejos de la realidad, pues se puede demostrar que la arteriosclerosis es una enfermedad tan antigua como el propio hombre; Czremak en 1852 descubrió lesiones arterioscleróticas en la aorta procedente de una momia egipcia. Parecidos descubrimientos fueron hechos por Smith en 1908 y Shattock en 1909, que descubrieron lesiones arteriales similares a la producidas por la arteriosclerosis en una mo

mia egipcia fechada 1200 años A.C. El propio Shattock llegó incluso a analizar químicamente una de las placas arterioscleróticas constatando en ella la presencia de partículas de fosfato cálcico.

Ruffer en el año 1911, tiene la oportunidad de estudiar histológicamente 24 arterias procedentes de otras tantas momias egipcias de una antigüedad entre 1580 y 525 años A.C., llegando a la conclusión de que la enfermedad arteriosclerótica estaba presente en el Antiguo Egipto y no de manera anormal o esporádica, sino con una similitud e incidencia muy parecida a la que se presentaba en los cadáveres de personas coetaneas del propio Ruffer.

La arteriosclerosis es una enfermedad que ha estado presente en el curso de la historia del hombre y así ha quedado reflejado en tratados médicos antiguos.

Ebers en 1872 consiguió descifrar un papiro egipcio en el que ya aparecían descritos los síntomas de la angina de pecho. El historiador español Lain Entralgo (1973) revisando manuscritos del Corpus Hippocraticum, ha encontrado referencias en las que se cita sintomatología de las enfermedades cardiovasculares. Galeno en su libro "De pulsibus libellus at tirones", ya se refiere a la dureza de la pared arterial.

Desde entonces hasta nuestros días, son múltiples las referencias existentes que demuestran que la arteriosclerosis ha acompañado al hombre en el curso de la historia, tal como ha sido comprobado en manuscritos y dibujos de Leonardo da Vinci en 1506 (Keele

1973) y en escritos de Fallopio (1523-1562), Pare (1510-1590), Bonet (1620-1689), Thebesius (1686-1732), Morgan (1682-1771), Haller (1708-1777) y un número in contable de autores hasta llegar a nuestros días. (Citado por Lain Entralgo en Historia Universal de la Medicina).

Ya desde un principio se sospechó que la arteriosclerosis tenía relación con hábitos corporales o alimenticios: es decir, en cierta forma con el grado de civilización.

"Los que son constitucionalmente muy grue sos son más aptos para morir súbitamente que a aquellos que son delgados" (Obras de Hipócrates, cit. por Littré, 1839).

Hoy día es interesante comprobar el grado de arteriosclerosis que en algunas razas o tribus que subsisten en la actualidad, pero que conservan un grado de civilización todavía primitivo. Clerc (1978) ha observado en un estudio epidemiológico realizado en Costa de Marfil sobre un grupo de población heterogéneo, que los accidentes cardiovasculares no constituyen un fenómeno raro, incluso en los medios más tradicionales y que dichos accidentes elevan su frecuencia a medida que aumenta el desarrollo socioeconómico.

Estos datos actuales confirman o ayudan a explicar los hallazgos realizados en las momias egipcias, ya que debe tenerse en cuenta que la civilización egipcia, pese a ser más antigua, había alcanzado cotas más elevadas que las que, salvando las distancias, se encuentran en algunos de los grupos estudiados por Clerc.

### 1.1.3. IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA ARTERIOSCLEROSIS

La arteriosclerosis como principal causa de enfermedades cardiovasculares, constituye la entidad responsable de la mayor mortalidad, alcanzando en los últimos años cifras próximas al 50%, según datos publicados en 1974 (Stat. Bull. Metropol Life Ins. Comp.)

A partir de estudios llevados a cabo en la población francesa, en los que figura un análisis de la proporción de las principales enfermedades cardiovasculares por grupos de edad referidos a 100 muertes, se han obtenido las siguientes gráficas: (fig. 1 y 2)

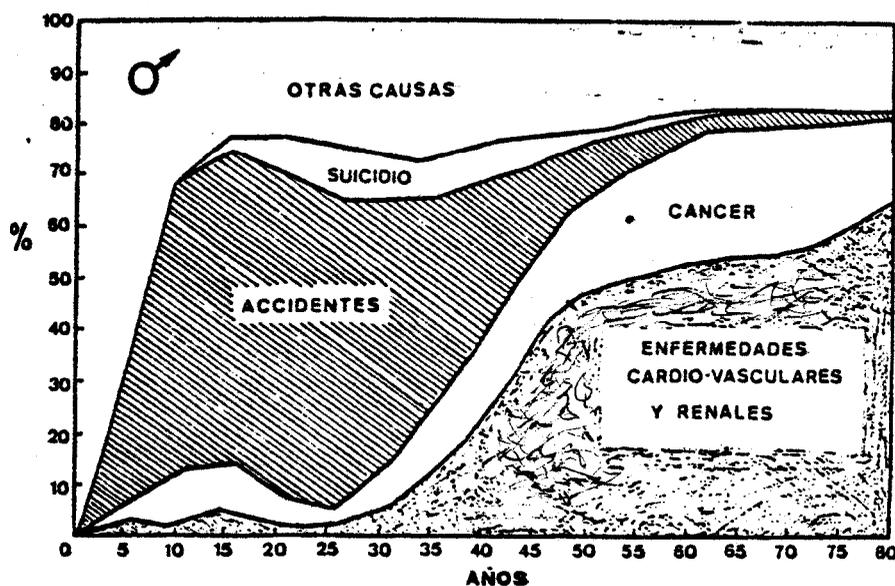


Fig. 1. Causas de mortalidad en % (Varones).

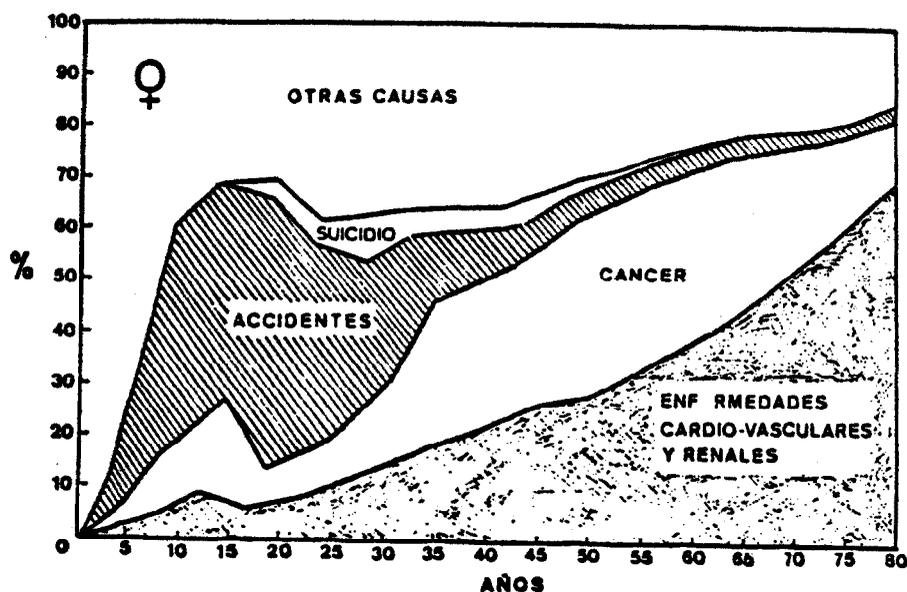


Fig.2. Causas de mortalidad en % (Mujeres).

que expresan las diferencias entre el sexo femenino y el masculino. En las gráficas se puede observar que las enfermedades cardiovasculares y renales, representan una gran parte de la mortalidad por todas las causas y que junto al cáncer y los accidentes, ocasionan entre un 70 y un 80% de la mortalidad que acontece a partir de los 20 años.

Es notable en estas gráficas que la incidencia de mortalidad por enfermedades cardiovasculares que entre los 50 y los 55 años es mucho mayor para el hombre que para la mujer, llegando a ser casi el doble, con el tiempo va haciéndose muy parecida, quedando prácticamente igualada entre los 70 y los 80 años. Aunque existen estudios epidemiológicos, como los rea

lizados en Europa por Ancel Keys (1970), que demuestran que la incidencia de cardiopatía coronaria puede variar según las zonas geográficas, no es menos cierto que los estudios realizados en la población francesa, continúan siendo como una referencia válida, sobre todo si se tiene en cuenta que las diferencias que encontraba Keys en 1970, en la actualidad se hacen más pequeñas.

#### MORTALIDAD POR CARDIOPATIA CORONARIA DURANTE 5 AÑOS.

	Mortalidad cardiopatía coronaria	Mortalidad total
Este de Finlandia .....	220	641
Ferrovianos USA sedentarios .....	205	381
Ferrovianos USA guardagujas .....	165	483
Zurphen, Holanda .....	133	524
Crevalcore, Italia .....	94	575
Corfú, Grecia .....	80	219
Belgrado, Yugoslavia .....	47	98
Oeste Finlandia .....	44	504
Roma, ferroviarios .....	31	362
Creta, Grecia .....	12	153

TABLA 1. Mortalidad por cardiopatía coronaria durante 5 años. Varones de 40 - 59 años libres de cardiopatía coronaria al inicio (Ancel Keys et al., 1970)

Otros datos epidemiológicos de interés son los aportados por Widmer, et al. (1967) que demuestran que las enfermedades oclusivas arteriales pueden constatarse ya en un 2% de los trabajadores de 35-44 años, y en casi un 11% de todos los trabajadores de edades comprendidas entre los 55 y los 64 años. Epstein (1966) ha podido observar en sus estudios un 3,5% de muertes a causa de cardiopatía arteriosclerótica en pacientes menores de 45 años, aunque Cassidy ya había demostrado en (1946) que la arteriosclerosis coronaria aparecía con mayor frecuencia en edades más avanzadas señalando en sus trabajos que un 70% de los pacientes padecen esta enfermedad entre 50 y 70 años de edad, un 15% entre 40 y 50 años, y un 3% entre 30 y 40 años de edad. Estos datos coinciden en cierta forma con los datos del estudio reseñado anteriormente en la población francesa.

Gottstein ha comprobado que en la República Federal Alemana mueren más de 100.000 personas a consecuencia de trastornos circulatorios cerebrales. El número de personas que anualmente enferman por primera vez a causa de un trastorno circulatorio es de alrededor de 400.000.

Pero quizás los datos estadísticos más relevantes sean los extraídos de la Estadística Internacional de la O.M.S. (fig.3) que reflejan la mortalidad producida por enfermedades coronarias desde el año 1956 al 1967. La enfermedad coronaria es una de las causas que contribuye en mayor proporción a la mortalidad global por enfermedades cardiovasculares.

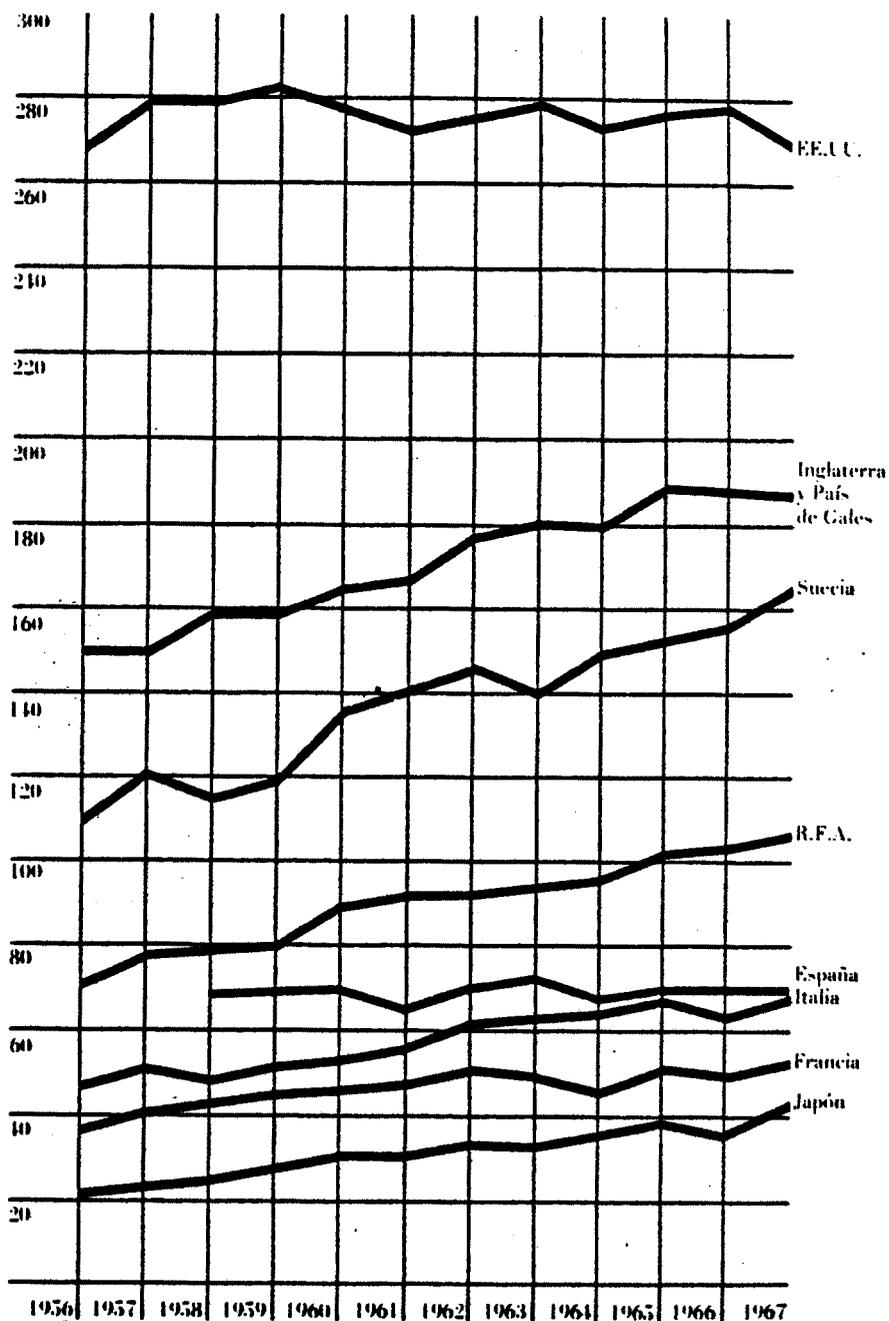


Fig. 3. Mortalidad producida por enfermedades coronarias. Expresada en muertes por 100.000 habitantes (O.M.S.).

Estos datos revelan que los EEUU tienen las cifras más altas de mortalidad por enfermedad coronaria, desde el año 1956. Estas cifras se mantienen de una forma constante mientras en los países europeos occidentales y en el Japón se observa una tendencia al crecimiento entre los años 1965 y 1967; Aunque estos resultados deben interpretarse con cierta prudencia, dada la falta de uniformidad de criterios diagnósticos, criterios de codificación y de terminologías de los certificados de defunción. En Francia, por poner un ejemplo, un fallecimiento coronario puede ser clasificado como "senilidad, muerte repentina e insuficiencia cardíaca".

Es justo señalar que en los últimos años en algunos países entre ellos EE.UU, gracias a las campañas de educación sanitaria y prevención de los factores de riesgo, se observa una discreta disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares con desenlace fatal, aunque no por ello las cifras dejen de ser inquietantes.

#### 1.1.4. LA ARTERIOSCLEROSIS EN NUESTRO MEDIO

Las estadísticas demuestran que en España las tasas de mortalidad producida por enfermedades del aparato circulatorio también están notablemente elevadas. Si observamos la evolución durante el período 1955-1973, de la mortalidad comparada con otros países europeos (ver tabla 2) expresadas en número de muertes por 100.000 habitantes.

**EUROPA.—MORTALIDAD POR ENFERMEDADES DEL  
APARATO CIRCULATORIO**

PAISES	AÑOS										
	1955-59	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1973*
Bélgica .....	395,9	421,2	406,9	460,3	487,7	445,0	464,7	379,0	399,3	578,2	524,5
Dinamarca .....	—	347,7	335,8	351,8	353,9	366,9	387,1	417,0	401,8	381,9	506,7
Francia .....	252,9	249,7	239,3	258,7	259,4	236,7	244,1	235,7	241,0	392,6	396,7
R.F. Alemana ...	261,0	275,4	276,8	293,2	297,0	288,6	307,0	310,4	321,7	—	541,1
Grecia .....	—	—	124,8	136,2	138,3	140,8	140,9	139,2	154,8	268,9	324,0
Irlanda .....	444,6	441,4	463,2	458,9	453,9	431,2	440,1	462,6	416,0	597,0	581,7
Italia .....	271,1	285,8	281,9	314,8	317,3	295,1	315,8	296,9	307,9	—	467,0
Holanda .....	229,3	237,0	240,7	262,0	262,3	250,6	261,7	256,4	255,6	262,6	369,8
Portugal .....	190,4	175,6	174,6	179,8	175,5	175,0	169,9	173,6	170,7	166,2	438,6
ESPAÑA .....	—	191,9	188,8	201,2	190,6	181,4	182,9	185,8	190,8	—	371,3
R. Unido (Ing. G.)	429,5	433,8	443,1	446,0	454,2	418,2	431,8	433,5	418,0	605,8	615,3
Yugoslavia .....	—	—	170,5	196,3	184,4	199,9	185,6	172,9	192,7	274,9	314,4

\* Los valores de Bélgica e Irlanda corresponden a 1972.

**TABLA 2. Mortalidad comparada en diferentes países.**

Se aprecia un incremento pasando de 191/100.000 en el año 1960 a 371,3/100.000 en el año 1973 con un brusco e inexplicable salto de 1968 al 1973. (Datos obtenidos a partir del análisis de la situación sanitaria española publicado por la Subsecretaría de la Salud 1977). Estas tasas continúan más o menos estables ya que los últimos datos publicados por la Dirección General de Salud Pública en 1980 (Boletín Epidemiológico nº1407) arrojan una cifra de 373,48 muertes por 100.000 habitantes a causa de las enfermedades cardiovasculares en el año 1976.

En relación con otros países europeos puede decirse que España ocupa un lugar intermedio con cifras de mortalidad estabilizadas en los últimos años, que no por ello dejan de ser alarmantes, ya que representan un 44,88% de fallecimientos por distintas causas

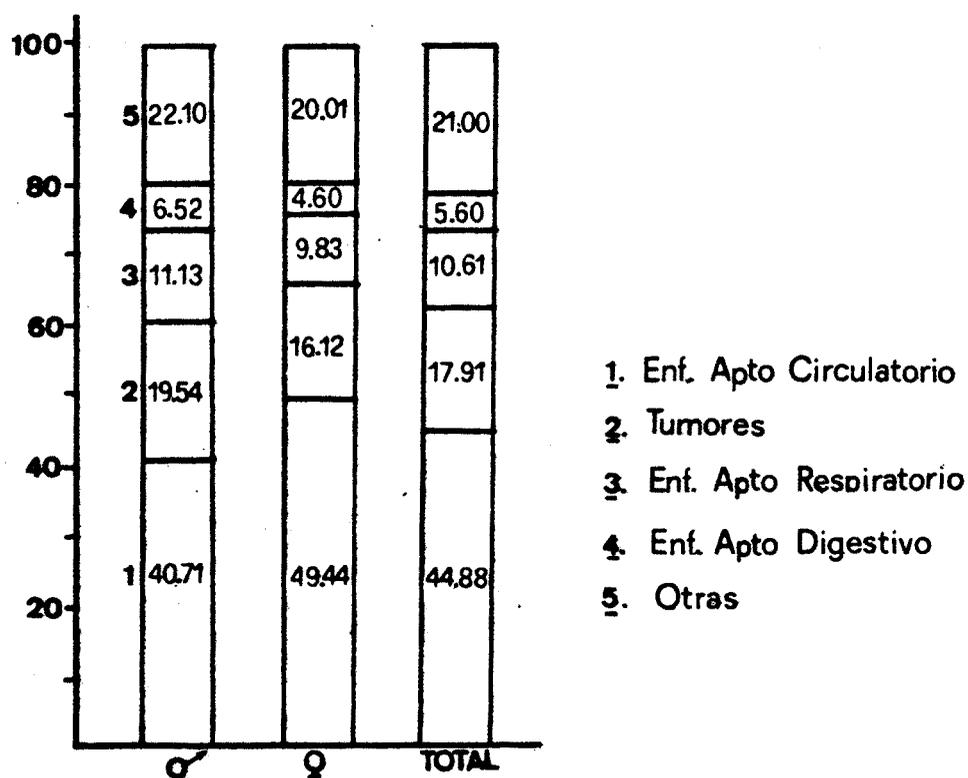


Fig. 4. Distribución porcentual de fallecimientos según los principales grupos de causas de muerte en España en el año 1976.

siendo la causa más importante de fallecimiento seguida por tumores 17,91%, enfermedades del aparato respiratorio 10,61%, enfermedades del aparato digestivo 5,40%, accidentes 5,03% y otra serie de causas con menor repercusión.

#### 1.1.5. MAGNITUD ACTUAL DEL PROBLEMA: ASPECTOS SOCIOECONOMICOS

En la época en que vivimos, la arteriosclerosis es un trastorno arterial considerado como causa principal de muerte en los Estados Unidos y Europa Occidental, propagándose en los demás continentes en relación con su desarrollo (Nat. Heart and Lung Institute, 1971).

En la actualidad, las cotas de mortalidad alcanzadas por las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre el 30 y 50% del total de defunciones, variando según los países o razas.

Si bien los datos de mortalidad son ciertamente alarmantes, deben entenderse que estas tasas son en el fondo un reflejo indirecto de otros avances en diferentes áreas de la Ciencia, especialmente la Medicina, que han conseguido disminuir la mortalidad por otras causas, prolongando la vida media del hombre, y en consecuencia, provocando un incremento aparente de enfermedades cardiovasculares, que en buena parte son consecuencia de la que podíamos llamar "arteriosclerosis fisiológica", es decir, el envejecimiento del sistema vascular con el paso de los años.

Dado que las perspectivas actuales de crisis económica generalizada, aumento de gastos asistenciales y déficit en los presupuestos destinados a la salud pública, obligan a considerar el aspecto económico de cualquier problema sanitario. Desde este punto de vista, la arteriosclerosis representa un problema económico de gran magnitud.

Se sabe que en los países industrializados, el crecimiento de los gastos sanitarios se ha convertido en un problema primordial, puesto que el presupuesto social sobrepasa con frecuencia el 50% del global del propio Estado.

En Francia, en 1975, el presupuesto de la Seguridad social alcanzaba la cifra de 250.000 millones de francos, es decir, casi tanto como el presupuesto del Estado, evaluado en 270.000 millones. Esto como es fácil suponer, representa una pesada carga para esa nación. Por otra parte, la mortalidad cardiovascular en Francia puede evaluarse en un 30 por 100 de la mortalidad global, lo que representa unos 200.000 fallecimientos al año, la tercera parte de los cuales ocurre antes de los sesenta años, creando un perjuicio económico importante a la población activa; Debe recordarse que en 1975 para 100 personas activas había 149 inactivas. La parte que corresponde a mortalidad por arteriosclerosis dentro del presupuesto de prestaciones por vejez, fallecimiento, viudedad/orfandad, aunque fue de 94 millones de francos en 1975, es muy difícil evaluar el alcance económico real, ya que toda mortalidad prematura grava el presupuesto fallecimiento-pensión del conyuge, pero aligera, el presupuesto pensión vejez del difunto.

En cuanto a la enfermedad, hay que contar las consultas, exámenes y tratamientos médicos o quirúrgicos practicados en ciudades y hospitales, así como el número de días que no se acude al trabajo. Si se tiene en cuenta que según datos estadísticos franceses, las enfermedades cardiovasculares constituyen la segunda causa principal del absentismo laboral detrás de las afecciones osteoarticulares, las cifras se hacen más alarmantes.

Destáquese igualmente el fuerte aumento del costo de los exámenes (electrocardiografía, radioisótopos, ecografía, radiología, etc.) de los tratamientos cardiovasculares y de los servicios prestados en centros de cuidados intensivos, de convalecencia y readaptación funcional. Como ejemplo, en Marsella ha realizado un estudio en el que se calcula que un infarto tratado, acarrea unos gastos de 22.000 francos en el primer año, de los cuales 15.000 corresponden a la hospitalización. El costo médico en cuatro años de tratamiento varía de 22.000 a 63.000 francos según la vigilancia y el tratamiento con anticoagulantes y o antigregantes.

En la República Federal de Alemania, Schettler (1977) ha determinado que la enfermedad arteriosclerótica y sus consecuencias clínicas originan el 60% de las inversiones dentro de los capítulos de gastos ambulatorios y hospitalarios. De una forma aproximada este autor calcula que los trastornos de origen vascular originan teniendo en cuenta el absentismo, unos costos equivalentes al 10% del producto nacional bruto, estimado en unos 30.000 millones de marcos en ese año.

En Estados Unidos, en el año 1971, los gastos por la arteriosclerosis se estimaron en unos mil millones de dólares en absentismo laboral y en siete mil millones de gastos de Sanidad (Cottet 1981).

En nuestro propio país, los gastos originados por la arteriosclerosis son considerables, y como muestra para dar una idea de los mismos pueden servir los datos del I.M.S. (Datos de intercambio de mercado del sector farmacéutico 1980) que reflejan en cierta forma los gastos en productos farmacéuticos. Según estos datos, las inversiones estimadas sólo en productos farmacéuticos a nivel de ventas de laboratorios productores a oficinas de farmacia, arrojan las siguientes cifras:

- A) Fármacos hipocolesteromizantes + Antiarteriosclerósos: 1429 millones de pesetas.
- B) Vasodilatadores periféricos y cerebrales: 5743 millones.
- C) Vasodilatadores coronarios: 1149 millones.
- D) Hipotensores con y sin diuréticos: 1145 millones.

Con el fin de afinar más en las cifras, se ha considerado que los fármacos del grupo A son prescritos prácticamente en el 100% de los casos de arteriosclerosis; los del grupo B son prescritos en un 63,8% de su totalidad en la arteriosclerosis o patologías asociadas; los del grupo C se prescriben en un 75,6% a problemas arterioscleróticos y los del grupo D se prescriben o coprescriben en la práctica totalidad, en pacientes con enfermedad arteriosclerótica o con riesgo de padecerla. Realizados los oportunos cálculos, resultan las cifras que figuran en la tabla nº3.

TABLA n° 3

Gastos estimados en productos farmaceuticos prescritos comunmente en pacientes arterioscleroticos (1980)

A) Hipocolesterolemizantes + + Antiarteriosclerosos . . . . .	1.429 000 000
B) Vasodilatadores periféricos y cerebrales . . . . .	2.338 000 000
C) Vasodilatadores coronarios . . . . .	869 000 000
D) Hipotensores con y sin diuréticos asociados . . . . .	<u>1.145 000 000</u>
	5.781 000 000 pts.

La cifra total de gastos en medicamentos alcanza los 5.781 millones de pesetas en el año 1980, sin embargo, es fácil suponer que la cifra total de gastos originados por la arteriosclerosis supera con creces esta estimación, pues debe tenerse en cuenta que solo se han considerado los grupos de fármacos más directamente utilizados en tratamientos ambulatorios de la enfermedad arteriosclerótica. Faltarían añadir otros grupos de fármacos: Anticoagulantes, Antiagregantes (de uso más común en ambientes hospitalarios) y otras terapéuticas asociadas como Antibióticos, Vitaminas, Analgésicos y un largo etcétera.

Es fácil imaginar que la cifra resultante será todavía superior y mucho más aún si se añaden los costos originados por procedimientos diagnósticos, estancias en servicios hospitalarios y pagos a profesionales de la Medicina, que hacen que estas cifras se multipliquen.

En un país como España, en el que el año 1980 existía un presupuesto para la Seguridad Social de 1,746 725 millones de pesetas, no es descalabrado aventurar, ayudados por datos de otros países, que un 20-25% de este presupuesto va a estar aplicado a gastos engendrados por la arteriosclerosis y sus secuelas.

Es lógico pues pensar, que la arteriosclerosis como enfermedad supone un problema social/económico no solo por las muertes e invalideces que origina, si no también por la carga económica que supone para el enfermo y para el Estado. Estas circunstancias hacen que la investigación, ya sea en el mecanismo etiopatogénico, en el territorio del tratamiento o en el de la profilaxis de la enfermedad, esté plenamente justificada.

## 1.2. MORFOLOGIA Y FISILOGIA

### 1.2.1. ARTERIA

#### 1.2.1.1. Clasificación y estructura general

Con fines prácticos, las arterias se han clasificado en: a) Arterias de gran calibre, b) Arterias de mediano calibre, c) Arterias de pequeño calibre y d) Arteriolas. Como se observa, esta es una clasificación eminentemente de tipo práctico, realizada en función del tamaño. La enfermedad arteriosclerótica, afecta principalmente a las arterias de mediano y gran calibre, sólo algunas formas especiales de arteriosclerosis afectan a las de pequeño calibre (Arteriosclerosis obliterante).

Clásicamente se describe una estructura general que con pequeñas modificaciones es válida para las arterias de mediano y gran calibre.

a) Túnica íntima constituida por:

- 1) Una capa de células endoteliales revistiendo la luz del vaso denominada Intima.
- 2) Una zona inmediatamente inferior denominada subendotelio y constituida por una tenue capa de tejido conjuntivo.
- 3) Membrana limitante elástica interna constituida por una membrana tubular perforada compuesta por elastina.

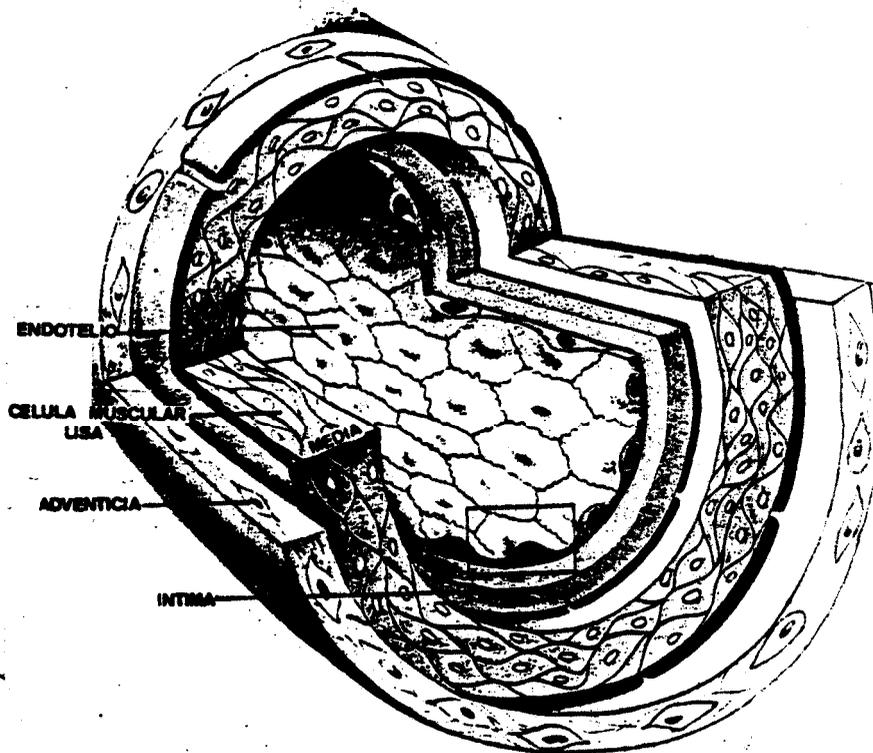


Fig. 5. Estructura de la arteria

- b) Túnica media cuya composición está integrada por fibras musculares lisas dispuestas en sentido circular y material elástico en diferentes proporciones.
- c) Membrana limitante elástica externa.
- d) Túnica adventicia, constituida por tejido conjuntivo

vo con fibras elásticas. Este tejido conjuntivo se prolonga gradualmente y se relaciona con las estructuras vecinas u órganos por los cuales discurre la arteria.

- e) Vasa vasorum, son una red de vasos de muy pequeño calibre que se encuentran principalmente en la adventicia y que penetran ocasionalmente en la túnica media. Su función parece estar relacionada con el metabolismo de la pared.
  
- f) Nervios, son amielínicos y forman una red en la adventicia, terminando en la musculatura de la capa media (nervios vasomotores). Algunas fibras mielinizadas alcanzan la capa íntima, formando las fibras sensitivas de los vasos.

Como diferencias entre las arterias de mediano calibre y las de gran calibre (Ejemplo aorta y grandes ramas) pueden citarse que en las arterias de gran calibre, la membrana elástica interna es menos evidente.

En la túnica media existen diferentes capas de material elástico entre capas de células musculares lisas; en la aorta humana se distinguen hasta 60 capas elásticas (12 ó 13 en la rata). La membrana elástica externa está relativamente poco desarrollada en las arterias de gran calibre. En general, las arterias de mediano calibre tienen un predominio de células musculares en su túnica media, mientras que las de gran calibre tienen un predominio de material elástico, de ahí que en ocasiones se denominen respectivamente arterias musculares o arterias elásticas.

Fisiológicamente parece que las arterias musculares tienen una función distribuidora de la sangre y las arterias elásticas juegan un doble papel, por una parte como conductoras del caudal sanguíneo y por otra como reguladoras de dicho caudal, pues gracias a su elasticidad, transforman el flujo pulsante a la salida del corazón en un flujo prácticamente continuo a nivel de las arteriolas.

#### 1.2.1.2. Endotelio morfología y funciones

La célula endotelial es la unidad fundamental del tejido endotelial, consiste en una capa mononucleada, achatada, de forma poligonal que mide unas 30 $\mu$  de diámetro mayor y 10 $\mu$  de diámetro menor (Florey 1966). Vista de perfil presenta un espesor de 3 $\mu$  mientras que periféricamente aparece mucho más fina llegando incluso a no sobrepasar las 0,2 $\mu$  de espesor.

El espesor del endotelio varía según los territorios vasculares y según los distintos órganos con un espesor máximo de 2 - 4 $\mu$  en los capilares de la dermis y en las grandes arterias llegando a valores mínimos en los capilares del músculo estriado, miocardio y sistema nervioso central (Majno 1965).

Bajo el punto de vista topográfico, cada célula endotelial contrae relaciones con las células endoteliales circundantes bien sea por yuxtaposición de las membranas o mediante zonas especiales de la misma membrana.

La superficie luminal de la célula endotelial, merece una atención particular debido a su participa-

ción en los fenómenos de selectividad y en las primeras fases de transporte transendotelial de macromoléculas. Al microscopio electrónico de transmisión (MET) dicha superficie luminal aparece generalmente lisa salvo escasas protuberancias citoplasmáticas que recuerdan a los pseudópodos. En los endotelios de algunos animales, como por ejemplo la aorta del conejo, estas protuberancias se prolongan hasta  $2\mu$  de distancia de la membrana celular.

El microscopio electrónico de barrido o "scanning" (MES) ha revelado que la superficie endotelial es mucho más rica en microvellosidades de lo que aparece en MET, estando orientadas al azar y a veces anastomadas o intrincadas formando imágenes realmente difíciles de interpretar (Weber 1975).

Actualmente tienden a considerarse tres superficies de la célula endotelial: no-trombogénica, adhesiva y cohesiva. La superficie luminal anteriormente descrita correspondería a la no-trombogénica y está desprovista de cualquier tipo de material conectivo electrodensos, sin embargo, posee glicocalix que puede ponerse de manifiesto con técnicas especiales de tinción, como por ejemplo el rojo de Rutenio (Luft 1971, Gerrity et al 1977). La superficie interna o abluminal está adherida al tejido conectivo de la zona subendotelial. Esta superficie contacta con el vaso pudiéndose encontrar condensaciones de filamentos electrodensos denominados hemidesmosomas (Stehbens 1966). Estas organelas junto con los filamentos que se extienden desde la superficie abluminal han sido considerados como zonas de anclaje del endotelio (Leak et al 1972). La tercera superficie es la cohesiva

va que tiene como función unir una célula endotelial a otra, esto se realiza a través de las uniones intercelulares. Morfológicamente estas uniones pueden ser de diferentes tipos dependiendo de la localización del vaso (Simionescu et al 1975) pudiendo estar implicadas en el transporte de información entre células así como participar en los fenómenos de permeabilidad (McNutt et al 1973).

Las células endoteliales se unen entre sí por dos tipos de uniones conocidos por "tight" y "gap junctions". Las "tight junctions" aparecen como zónulas puntiformes, a veces múltiples, en las que las dos láminas externas de la unidad de la membrana se funden originando estructuras pentalaminares (Hüttner, Boutet y More 1973 abcd, Karnowsky 1967). La oclusión de estas uniones no sería completa delimitándose canales de uno  $20 \text{ \AA}$  ocupados por un material de naturaleza mucopolosacárida (Luft 1971).

Las "gap junctions" están formadas por extensas aposiciones de las dos membranas que permaneciendo siempre separadas por un espacio de unos  $20-40 \text{ \AA}$ , dan lugar a una configuración heptalaminar.

La célula endotelial presenta los típicos orgánulos intracitoplasmáticos incluyendo mitocondrias, microtubulos y microfilamentos. Lo más llamativo es la presencia de abundantes vesículas pinocitóticas probablemente relacionadas con una finalidad funcional. Estas son responsables del paso de sustancias desde la luz vascular hacia zonas más internas de la pared (Burns et al 1968). En las regiones en las que las complejas uniones intercelulares estuviesen totalmente ocluidas estas vesículas constituirían el único me

dio de transporte desde la luz al resto de la pared (Hirano et al 1970).

Dentro de los orgánulos intracitoplasmáticos merecen especial atención los cuerpos de Weibel-Palade. Los cuerpos de Weibel-Palade son estructuras de forma elipsoidal o cilíndrica, de aproximadamente  $0,1\mu$  de diámetro y  $3\mu$  de longitud, estando revestidos por una membrana de  $60-80 \text{ \AA}$  de espesor, que encierra en su interior una serie de túbulos de  $150-200 \text{ \AA}$  de diámetro (Weibel y Palade 1964).

La presencia de microfibrillas similares a las miofibrillas de las células musculares lisas, indicaría que la célula endotelial es capaz de contraerse (Majno et al 1969) fenómeno que podría estar implicado con aumentos locales de la permeabilidad por apertura de las "gap junctions".

## FUNCIONES

Dado que el endotelio recubre toda la red vascular siendo en algunos casos prácticamente el único obstáculo entre la sangre y los tejidos circundantes, los fenómenos de difusión especialmente la permeabilidad endotelial va a ser un factor determinante sobre todo cuando esta permeabilidad se vea alterada por condiciones patológicas. La mayor parte de información existente se ha obtenido de los estudios de permeabilidad en capilares, llegándose teóricamente a la conclusión de la existencia de dos sistemas de poros: Unos más pequeños que tendrían un diámetro de unos  $90 \text{ \AA}$  y otros mayores de unos  $500 \text{ \AA}$ .

Morfológicamente, los poros grandes corresponderían a las vesículas, esta idea estaría de acuerdo con los trabajos realizados utilizando ferritina (tamaño  $\approx 110 \text{ \AA}$ ) como marcador (Burns et al. 1968). Sin embargo, Simionescu y Simionescu y Palade 1973 y 1975 respectivamente, demostraron que la teoría de los poros no era del todo cierta pues utilizando mioglobina y hemepéptidos de unos  $20 \text{ \AA}$  de diámetro, observaron que estos también eran transportados por las vesículas. En consecuencia, las vesículas corresponderían en realidad a ambos tipos de poros.

Todo se complica más si se tienen en cuenta las experiencias de Karnowsky en 1970, que utilizando la peroxidasa de rábano picante (tamaño  $\approx 50 \text{ \AA}$ ) como mar ca do r, comprueba que los poros pequeños corresponden en realidad a las uniones intercelulares.

Recientemente Schwartz et al (1980) ha demostrado morfológicamente con MES y MET que las vesículas pinocitóticas se forman a partir de invaginaciones de la membrana plasmática que se proyectan hacia el interior del citoplasma. El tamaño varía entre  $400$  y  $1500 \text{ \AA}$  y la entrada de moléculas en el interior de és tas ca vi da des está regulado por un diafragma situado en el ostium o estoma existente en la superficie. Estas vesículas pinocitóticas son las que de una forma más importante aunque no exclusiva, regularían el transporte de grandes moléculas a través del endotelio.

En realidad parece que la permeabilidad endotelial es la resultante de una serie de combinaciones de los mecanismos hasta ahora expuestos incluyendo el transporte vesicular y sus variaciones, di fu si ón acti

va o pasiva, transporte a través de uniones intercelulares o combinaciones de estas tres (Schwartz et al 1978).

El predominio de uno u otro mecanismo varía incluso dependiendo de los territorios o zonas dentro de un mismo vaso. Lo que sí es evidente es que las zonas de máxima permeabilidad para las proteínas y la ferritina, tienen aumentada la captación de Azul de Evans "in vivo". Estas zonas coinciden a su vez con zonas de intenso recambio (turnover) endotelial o con diferencias metabólicas importantes (Schwartz 1978). Estas áreas azules constituyen a su vez el lugar predilecto para el desarrollo de lesiones arterioscleróticas espontáneas o experimentales (Fry 1973).

En los trabajos de más reciente publicación, se da una gran importancia al papel del glicocalix en la permeabilidad, ya que se ha visto que esta cubierta es más gruesa en las denominadas áreas blancas (menos permeables) que en las áreas azules (más permeables al Azul de Evans). Es también interesante el hecho de que hay una disminución del grosor del glicocalix durante la hipercolesterolemia y fases iniciales de la aterogénesis (Weber et al 1974; Balint et al 1974; Gerrity et al 1979).

## OTRAS FUNCIONES DEL ENDOTELIO ARTERIAL

El endotelio es algo más que una barrera pasiva a la difusión interpuesta entre la sangre circulante y la pared arterial subyacente.

En los últimos años, se ha ido ampliando el conocimiento sobre el amplio espectro de funciones del endotelio vascular. El endotelio vascular, muestra claramente otra serie de intervenciones o características relativamente sofisticadas entre las que se pueden citar:

Facilidad de regeneración o replicación tanto en vivo como en cultivos celulares (Caplan et al 1973, Gimbrone et al 1975, Schwartz et al 1975).

Presencia de una proteínas contráctiles en el citoplasma (Joris et al 1972).

Presencia de activadores de plasminógeno y fibrinolisininas (Pugatch et al 1970); tromboplastinas tisulares (Nemerson et al 1975).

Capacidad para sintetizar histamina (Hollis et al 1972); colágeno o material de la membrana basal (Howard et al 1976); heparina o sulfato de heparitina (Buonassissi et al 1975); factor VIII (Jaffe et al 1973) y ciertas prostaglandinas (Gimbrone et al 1975).

Estas últimas propiedades por su actualidad dentro del tema de arteriosclerosis, serán especialmente consideradas en otro apartado de esta tesis.

Otras funciones del endotelio incluyen la conversión y liberación de la angiotensina (Richardson et al 1971) la captación de serotonina (Shepro et al 1975) y la fagocitosis (Welsh et al 1974). Desde luego debe desterrarse la idea del endotelio como "barrera pasiva" y pensar que el endotelio es una agrupación celular dinámica con funciones y propiedades múltiples, como son, a parte de las ya citadas, la posibilidad de existencia de receptores para las lipoproteínas, fármacos y hormonas, la presencia de actividad lipoproteinlipasa, mecanismo de receptores inmunológicos específicos e incluso de la posibilidad de ejercer un control sobre el metabolismo de las células musculares lisas de la media (Morrison et al 1976).

#### 1.2.1.3. Media y célula muscular lisa

La célula muscular lisa es la única célula que se encuentra en la túnica media de las arterias de los mamíferos.

La importancia de la célula muscular lisa en la enfermedad arteriosclerótica ha ido en aumento desde que Wissler en 1968, centró la atención sobre la misma al observar que era el elemento celular que aparecía en los engrosamientos de la íntima.

#### ASPECTO MORFOLOGICO

Al microscopio óptico la célula muscular lisa de la pared vascular, se presenta en forma de elementos alargados, agrupados entre sí en estratos; las capas

musculares en las arterias de un cierto calibre se disponen en sentido circular o helicoidal respecto al eje del vaso y están separados por membranas elásticas discontinuas.

Aplicando el método de PAS, cada célula aparece circundada por un fino borde PAS-positivo. Al microscopio electrónico, se demuestra que la membrana celular está generalmente envuelta, con la interposición de un estrecho espacio, por una membrana continua, fina y de aspecto fibrilar, reproduciendo las características ultraestructurales de las membranas basales. El núcleo de las células musculares tiende a ser de forma alargada; en el citoplasma se observan mitocondrias en número limitado, situadas habitualmente en zona paranuclear y a veces orientadas en hileras; el retículo endoplasmático rugoso, es bastante escaso y el aparato de Golgi poco evidente; el retículo endoplasmático liso parece prevalecer sobre el rugoso. Es excepcional el hallazgo de cuerpos densos tipo lisosomas.

Destaca una gran abundancia de vesículas de pinocitosis en los contornos de las células y en segundo lugar, distribuidos irregularmente en el citoplasma, pequeños haces de miofibrillas con áreas densas de anclaje situadas en las proximidades del contorno celular. Aún no está aclarado si en la musculatura lisa vascular existen miofilamentos espesos y finos, ni si hay tipos diversos de células, como se ha comprobado respecto a la musculatura estriada; por lo demás es evidente, según estudios efectuados con métodos inmunohistoquímicos, que en la constitución de los miofilamentos participan la actina y la miosina (Knieriem 1970 y 1973).

Los estudios de histoquímica enzimática han demostrado la presencia, en las células musculares, de actividades enzimáticas mitocondriales (deshidrogenasa succínica, málica, B-hidroxibutírica, láctica, etc) pero en cantidad reducida; son muy bajas las actividades de hidrolasas lisosomales tales como la fosfatasa ácida y B-glucuronidasa (Cavallero 1968). Estos datos enzimohistoquímicos que concuerdan con los bioquímicos (Kirk 1969, Zempenyi 1968) documentan junto con las observaciones ultraestructurales, que la musculatura lisa vascular en condiciones normales desarrolla funciones respiratorias, actividades metabólicas y prestaciones energéticas relativamente modestas.

Debe tenerse en cuenta, que la musculatura de la túnica media es abastecida de sangre y de materiales nutritivos a través de los "vasa vasorum" adventiciales sólo en su tercio externo, mientras sus dos tercios internos recibiendo aportes sólo por filtración desde el lumen vasal, se encontrarían en condiciones de hipoxia relativa; aún se discuten las teorías tendientes a la existencia de vasos arterio-luminales que desde la luz arterial penetrarían en el espesor del vaso atravesado por la íntima.

## FUNCIONES

La célula muscular lisa, puede cultivarse con relativa facilidad, lo que ha permitido el mejor conocimiento de su funcionalismo.

En la actualidad, se sabe que la célula muscular lisa es una célula multifuncional, con una importante capacidad sintética y posibilidades de migrar y proliferar (Parker 1966). La célula muscular lisa puede migrar desde la media hasta la íntima, pasando a través de las fenestraciones de la lámina elástica interna (Spaet et al 1975).

A partir de los estudios realizados en cultivos celulares, se ha demostrado que las células musculares lisas son capaces de producir fibras de elastina, fibras de colágeno, material similar a la membrana basal, y glicosaminoglicanos, especialmente sulfato de dermatán (Wight et al 1975).

En la membrana de las células musculares lisas hay receptores específicos para las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que al unirse a ellas (específicamente a su porción apoproteica), regulan la síntesis de Colesterol por la célula y la esterificación del Colesterol  $\beta$  (Goldstein et al 1975 y Weinstein et al 1974). Hollander et al (1974) han demostrado que estas células son también capaces de sintetizar lipoproteínas, ya que in vitro, incorporan a ellas acetato marcado con  $C^{14}$  y Leucina marcada con  $H^3$  cuando son añadidos al medio de cultivo. Las células musculares lisas sintetizan el colágeno tipo I y III (Mc.Gullagh et al 1975).

La matriz fundamental extracelular de la pared arterial está constituida por macromoléculas hidrocarbónicas (glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas), fibras colágenas y fibras elásticas, fabricadas fundamentalmente por las células musculares lisas (Daria Haust 1977).

Los glicosaminoglicanos o mucopolisacáridos ácidos según nomenclatura antigua, constituyen el principal componente de la sustancia intersticial de la pared arterial, y son: el sulfato de dermatán (antes llamado sulfato de condroitina B), el condroitin-4-sulfato, el condroitin-6-sulfato, el sulfato de heparán, el ácido hialurónico y quizá también el sulfato de keratan. Estas sustancias tienen gran afinidad para unirse a las lipoproteínas, sobre todo el sulfato de dermatán, que a su vez es el que se encuentra en mayor concentración en la aorta humana; además limitan el paso de sustancias a través de la pared y poseen propiedades anticoagulantes.

Con la posible excepción del ácido hialurónico, los glicosaminoglucanos de la pared arterial forman complejos con las proteínas formando los proteoglicanos. En los últimos años se ha descubierto y caracterizado un nuevo proteoglicano que está compuesto por sulfato de dermatán y sulfato de condroitina (Radhakrishnamurthy et al 1977). Probablemente los proteoglicanos están asociados de alguna manera a las proteínas, colágeno y elastina; el sulfato de condroitina al colágeno y los sulfatos de dermatán y de heparán a la elastina.

Las glicoproteínas son proteínas unidas en forma covalente al ácido siálico, a las hexosaminas y a azúcares neutros. Las glicoproteínas de la pared arterial característicamente no contienen hidroxiprolina ni hidroxilisina, pero conservan actividades enzimáticas: estearasa, fosfatasa, glucuronidasa e inhibidora de la lipoproteínlipasa.

El contenido en material elástico varía según el tipo de arteria, y así en las arterias elásticas como la aorta, el contenido en colágeno supone el 20% aproximadamente de su peso seco, mientras que en las arterias musculares, como las coronarias, esta proporción llega al 50%. El contenido en colágeno de la íntima aumenta con la edad, sobre todo a partir de la segunda década. Mc.Gullagh (1975) ha encontrado un 30% de colágeno tipo I y un 70% del tipo III en las arterias normales. Esta proporción se invierte en las lesiones arterioscleróticas.

La estrecha relación existente entre la capacidad sintética de la célula muscular lisa y las variaciones de la composición de la sustancia fundamental a lo largo de la enfermedad arteriosclerótica, han hecho pensar en que ambos fenómenos deben de estar relacionados, y posiblemente implicados con otros factores, como la hiperlipemia, la agregación plaquetaria y la proliferación de células musculares, que intervienen en el desarrollo y quizás también en el inicio de la enfermedad. La importancia de estos factores en la concepción actual del problema será convenientemente revisada en otros apartados de esta tesis (Etiopatogenia).

## LAMINAS ELASTICAS

Las células musculares lisas, en desarrollo, de las capas íntima y media de las arterias, secretan el material precursor de la proelastina que forma fibrillas. Parece ser que se produce una polimerización ulterior del material precursor hasta que los espacios que quedan entre las fibrillas de elastina formadas inicialmente se convierten en elastina homogénea y con ellas conectan las fibrillas de proelastina de formación más reciente, siendo visibles, como tales fibrillas, hasta que finalmente se convierten también en material homogéneo, (Robert 1971 et al). El proceso de crecimiento de las láminas elásticas sería por aposisición; las células musculares lisas indiferenciadas se añadirán a la superficie de la elastina homogénea de la lámina que sigue aumentando de volumen.

Las láminas elásticas son fenestradas y es posible que los puntos de fenestración sean los lugares donde, a lo largo del crecimiento, puede producirse el depósito de elastina por aposición.

## 1.2.2. PLAQUETAS

### 1.2.2.1. Ultraestructura y bioquímica

Las plaquetas son los elementos sanguíneos de menor tamaño, en la circulación presentan forma discoide y miden de 2 a 3  $\mu$  de diámetro.

La célula progenitora de las plaquetas es el megacariocito, célula gigante producida por maduración medular del megacarioblasto. Cuando el megacariocito está maduro, por un mecanismo todavía no bien determinado, libera las plaquetas ya formadas a la circulación (Penington 1981). La vida media de las plaquetas es de 3 a 5 días una vez transcurridos los cuales son eliminadas de la circulación por el sistema retículo-endotelial. El número de plaquetas en sangre periférica es de  $300.000 \pm 50.000$  por  $\text{mm}^3$  de sangre y más de una tercera parte de las mismas se almacena en el bazo, constituyendo el llamado pool esplénico.

Al microscopio electrónico de transmisión las plaquetas aparecen delimitadas por una membrana sobre cuya superficie externa se aprecia un revestimiento de 100 a 200 Å de espesor. En el citoplasma se pueden individualizar: mitocondrias, distintos tipos de orgánulos y también dos sistemas canaliculares llamados respectivamente sistema canalicular abierto y sistema tubular denso así como pueden observarse también haces de microtúbulos y microfilamentos. Ver fig. 6.

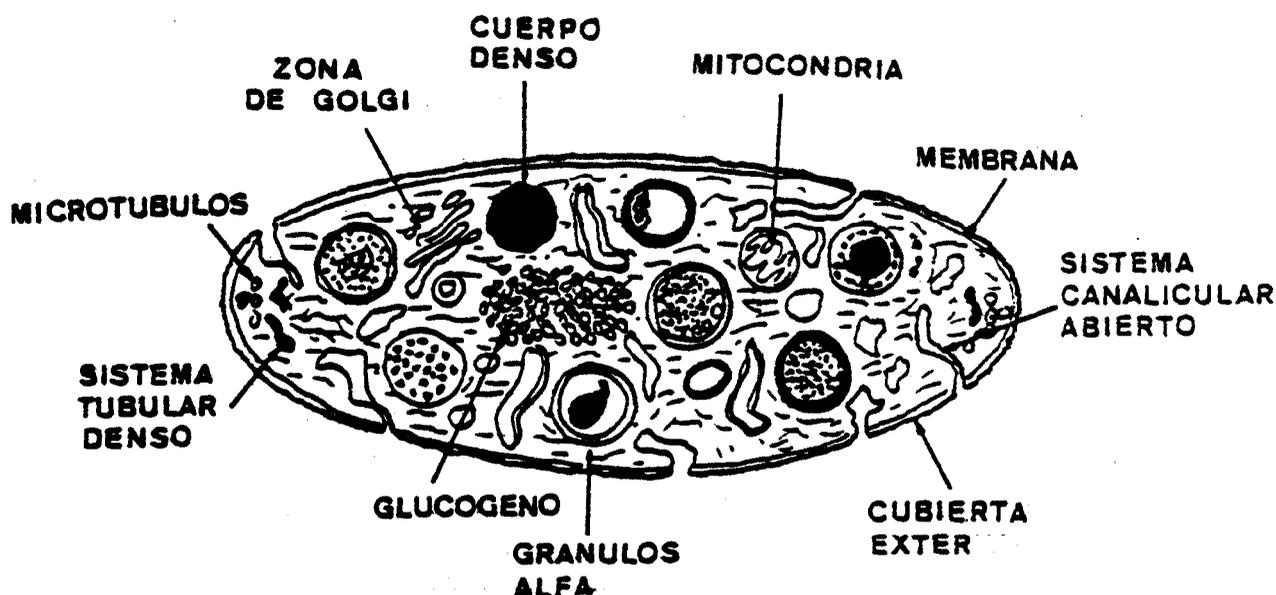


Figura 6. Ultraestructura de la plaqueta

La membrana plaquetaria al igual que otras membranas celulares es una estructura trilaminar de 70 a 90 Å de espesor. La membrana de las plaquetas presenta un revestimiento externo denominado glicocalix, teñible con colorantes específicos constituido principalmente por glicosaminoglicanos y glicoproteínas.

Las glicoproteínas constituyentes de la membrana plaquetaria juegan un importante papel en el funcionamiento de la misma. Desde un punto de vista bioquímico las glicoproteínas están constituidas por una fracción proteica y por cadenas de polisacáridos cuyos restos terminales son el ácido siálico, el cual es derivado del ácido neuramínico (Berndt et al 1981). Hasta el momento presente se han aislado 8 glicoprotei-

nas de las membranas plaquetarias, siendo las glicoproteínas I, II y III las mejor caracterizadas. La glicoproteína I (GPI) tiene un peso molecular de 150.000, la glicoproteína II (GPII) tiene un peso molecular aproximadamente de 135.000 y la glicoproteína III (GPIII) de 103.000. (Nurden et al 1975). Los déficits de glicoproteínas de membrana se han asociado a dos tipos de trombopatias congénitas: la trombostenia de Glanzmann, en la que son deficitarias las glicoproteínas II y III y el síndrome de Bernard-Soulier en el que falta la glicoproteína I. (Nurden et al 1978).

Los lípidos constituyentes de la membrana plaquetaria se encuentran, al igual que en otros tipos de membranas en forma de fosfolípidos.

Se ha demostrado que el ácido graso mayoritario presente en los fosfolípidos constituyentes de las plaquetas humanas es el ácido araquidónico (Marcus et al 1978). Según estudios más recientes (Rittenhouse-Simons et al 1981) del 49 al 55% del araquidonato total esta presente en la fosfatidiletanolamina, distribuido en forma equivalente entre diacil y alquil-1-enil-2-acil-glicerofosfoetanolamina. La fosfatidilcolina contiene de un 26 a un 31% de araquidonato y el fosfatidilinositol y la fosfatidilcolina contribuyen a completar el 14-25% restante.

El araquidonato constituyente de los fosfolípidos plaquetarios tiene una importancia extraordinaria en el funcionalismo de las plaquetas ya que es el precursor de la biosíntesis de Prostaglandinas. Este punto se describirá con más detalle posteriormente.

Subyacente a la cara interna de la membrana, en el plano ecuatorial de la plaqueta cuando esta está en su forma circulante, existe un haz de microtúbulos que forma un anillo periférico alrededor de la plaqueta. Dicha estructura se cree que actúa como un citoesqueleto que mantiene a la plaqueta en su forma discoidea, la estructura de los microtubulos se pierde cuando las plaquetas se activan.

También relacionado con el sistema contráctil están los microfilamentos repartidos de forma regular por todo el citoplasma plaquetario. Tanto los microtúbulos como los microfilamentos forman parte del sistema contráctil plaquetario y son por lo tanto ricos en proteínas contractiles del tipo actina, miosina, actomiosina, troponina y tropomiosina. (Harris 1981). La interacción de estas proteínas la cual tiene lugar al ser activadas las plaquetas, como respuesta a diversos estímulos, es la responsable del rápido e intenso cambio de forma que sufren las mismas.

En el citoplasma plaquetario se observa asimismo el llamado sistema canalicular abierto, conectado con las estructuras de la membrana y abierto al exterior. Este sistema está relacionado con la función secretora de las plaquetas ya que está íntimamente asociado en su parte más interna al sistema tubular denso. Este sistema canalicular abierto incrementa la superficie plaquetaria, lo cual facilita la misión fisiológica de las plaquetas.

Cuando la plaqueta se activa los gránulos citoplasmáticos se fusionan con la parte interna del sistema canalicular y el contenido de los mismos es liberado al exterior (Crawford et al 1976).

La zona denominada sistema tubular denso parece ser la de máxima acumulación de calcio en las plaquetas (Skaer 1981). Al ser la plaqueta estimulada se inicia un flujo de calcio desde dicho sistema al citoplasma lo cual se traduce en la contracción plaquetaria (White et al 1978).

Los orgánulos citoplasmáticos son de tres tipos: gránulos densos,  $\alpha$ -gránulos y lisosomas. Los gránulos densos contienen elevadas concentraciones de aminas principalmente serotonina (5 Hidroxitriptamina), junto con nucleótidos de adenina (ADP y ATP) y cationes divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  y/o  $\text{Mg}^{++}$ ). Puede decirse que toda la serotonina existente en la sangre se encuentra en los gránulos densos, estos la acumulan del plasma (al cual es inicialmente liberada por las células enterocromafines del intestino) mediante un mecanismo de transporte de alta eficiencia (Niewiarowski 1981).

Otro tipo de gránulos secretores lo constituyen los llamados  $\alpha$ -gránulos, el contenido de los mismos es principalmente de naturaleza protéica. Algunas de las proteínas almacenadas en estos gránulos resultan de especial interés tanto por ser proteínas específicas de las plaquetas, como por su posible relación en determinados procesos patológicos entre ellos la aterosclerosis.

Las proteínas específicamente plaquetarias secretadas por los  $\alpha$ -gránulos son: El factor plaquetario 4, la  $\beta$  Tromboglobulina y el llamado factor mitogénico plaquetario.

El factor plaquetario 4 (PF4) es una proteína con acción anti-heparina cuyo peso molecular es de 30.800. La  $\beta$ -Tromboglobulina de peso molecular 35.400 tiene asimismo una debil acción anti-heparina siendo además inhibidora de la síntesis de prostaciclina por las células endoteliales in vitro. El Factor plaquetario 4 de baja afinidad, el cual es estructuralmente idéntico a la  $\beta$ -Tromboglobulina, excepto por un tetrapéptido terminal, parece ser el precursor de la  $\beta$ -Tromboglobulina en la plaqueta (Kaplan 1981).

El llamado factor mitogénico plaquetario (PDGF), es una proteína la cual presenta la capacidad de estimular el crecimiento de las células musculares lisas y de los fibroblastos en cultivo (Ross et al 1978). En recientes estudios se ha observado asimismo que el PDGF estimula el crecimiento de ciertos tipos de células cancerosas. (Hara et al 1980).

En los  $\alpha$ -gránulos también se almacenan otras proteínas no específicas como el fibrinógeno la fibronectina y el Factor VIII-VW (Niewiarowski 1981).

El tercer tipo de gránulos citoplasmáticos relacionados con la función secretora de las plaquetas son los lisosomas, estos son especialmente ricos en hidrolasas ácidas del tipo  $\beta$ -N-acetilglucosamina,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucuronidasa.

En el citoplasma plaquetario aparecen asimismo otro tipo de gránulos aunque estos no tienen función secretora son los gránulos de glucógeno los cuales están relacionados con procesos energéticos de glucólisis plaquetaria. Hay que reseñar sin embargo que la

energía necesaria para el metabolismo intraplaquetario es aportada en su mayor parte por el "pool" citoplasmático de ATP, denominado pool metabólico por contraposición al ATP almacenado en los gránulos densos conocido como pool de almacenamiento.

#### 1.2.2.2. Fisiología plaquetaria

### ADHESION Y AGREGACION PLAQUETARIAS

El proceso conocido como agregación plaquetaria no es otra cosa que un caso específico del fenómeno de adhesión, ya que implica que las plaquetas se adhieren una a otra en lugar de hacerlo sobre una superficie distinta.

Las plaquetas circulantes en condiciones fisiológicas no son reactivas, es decir no se adhieren a la superficie vascular intacta, lo cual es esencial para el mantenimiento de la hemostasia. Cuando las plaquetas se activan estas se adhieren inmediatamente una a otra, en el caso de la agregación o a los elementos subendoteliales de la pared vascular cuando esta está lesionada. Este conjunto de eventos indica que hay una especificidad de superficie relacionada con los fenómenos de adhesión plaquetaria ya que las plaquetas no se adhieren ni a los hematies ni a los leucocitos, a pesar de que se producen constantes colisiones entre ellos, ni tampoco lo hacen sobre la célula endotelial intacta sino que únicamente lo hacen, después de activadas, a otras plaquetas o al subendotelio vascular.

Las plaquetas adheridas al subendotelio de una zona vascular dañada liberan constituyentes capaces de activar a otras plaquetas circulantes, estas últimas una vez activadas se adhieren a la monocapa ya formada y forman un agregado conocido como tapon hemostático o trombo plaquetario.

Parece pues esencial que los mecanismos de adhesión y agregación estén perfectamente regulados ya que el flujo sanguíneo no debe ser modificado por acumulos plaquetarios en la superficie vascular en condiciones fisiológicas y solo en el caso de una lesión vascular se necesita una rápida acumulación de plaquetas en la zona dañada para tapar la abertura del vaso y evitar la hemorragia.

Las reacciones de adhesión y agregación plaquetaria se inician por una variedad de estímulos que interactúan con los receptores de membrana. En la interacción de las plaquetas con la pared vascular el principal estímulo reconocido por las mismas es la presencia de fibras de colágeno, las cuales son constituyentes de las estructuras subendoteliales. Las plaquetas no presentan tan alta afinidad por otros biopolímeros constituyentes asimismo del subendotelio como los proteoglicanos o la elastina lo cual pone de manifiesto la importancia de la especificidad de los fenómenos de adhesión.

La agregación plaquetaria puede ser inducida por una serie de distintos estímulos interactuando con receptores específicos. Estos estímulos incluyen: ADP, catecolaminas, ácido araquidónico y ciertos tipos de prostaglandinas, trombina, inmunocomplejos y elemen-

tos del sistema del complemento. Después de la interacción del estímulo inductor de la agregación con el receptor la primera respuesta observable en la plaqueta es un rápido cambio de forma que consiste en la pérdida de la forma discoidea y centralización de los orgánulos secretores con emisión simultánea de largos y finos pseudópodos, los cuales favorecen el contacto plaqueta-plaqueta fundamental para que se produzca la agregación.

Para que la agregación plaquetaria tenga lugar se precisan varios factores: colisión plaqueta-plaqueta (por lo tanto la agregación no se produciría en un sistema estático) y cofactores extracelulares como calcio iónico y fibrinógeno.

Durante el proceso de agregación tienen lugar asimismo diversas modificaciones en el interior de la plaqueta de las cuales la más importante es la mobilización de los iones de calcio desde sus puntos de almacenamiento al citosol, con la subsiguiente elevación de los niveles de calcio citoplasmáticos, lo cual se traduce en distintas acciones sobre varios sistemas de regulación celular. Este es sin duda en la actualidad uno de los puntos más interesantes y a su vez más oscuros en el conocimiento del metabolismo plaquetario, la información que se dispone hasta el momento permite sin embargo predecir que el conocimiento detallado de los procesos reguladores de la mobilización del calcio darán la clave de muchos aspectos del metabolismo plaquetario no aclarados en la actualidad.

## REACCION DE LIBERACION PLAQUETARIA

Hay dos tipos de reacciones de liberación plaquetaria: la liberación selectiva de los constituyentes de los gránulos secretores (exocitosis o degranulación) y la liberación selectiva de los constituyentes que no están almacenados en gránulos y que son sintetizados y secretados cuando son requeridos. Un claro ejemplo de este segundo tipo es la secreción de los metabolitos del ácido araquidónico.

No todos los gránulos plaquetarios liberan su contenido con la misma facilidad, la liberación de enzimas lisosomales tiene lugar únicamente bajo poderosos estímulos como los inducidos por la trombina o altas concentraciones de colágeno, mientras que el contenido de los gránulos densos (ADP y serotonina) es liberado bajo estímulos débiles) como los inducidos por ADP y catecolaminas. Algunos de los productos de secreción contenidos en los  $\alpha$ -gránulos como  $\beta$ -Tromboglobulina, Factor plaquetario 4 o el Factor mitogénico son liberados incluso con anterioridad al contenido de los gránulos densos, este punto sin embargo sigue sometido a discusión. (Skaer 1981).

## METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN LAS PLAQUETAS

Como ya habíamos señalado el ácido araquidónico es el ácido graso insaturado mayoritario que se encuentra esterificado en la posición 2 de los fosfolípidos constituyentes de la membrana plaquetaria, al objeto de simplificar nos ceñiremos a la metaboliza-

ción del mismo al describir la formación de las prostaglandinas relacionadas con las plaquetas, a pesar de que en la actualidad se sabe que la formación de las series de prostaglandinas derivadas de otros ácidos insaturados es también de gran importancia para la hemostasia en condiciones fisiológicas y patológicas (Harlan et al 1981) (Macintyre 1981).

El proceso de biosíntesis de prostaglandinas en las plaquetas a partir del ácido araquidónico comenzará con la liberación del mismo de los fosfolípidos de la membrana a los cuales se halla esterificado. (Ver fig. 7). Esta liberación es consecuencia de la acción de las fosfolipasas de la membrana plaquetaria. Por el momento se han identificado dos fosfolipasas en las membranas de las plaquetas: la fosfolipasa C, la cual es un enzima soluble que actúa sobre el fosfatidilinositol, liberando un diglicérido del cual es liberado el ácido araquidónico por acción de una diglicérido-lipasa ligada a la membrana. (Billah et al 1980). Este diglicérido puede asimismo ser convertido por acción de una kinasa en ácido fosfatídico, el cual está relacionado con la movilización intracelular de calcio (Gerrad et al 1978).

La fosfolipasa A<sub>2</sub> es una lipasa ligada a la membrana la cual libera el ácido araquidónico de la fosfatidilcolina y de la fosfatidiletanolamina (Billah et al 1978). El complejo de la fosfolipasa C parece ser el de mayor importancia en las plaquetas.

Dado que el ácido araquidónico no se encuentra libre en las plaquetas y una vez liberado es rápidamente metabolizado, parece ser que las fosfolipasas

constituirán el principal mecanismo de control sobre el metabolismo del ácido araquidónico. Estos posibles factores de regulación no están bien determinados por el momento. En las plaquetas la trombina, ADP, colágeno, epinefrina y ciertos cationes ionóforos estimulan la actividad de las fosfolipasas con la subsiguiente liberación de ácido araquidónico. El calcio es un factor esencial para la activación tanto de la fosfolipasa C como de la fosfolipasa A<sub>2</sub>. La elevación de los niveles de CAMP intracelulares inhiben ambos enzimas. (Billah et al 1979).

En las plaquetas una vez el ácido araquidónico está libre puede ser metabolizado por dos rutas alternativas, la de la ciclo-oxigenasa o la de la lipo-oxigenasa. (Marcus 1978). Ver fig. 7.

La lipo-oxigenasa produce ácido 12L-hidroperoxi-5,8,10,14-eicosatetraenóico (HPETE), el cual puede a su vez inhibir a la tromboxano sintetasa (ver más adelante). La reducción del HPETE produce ácido 12 L-hidroxi-5,8,10,14-eicosatetraenóico (HETE) el cual presenta propiedades quimiotácticas para los leucocitos (Goetzl et al 1977).

Por el momento no se conocen para el HPETE y HETE otras relaciones con la fisiología plaquetar, sin embargo se ha observado que si la vía de la ciclo-oxigenasa se bloquea mediante fármacos específicos, el ácido araquidónico se metaboliza en casi su totalidad por la vía de la lipo-oxigenasa con lo cual las plaquetas producen grandes cantidades de HETE. (Hamburger et al 1974).

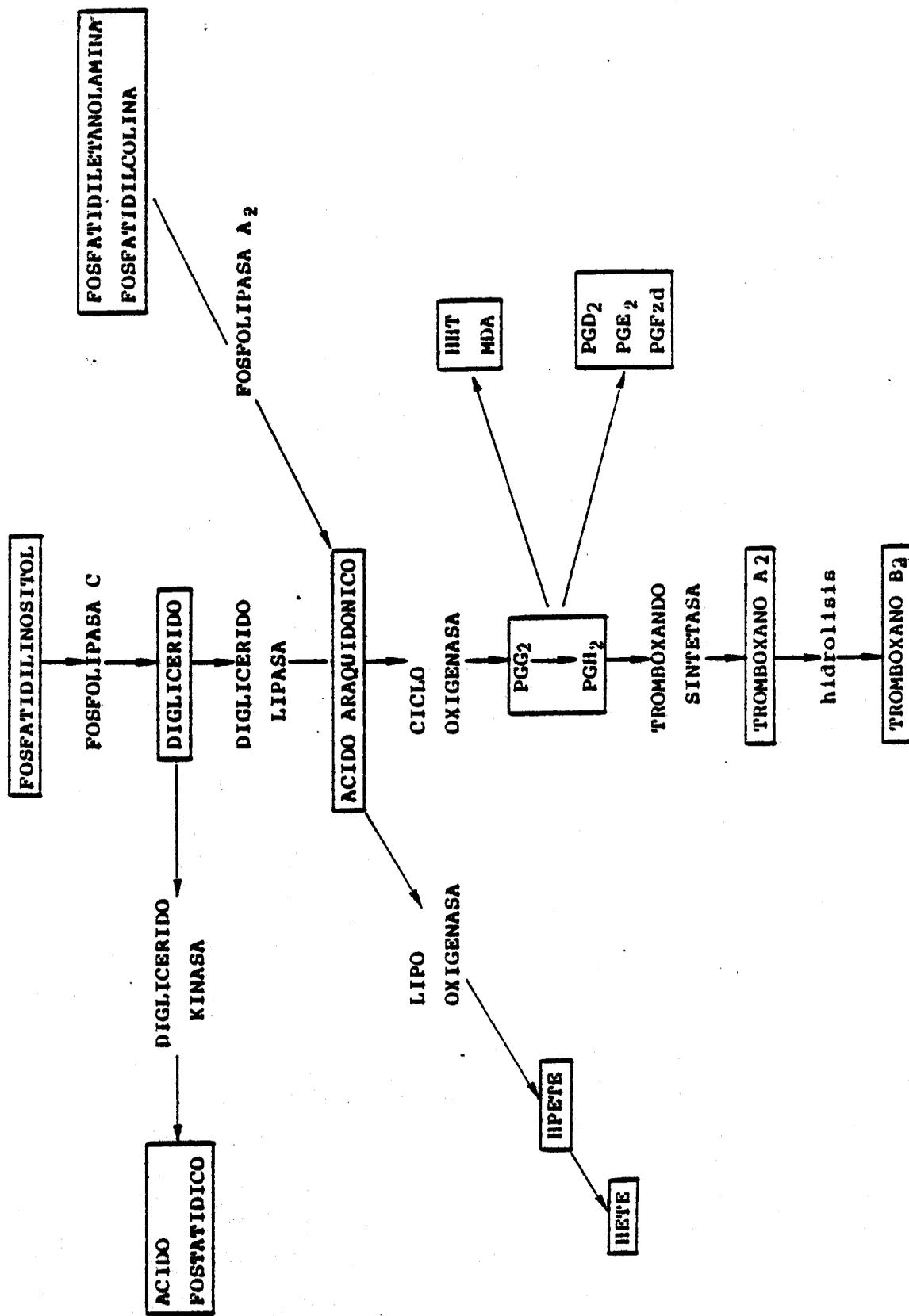


Fig. 7. Metabolismo del ácido araquidónico en las plaquetas

Siguiendo la ruta metabólica de la ciclo-oxigenasa el ácido araquidónico es convertido en los llamados endoperóxidos cíclicos PGG<sub>2</sub> y PPH<sub>2</sub>, estos compuestos son muy inestables y su producción se acompaña de consumo de oxígeno. Su vida media es muy corta aproximadamente 5 min. y pueden fragmentarse espontáneamente en ácido 12 L-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienóico (HHT), el cual es quimiotáctico para neutrófilos, con simultánea liberación de malondialdehído (MDA) (Marcus 1978). Los endoperóxidos cíclicos pueden sufrir transformaciones no enzimáticas y convertirse en las prostaglandinas estables PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>.

Sin embargo en las plaquetas el enzima que principalmente metaboliza a los endoperóxidos cíclicos es la tromboxanosintetasa convirtiéndolos en el compuesto altamente inestable Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), cuya vida media es aproximadamente de 30 segundos en solución acuosa y de 5 min. en plasma. Este compuesto es un vasoconstrictor de potencia equivalente a la Angiotensina II y es el agente agregante más potente conocido hasta el momento. El TXA<sub>2</sub> se convierte espontáneamente en TXB<sub>2</sub> un compuesto estable sin acción biológica. La figura 7 resume las vías de metabolización del ácido araquidónico en la plaqueta.

#### METABOLIZACION DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN LA PARED VASCULAR

La metabolización del ácido araquidónico por las células de la pared vascular (endoteliales, musculares lisas y fibroblastos) no está tan bien caracteri-

zada como en la plaqueta. (Fig. 8). Las modificaciones químicas y mecánicas de la pared vascular producen activación de las fosfolipasas asociadas a las membranas celulares con la subsecuente liberación de ácido araquidónico. Por el momento no hay pruebas de la existencia de la vía alternativa de la lipo-oxigenasa en la pared vascular. El ácido araquidónico libre se convierte rápidamente en los endoperóxidos cíclicos por acción de la ciclo-oxigenasa. Una parte de estos endoperóxidos es convertido en prostaglandinas estables, principalmente  $PGE_2$ . Algunas células de la pared vascular contienen asimismo tromboxano-sintetasa y son por lo tanto capaces de producir  $TXA_2$  en pequeñas cantidades. (Ally et al 1980).

El metabolito principal del ácido araquidónico en la pared vascular es la Prostaciclina ( $PGI_2$ ). Los endoperóxidos cíclicos son rápidamente convertidos por la enzima prostaciclinsintetasa en  $PGI_2$ , la prostaciclina presenta una marcada acción vasodilatadora y es el antiagregante mas potente que se conoce. (Moncada et al 1976). Su mecanismo de acción parece estar relacionado con la elevación del cAMP por estimulación de la adenilato ciclasa. (Tateson et al 1977).

La Prostaciclina es lábil al calor y al ph ácido y tiene una vida media de aproximadamente 3 minutos a  $37^\circ$  en solución acuosa y ph 7,4 y ligeramente superior en plasma. La prostaciclina es hidrolizada a un compuesto estable e inactivo la 6-ceto- $PGF_1$  in vitro. In vivo se producen asimismo cantidades significativas de otros metabolitos. La producción de Prostaciclina ha sido identificada en los tres tipos de células constituyentes de las estructuras vasculares. (Baenziger et al 1979).

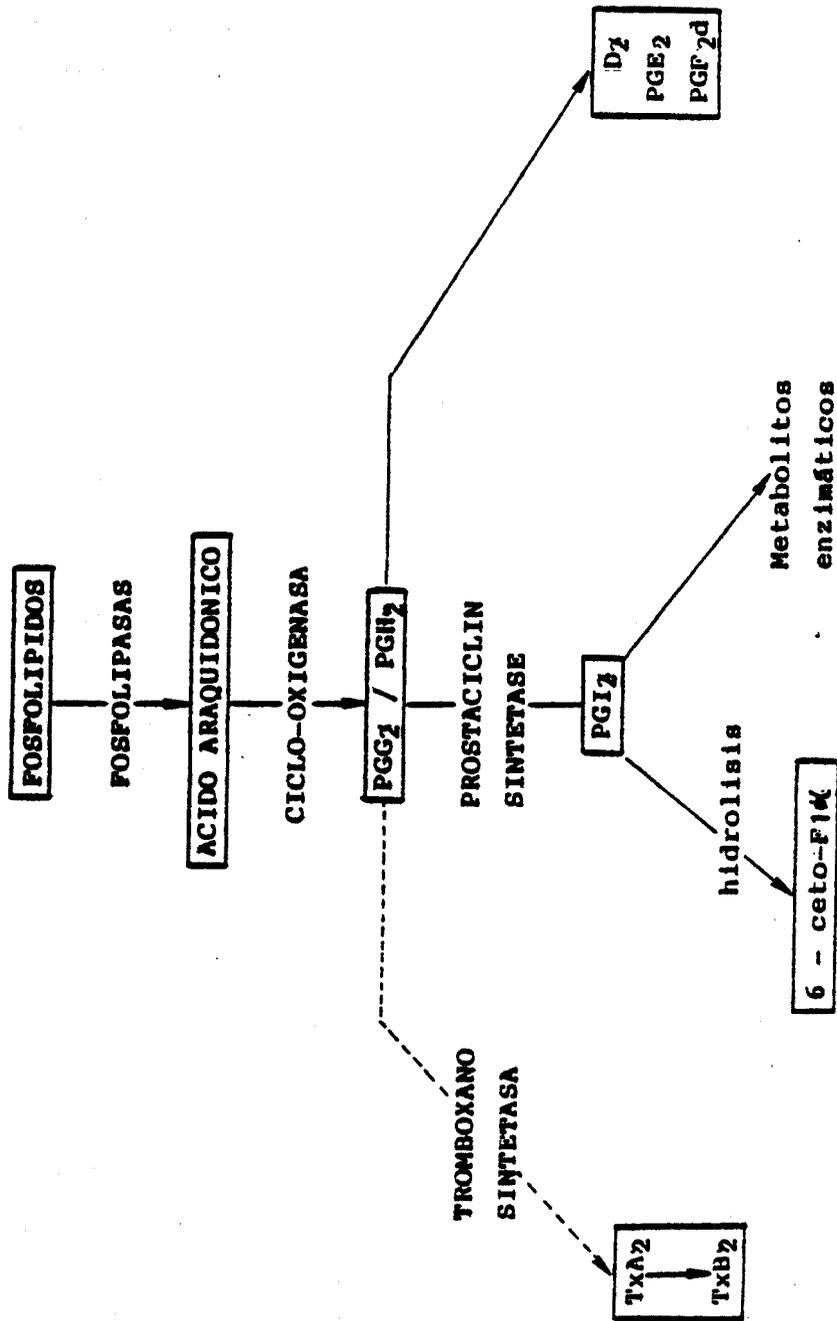


Fig. 8. Metabolismo del ácido araquidónico en la pared vascular.

## PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN LA HEMOSTASIA

La principal función de las plaquetas es iniciar el proceso hemostático, que comienza por la formación del tapón hemostático en el punto de lesión vascular, siguiendo esta fase las plaquetas contribuyen a activar el mecanismo de la coagulación en la zona dañada, con la subsecuente formación de mallas de fibrina que consolidaran el tapón plaquetario previamente formado.

Tal como se ha citado la formación del tapón plaquetario depende de la adhesión de las plaquetas al subendotelio lesionado, interacción mediada por la afinidad de las plaquetas al colágeno presente en las estructuras subendoteliales, y de la posterior acumulación de plaquetas en la monocapa inicial (agregación). Esta segunda parte tiene lugar como consecuencia de la activación de las plaquetas constituyentes de la monocapa inicialmente adherida, las cuales liberan sus constituyentes tales como ADP, metabolitos del ácido araquidónico y serotonina, productos que activarán a su vez a las plaquetas circundantes.

El calcio iónico y el fibrinógeno, ambos importantes cofactores de la agregación plaquetaria, son asimismo liberados durante esta fase y la trombina generada durante el proceso de la coagulación es a su vez un potente estimulante plaquetario y el catalizador de la polimerización del fibrinógeno en fibrina.

Las plaquetas contribuyen a la activación del mecanismo de la coagulación por tres distintos mecanismos: Por exposición de un fosfolípido complejo presente en la membrana plaquetaria, el denominado Factor

plaquetario 3 (PF3); por secreción de proteínas procoagulantes como el fibrinógeno y el Factor plaquetario 4 de sus  $\alpha$ -gránulos y finalmente por activación del Factor XI de la coagulación, presente en la membrana plaquetaria. Este factor de la coagulación se activa cuando las plaquetas entran en contacto con el colágeno subendotelial (Gordon 1981).

### 1.3. PARED ARTERIAL LESIONADA

### 1.3.1. INICIO DE LAS LESIONES. LESIONES PRECOCES

Hasta hace unos años, cuando normalmente se hablaba de lesiones iniciales de la arteriosclerosis, se podía suponer que se estaba haciendo referencia a las estrias grasas visibles microscópicamente o, en el mejor caso, del edema o engrosamiento de la íntima, visible con el microscopio óptico. En la actualidad, la notable mejora de los métodos de observación, ha hecho variar las perspectivas. La introducción de la Microscopía electrónica (M.E.) ha permitido el estudio de alteraciones mucho más precoces. Simultáneamente con la M.E. se ha desarrollado una tecnología sofisticada en cuanto a procedimientos de fijación y preparación de muestras, que paradójicamente, limita su aplicación práctica y así nos encontramos con el hecho de que el estudio de lesiones precoces en humanos es prácticamente imposible dado que una muestra procedente de una biopsia o de una pieza de necropsia obtenida legalmente, presenta alteraciones en el transcurso de unos minutos que ya de por sí pueden falsear la imagen que pueda obtenerse.

Debido a estos problemas, los conocimientos que actualmente disponemos sobre las lesiones precursoras cuando todavía no es detectable la lesión por microscopía (M.O.) proceden casi exclusivamente de las observaciones realizadas en modelos experimentales.

Para muchos autores, con los conocimientos actuales parece lógico suponer que las alteraciones que preceden a la arteriosclerosis, deben estar centradas a nivel de la interfase sangre/endotelio, en consecuencia, cabe esperar que las primeras alteraciones morfológicas tengan lugar a nivel del endotelio.

El microscopio electrónico de "scanning" (M.E.S.) es uno de los instrumentos que facilita el estudio de estas alteraciones, ya que posee una elevada resolución y capacidad para explorar áreas extensas.

#### ALTERACIONES MORFOLOGICAS PRIMARIAS DEL ENDOTELIO

Para Harker Glomset y Ross (1976), la pérdida de integridad endotelial es de gran importancia para el inicio y desarrollo de la arteriosclerosis, esta idea ha sido también mantenida por otros autores, Constantinides (1970) Spaet et al (1970) McGill (1971).

Se han observado lesiones arterioscleróticas cuando se lesiona repetidamente el endotelio, de tal forma que se producen pérdidas de endotelio que no pueden ser convenientemente repuestas (Sholley et al 1977). La pérdida de células endoteliales es una de las alteraciones que precedería a la lesión arteriosclerótica, de hecho se sabe que las zonas en las que normalmente aparecen lesiones arterioscleróticas corresponden con zonas de turbulencias en las que el recambio del endotelio está aumentando (Fry 1973).

Producir lesiones endoteliales experimentalmente, es relativamente fácil, son muchos los agentes que pueden producirlas; por ejemplo, una sola dosis de Cadmio produce cavidades interendoteliales de hasta 5000 Å secundarias a las dilataciones de los espacios interendoteliales (Gabbiani 1974).

Para Nelson et al (1976), las primeras alteraciones detectables mediante M.E.S. serían lo que el denomina cráteres de las células endoteliales. Estas lesiones que pueden encontrarse en animales alimentados con dietas ricas en Colesterol, serían similares a las que

pueden encontrarse normalmente en las zonas de bifurcación, sometidas a variaciones hemodinámicas.

D. Gertz et al (1979) han observado mediante M.E.S. que cuando se lesiona la arteria carótida del conejo con unas pinzas especiales se produce pérdida de endotelio en la zona de máxima compresión, mientras las zonas próximas presentan alteraciones del tipo de cráteres y defectos vesiculares con aspecto de globo colapsado. En estos mismos animales, se ha observado la aparición de fibrina y leucocitos y el atrapamiento de glóbulos rojos en las zonas de máxima lesión.

Otros autores han observado la presencia de fragmentos de glicocalix, fibrina así como plaquetas y células blancas mononucleares, adheridas a las zonas arteriales lesionadas, de conejos sometidos a dieta hipercolesterolémica (Weber et al 1973, Fuchs 1977), datos que coinciden con los observados por los otros autores.

En conejos tratados con ACTH, Maca y Hoak (1974) han observado agregación de plaquetas y lesión endotelial con vacuolización citoplasmática y tumefacción mitocondrial asociada, en zonas con edema subendotelial.

Gaynor et al (1970) y Gerrity et al (1975) han referido lesiones similares en las que aparece siempre pérdida de endotelio y adhesión de plaquetas a las estructuras subendoteliales.

Freudenberg et al (1975) han observado proliferación de células endoteliales en la aorta de ratas tratadas con endotoxina, esta reacción ha sido interpretada como un fenómeno de reparación en áreas de endotelio lesionado propiciado quizás por el efecto mitogénico de la endotoxina.

La hipoxia puede causar lesiones en la íntima que se acompaña de incremento en la permeabilidad, (Constantinides et al , 1969). Tras breves períodos de anoxia Garbasch et al (1969) han observado lesiones arterioscleróticas en la aorta del conejo. Kjeldsen et al (1975) utilizando M.E.T. y M.E.S. ha referido desorganización y lesión de células endoteliales con edema del subendotelio.

Las células musculares lisas próximas a la luz aórtica, presentan formaciones pseudopódicas y producción aumentada de elastina y colágeno. La inhibición por sustancias plasmáticas alcanza su máximo el 29 día tras la lesión por hipoxia (Kerenyi et al 1975).

La exposición crónica al CO estudiada por M.E.S. presenta alteraciones del endotelio idénticas a las producidas por la hipoxia. Kjeldsen et al (1972) utilizando M.E.T. han encontrado engrosamiento por edema de la superficie de la íntima, disrupción de finas estructuras y engrosamiento del endotelio. En monos (*Macaca irus*) expuestos al CO durante dos semanas Thomsen (1974) observó edema subendotelial en las arterias coronarias y aparición de separaciones (gaps) entre células endoteliales y células cargadas de lípidos en el espacio subendotelial (monocitos).

En los primeros estadios de la hipertensión experimental en la rata Huttner et al (1973) han observado un incremento en la penetración de componentes plasmáticos en el interior de la íntima aórtica, a través de las uniones intercelulares (gap junctions) y del transporte vesicular. Según este autor existirían diferencias entre regiones y así la aorta torácica sería más permeable que las arterias ilíacas.

La hipoxia puede causar lesiones en la íntima que se acompaña de incremento en la permeabilidad, (Constantinides et al , 1969). Tras breves períodos de anoxia Garbasch et al (1969) han observado lesiones arterioscleróticas en la aorta del conejo. Kjeldsen et al (1975) utilizando M.E.T. y M.E.S. ha referido desorganización y lesión de células endoteliales con edema del subendotelio.

Las células musculares lisas próximas a la luz aórtica, presentan formaciones pseudopódicas y producción aumentada de elastina y colágeno. La inhibición por sustancias plasmáticas alcanza su máximo el 29 día tras la lesión por hipoxia (Kerenyi et al 1975).

La exposición crónica al CO estudiada por M.E.S. presenta alteraciones del endotelio idénticas a las producidas por la hipoxia. Kjeldsen et al (1972) utilizando M.E.T. han encontrado engrosamiento por edema de la superficie de la íntima, disrupción de finas estructuras y engrosamiento del endotelio. En monos (*Macaca irus*) expuestos al CO durante dos semanas Thomsen (1974) observó edema subendotelial en las arterias coronarias y aparición de separaciones (gaps) entre células endoteliales y células cargadas de lípidos en el espacio subendotelial (monocitos).

En los primeros estadios de la hipertensión experimental en la rata Huttner et al (1973) han observado un incremento en la penetración de componentes plasmáticos en el interior de la íntima aórtica, a través de las uniones intercelulares (gap junctions) y del transporte vesicular. Según este autor existirían diferencias entre regiones y así la aorta torácica sería más permeable que las arterias ilíacas.

En contraposición Gabbiani et al ( 1975) han comprobado que en los estadios posteriores de la hipertensión, el paso de macromoléculas a través de las células endoteliales puede encontrarse disminuido. Hutnner et al (1973) habían observado la aparición de prominencias a nivel de las uniones intercelulares ("gap junctions") simultáneamente con esta observación se ha encontrado un llamativo incremento en la cantidad de microfilamentos de actina de las células endoteliales. Estos hallazgos significarían una posible respuesta adaptativa de las células endoteliales frente a incrementos de la presión sanguínea arterial.

Algunos autores como Shimamoto(1977) han relacionado la capacidad contráctil de las células endoteliales y variaciones de la permeabilidad como fenómenos iniciales de la lesión arteriosclerótica.

Las lesiones endoteliales y cambios en la permeabilidad también están presentes en algunas alteraciones inmunológicas según ha sido referido por Poston y Davies en una revisión realizada en 1974. Yamaguchi et al (1973) han descrito la presencia de vacuolización y edema sub-endotelial en capilares pulmonares de ratas a las que se les había administrado previamente inmunocomplejos solubles.

Minick e Insull (1973) utilizando M.E.S. han descrito la aparición de separaciones entre las células endoteliales en arterias coronarias de conejos que habían recibido inyecciones endovenosas de suero de caballo con un intervalo de 16 días.

En este último caso se encuentran también plaquetas y leucocitos adheridos a la superficie endotelial de las ramas de unión; los leucocitos probablemente están

recubriendo huecos o defectos del endotelio. En alteraciones del estado inmunológico también existe incremento de la aterogénesis, tal como ha sido confirmado por Lamberson y Fritz ( 1974 ).

La participación de leucocitos en las alteraciones iniciales ha sido señalada también por Robertson(1980) que considera este fenómeno de importancia en la génesis de posteriores lesiones.

Por otra parte Baumgartner et al (1976) ha podido observar de una forma dinámica la interacción sangre/endotelio lesionado en una cámara especialmente diseñada en la que pueden simularse las diferentes condiciones fisiológicas. Según sus resultados cuando un vaso es desprovisto de su endotelio mediante un cateter especial en los primeros 39 segundos puede observarse algunas plaquetas en contacto con la zona lesionada. A los 10 minutos ya toda la superficie cubierta por plaquetas y pueden verse trombos de plaquetas en relación con estas zonas. A los 40 minutos estos trombos desaparecen prácticamente y solo persiste una monocapa de plaquetas que aparentemente no es trombogénica para el resto de plaquetas circulante. Estos datos han podido ser comprobados tanto en experiencias "in vitro" como "in vivo".

La adhesión de plaquetas parece ser uno de los primeros acontecimientos tras la lesión del endotelio. Hasta hace poco no se concebía la posibilidad de que las plaquetas pudieran adherirse al endotelio; En la actualidad existen varias observaciones en las que se admite la posibilidad de que puedan producirse depósitos de plaquetas en zonas de endotelio aparentemente intacto en su aspecto morfológico Born (1978 ); resulta llamativo comprobar que estas zonas corresponden con zonas de máxima permeabilidad de las aortas normales (Jorgesen et al 1973) y en lugares

de máximo "stress" reológico del árbol arterial. Zonas quizás alteradas metabólicamente en las que de hecho el estudio ultramicroscópico ha demostrado la presencia de lesiones endoteliales mínimas (Ashford et al 1968).

### 1.3.2. EVOLUCION DE LAS LESIONES

Para poder entender mejor los mecanismos celulares implicados en la génesis del complejo espectro de lesiones arterioscleróticas, la mayoría de los patólogos hasta los años 1960 han intentado reconstruir la historia natural de las lesiones arterioscleróticas observando las características de las lesiones en pacientes que morían a diferentes edades (Klotz et al 1911, Aschof et al 1924, Zinserling 1935, Clawson 1941, Lober 1953, Enos et al 1955, Roberts et al 1959). Se admite que las "Estrías grasas", lesiones de la íntima arterial visibles a simple vista como manchas o líneas amarillas teñibles por el Sudan IV, serían las primeras lesiones macroscópicas identificables de la arteriosclerosis.

Las estrías grasas se encuentran frecuentemente localizadas en las bifurcaciones de las arterias. Se ha aceptado también que algunas estrías grasas podría progresar hacia "placas fibrosas" descritas como lesiones de la íntima consistentes, grises, pálidas, que a veces contienen una masa amorfa amarillenta y que se denomina ateroma. Estas lesiones a su vez pueden progresar hacia las llamadas "lesiones complicadas" con trombosis, ulceración, calcificación y aneurismas.

A finales de los años 50 y principios de los 60, estudios exhaustivos realizados por Holman et al (1958) Strong y McGill (1963) en más de 2000 casos de autopsia en Nueva Orleans, demuestran que las estrías lipídicas

en la aorta se presentan en muchos niños de menos de 3 años de edad y en todos los niños de más de 3 años. Estos mismos investigadores (1963) observaron que las estrías grasas coronarias eran raras antes de los 10 años de edad, pero empezaban a ser frecuentes en la segunda década de la vida y se presentaban casi constantes después de los 20 años de edad. Las placas fibrosas y otras lesiones más avanzadas podían aparecer sobre la tercera década de la vida y las lesiones complicadas con sus complicaciones clínicas hacían su aparición sobre la cuarta década de la vida. En estudios realizados por el " International Atherosclerosis Project" (McGill 1968) que se llevaron a cabo en 14 países con 19 grupos raciales diferentes, con la finalidad de conocer la incidencia y describir la historia natural de las lesiones arterioscleróticas aórticas y coronarias, a partir de las autopsias de pacientes fallecidos pertenecientes a las diferentes poblaciones. En el estudio fueron evaluadas 23.000 piezas anatómicas correspondientes a 23.000 arterias coronarias; los resultados de los exámenes realizados demostraron que las estrías grasas eran un fenómeno universal en personas jóvenes de todos los grupos raciales y geográficos pero su evolución hacia placas fibrosas y lesiones complicadas podía variar en lo que hacía referencia a incidencia y extensión, dependiendo según los diferentes grupos étnicos y geográficos.

#### EVOLUCION HISTOPATOLOGICA

La secuencia de los cambios ultraestructurales en la arteriosclerosis espontánea, particularmente de las lesiones primarias, ha sido aclarada por los grupos de McGill (1963), Daoud (1964), Knieriem y Wissler (1968), y Haust (1971) que a través del microscopio óptico, electrónico y utilizando diferentes técnicas histoquímicas, ha estudiado los diferentes tipos de lesiones arterioscleróticas en pacientes que murieron a distintas edades.

Por ello actualmente está ampliamente difundido el criterio de que una de las primeras lesiones microscópicamente detectables en la arteriosclerosis, es la proliferación en la íntima de células musculares lisas (National Heart an Lung Institute Task Force on Arteriosclerosis 1971) y habiéndose señalado que en muchos casos estas lesiones pueden encontrarse en forma de "engrosamientos" de la íntima en niños recién nacidos o en edades muy tempranas (Marchand 1904, Dock 1946, Scott 1979, Velican et al 1979).

Inicialmente las células podrían proliferar sin que todavía sea posible demostrar la presencia de lípidos libres en las células o en los tejidos extracelulares (Knieriem 1967). Con la progresión de la lesión, las grasas o lípidos libres aparecen frecuentemente en las células de la íntima y posteriormente en el espacio extracelular, (Knieriem 1968) cuando el incremento de las "estrías grasas" empieza a ser demostrable macroscópicamente.

La progresión de esta lesión se caracteriza por la aparición de un abundante tejido fibroso en la íntima, estamos ya en la placa fibrosa, a partir de este punto es fácil encontrar material fibroso abundantes "células grasas espumosas" y acumulaciones de lípidos; este complejo histopatológico fue denominado ateroma por Marchand (1904). Las lesiones más avanzadas presentan en general un predominio del tejido fibroso sobre el depósito de lípidos (McGill et al 1963, Knieriem et al 1968) y pueden progresar hacia lesiones complicadas por la aparición de trombosis, ulceración, calcificación o aneurismas. ( Ver Figura, 9).

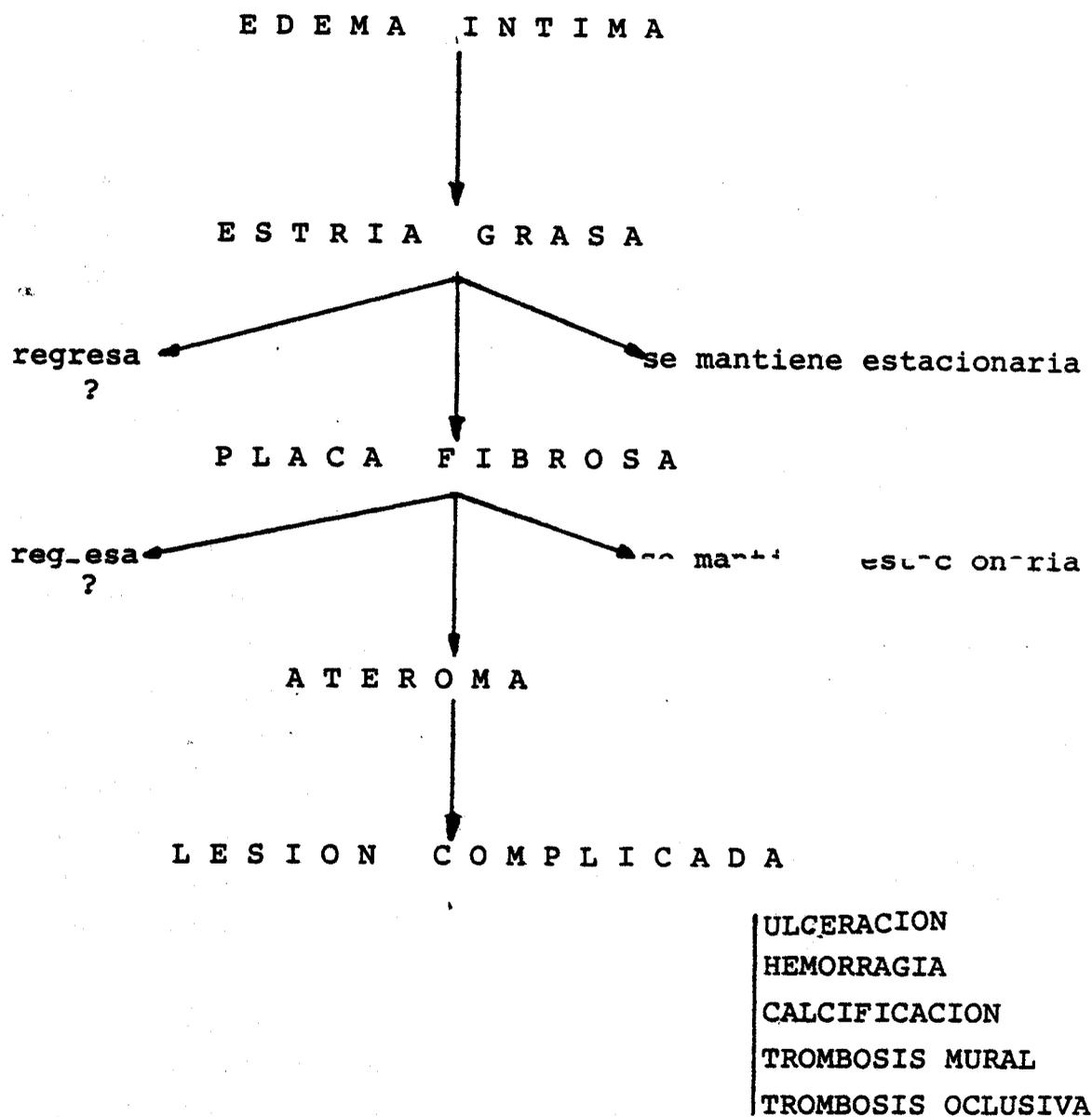


Fig. 9 - Esquema de la posible evolución de las lesiones en la arteriosclerosis.

## FIBROSIS Y TROMBOSIS - LA PLACA ARTERIOSCLEROTICA AVANZADA

La formación de tejido fibroso contribuye significativamente a la formación de la placa arteriosclerótica avanzada (Roberts 1972). Los elementos que constituyen este tejido fibroso son: Colágeno, proteoglicanos, elastina y glicoproteínas. La formación de colágeno constituye la mayor contribución para el crecimiento de la placa arteriosclerótica. Sobre este tema se han publicado varias revisiones que sumarizan la secuencia de acontecimientos para esta deposición de colágeno (Grant et al 1972, Miller et al 1974, Nimni 1974, Robert et al 1974, St. Clair 1976, Srinivasan et al 1979). De los diferentes tipos de colágeno, el tipo I es el componente primario de la placa (McCullagh et al 1975) y es sintetizado por las células musculares lisas de la arteria (Ross y Klebanoff 1971). De los glicosaminoglicanos (Mucopolisacáridos ácidos) parece que el dermatan sulfato, antiguamente conocido como condroitín sulfato B es el principal componente presente en la placa arteriosclerótica (Hermelin 1974) y es sintetizado por las células musculares lisas de la arteria (Wight 1973). Tal como se ha mencionado, los glicosaminoglicanos parecen ser importantes en la fijación de lípidos en la pared arterial (Iverius 1972, Morris 1978, Srinivasan 1979).

La concentración de elastina en las placas arterioscleróticas es más baja que la que normalmente existe en las arterias normales (Kramsch 1971). Sin embargo, se ha sugerido que la pared arterial arteriosclerótica tiene una elastina anormal (Ross y Glomset 1976) y parece ser sintetizada por las células musculares lisas arteriales (Ross 1971), (Carnes 1974). Las fibras de elastina podrían ser importantes en la unión de lípidos a la pared arterial y además contribuirían significativamente al proceso de calcificación de la placa arteriosclerótica (Urry 1974, Yu 1974).

Las glicoproteínas comprenden una familia de proteínas que contienen carbohidratos en su estructura, y que en contraste con los aminoglicanos, contienen relativamente más proporción de proteína. Aunque existe una conformidad general respecto a la existencia de un incremento en la concentración de glicoproteínas en la placa arteriosclerótica (Roberts 1974) poco se conoce sobre su mecanismo de síntesis. Las glicoproteínas parecen ser importantes en algunas interacciones con el colágeno (Fisher et al 1980) y fibras elásticas (Robert 1974). El estímulo específico para la formación de tejido fibroso de la arteriosclerótica avanzada no está claro. Es importante considerar que la mayoría de placas fibrosas progresan muy lentamente. Si la lesión endotelial y la deposición plaquetaria, conducen a la proliferación de células musculares lisas y formación de "tejido fibroso", se trataría de un proceso crónico continuo, esto explicaría probablemente porque las placas fibrosas arterioscleróticas, generalmente, progresan muy lentamente. En general, esta concepción del problema implicaría que la lesión endotelial y la deposición plaquetaria no solo conduce a la migración y proliferación de células musculares lisas, sino también a la síntesis de componentes del tejido fibroso. Además parece que la distensión pulsátil continuada de la región arterial, también favorece la síntesis de Colágeno por las células musculares lisas (Iwatsuki et al 1977, Fischer 1980) y de este modo a la lenta progresión de la placa arteriosclerótica.

En algunos pacientes las placas arterioscleróticas progresan rápidamente, quizás en estos casos, un mecanismo trombogénico podría jugar un papel destacado.

Según esto la presencia de plaquetas y la formación de trombos se produciría sobre las placas arterioscleróticas (Smith 1976, Warren 1978). Ocasionalmente algún trombo puede sufrir un proceso de fagocitosis, endotelización y transformación aterógena-fibrótica (Duguid 1949, Mitchell et al 1963, Chandler et al 1974, Fulton et al 1977, Fuster 1982). Esta transformación fibrótica del trombo arterial parece que puede contribuir a un proceso de arteriosclerosis acelerado.

Hasta ahora no está claro si un fallo en el sistema fibrinolítico a nivel del lugar donde se produce de arteriosclerosis, puede contribuir a la formación del trombo (Astrup 1956, Bordia et al 1977, Kadish 1979). Es probable que esta organización fibrótica del trombo depende también de la activación de las células musculares lisas, no solo por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Ross et al 1974, Rutherford et al 1976) sino además probablemente por la propia fibrina (Nicwicrowski et al 1973, Smith et al 1976) y también por la trombina y plasmin generada en trombos de la media.

**COMPLICACIONES: CALCIFICACIÓN, ULCERACION, ANEURISMA, TROMBOSIS AGUDA, OCLUSION Y EMBOLIZACION**

La calcificación de las arterias parece estar en función de la edad, pero también esta claramente incrementada en las lesiones arterioscleróticas. Las fibras de elastina anormales de las placas arterioscleróticas parecen ser importantes en el proceso de calcificación (Urry 1974).

Las arterias que tienen lesiones arterioscleróticas avanzadas demuestran una fragmentación de sus elementos elásticos (Yu et al 1967). Esto junto a la alteración bioquímica de las fibras elásticas en la enfermedad arteriosclerótica parece crear las condiciones para la

ulceración superficial con la siguiente formación trombótica (Chapman 1969, Chandler et al 1974). Además esta degeneración de los elementos elásticos debilita la pared arterial e incrementa la posibilidad de formación de aneurismas ( Yu et al 1967 ) muchas veces con la subsiguiente formación del trombo.

Otra complicación de las placas arterioscleróticas es la que se produce cuando un trombo arterial ocluye repentinamente la luz vascular de una forma total o subtotal. Esto conduce casi siempre a manifestaciones clínicas agudas o subagudas. Un ejemplo clásico es la oclusión trombótica coronaria que generalmente conduce a un infarto de miocardio. Además la formación de un trombo en un lugar de la placa arteriosclerótica puede desprenderse y embolizar en ramas arteriales más distales. Los ejemplos clásicos son los accidentes cerebrovasculares agudos o la oclusión arterial de una rama periférica que suele producirse en pacientes con lesiones ulceradas trombóticas por arteriosclerosis de las arterias carotídeas o de la aorta abdominal.

#### 1.4. ETIOPATOGENIA

#### 1.4.1. VISION HISTORICA

Históricamente han existido dos hipótesis principales en torno a la etiopatogenia de la arteriosclerosis. La primera de ellas fue propuesta en el año 1852 por Rokitansky y es conocida también como hipótesis de la incrustación o teoría trombogénica. La segunda hipótesis fue ya originalmente denominada teoría de la imbibición o insudación, el autor de la misma fue Virchow en 1856 (ver Virchow 1971).

#### HIPOTESIS DE LA INCRUSTACION

La hipótesis propuesta por Rokitansky concede un papel primordial a la trombosis, según esta teoría, la placa arteriosclerótica empieza siendo un pequeño trombo mural que se va transformando en una masa de tejido incorporado a la íntima. A medida que las células de la pared arterial emigran hacia su interior se multiplican y segregan sustancias celulares características. Esta teoría ha sufrido modificaciones con el tiempo; Mallory en 1913 y Clark en 1936, pero no llegó a ser considerada hasta el trabajo realizado por Duguid (1946). Esta hipótesis sugiere que las placas arterioscleróticas elevadas son el resultado de la organización y endotelización de un trombo mural (Clark, 1936, Duguid, 1946, Mustard 1969). Dentro de este contexto se hace referencia a los trombos plaquetarios o a los tapones hemostáticos; las plaquetas estarían relacionadas también con la iniciación de la coagulación sanguíneas "in vivo" produciendo trombos. La principal objeción a esta teoría ha sido la acumulación de lípidos que suele darse naturalmente en muchas ocasiones (estrias lipídicas), sin embargo, se ha dicho que esta acumulación de lípidos es secundaria o mejor sería un factor que aceleraría el desarrollo de fibrosis en la íntima.

#### HIPOTESIS DE LA IMBIBICION O INSUDACION

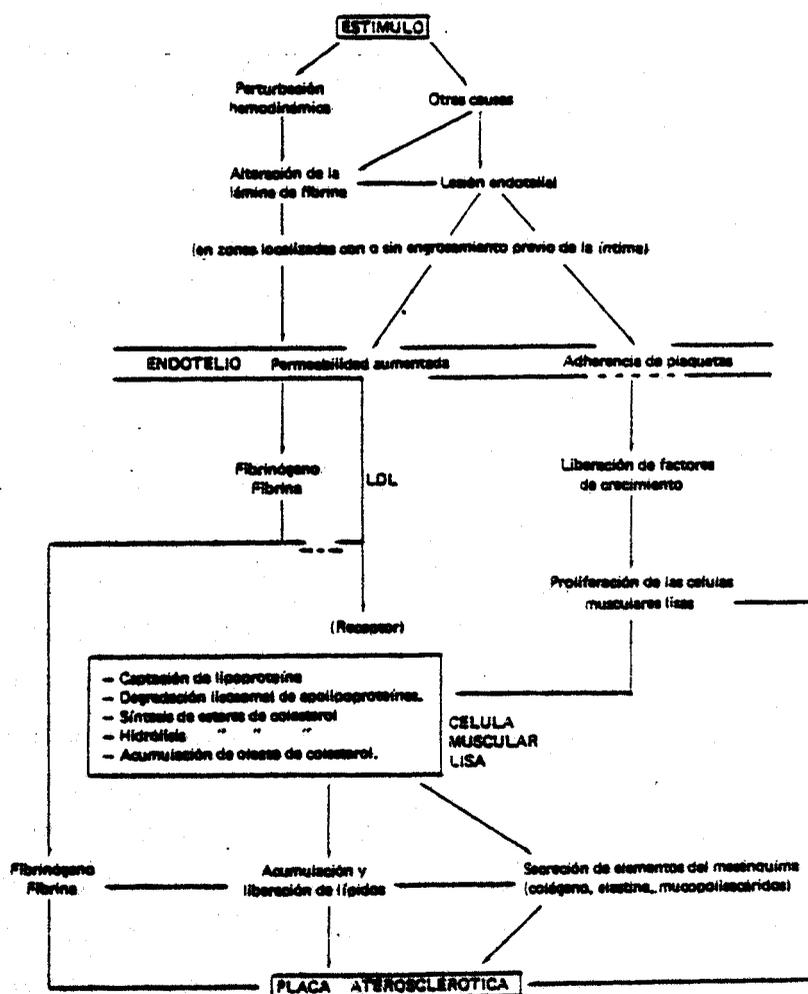
La segunda gran hipótesis fue la de Virchow o de la

imbibición. Esta teoría sugiere que la materia grasa que se encuentra en la pared arterial procede de la transudación de lípidos sanguíneos que subsiguientemente interfieren con los proteoglicanos y promueve la proliferación de la íntima. La acumulación de lípidos en la pared arterial, puede ser el resultado de una elevación de la captación de los lípidos plasmáticos, o de una pérdida de eficiencia en el sistema de eliminación o de ambos fenómenos. Esta teoría de la insudación parece confirmarse por el hallazgo de una frecuencia elevada de enfermedad coronaria entre las poblaciones que tienen una concentración elevada de colesterol en sangre. El investigador ruso Anitschkow (1913) confirmó experimentalmente esta hipótesis al producir la enfermedad arteriosclerótica en conejos alimentados con elevadas concentraciones de colesterol; en este modelo se pudo demostrar que los lípidos que aparecían precozmente en las lesiones arteriales procedían de la sangre. Los datos referentes a la presencia de estrías grasas en niños desde la más tierna edad parecían también apoyar esta teoría pues se consideraba que esta infiltración de lípidos sería uno de los primeros eventos en el desarrollo de la arteriosclerosis. Sin embargo, esta interpretación tiene el inconveniente de que las estrías grasas aparecen con la misma frecuencia en los niños de cualquier población en tanto que la arteriosclerosis adulta es rara en algunas poblaciones y frecuente en otras.

#### 1.4.2. VISION ACTUAL

Con el tiempo, han surgido múltiples hipótesis que han venido a completar estas dos hipótesis iniciales. Algunos autores han intentado compaginar ambas teorías, (Fig. 10), (Kottke y Subbiah, 1976, Copley 1978), en un esfuerzo por aumentar la objetividad. Sin embargo existe, desde un punto de vista crítico, una especial tendencia de los autores consultados en decantarse más en un sentido, sea considerando más importantes los fenómenos hemostáticos o en otro, es decir, considerando más importantes el papel de los procesos

del metabolismo lipídico. Lo que si es un patrón constante en los trabajos de más reciente publicación es el considerar a la arteriosclerosis como una enfermedad de etiología multifactorial, de tal forma que hoy en día estas hipótesis han sido integradas en una sola algo más compleja, según la cual, la etiopatogenia de la arteriosclerosis parece depender de una secuencia más precisa de acontecimientos, basados en la interacción de los elementos sanguíneos y lípidos de la sangre con la pared arterial. A su vez cada una de estas etapas puede ser modificada por diferentes factores de riesgo.



Estímulos: Hipertensión arterial, estreses; variaciones de flujo.  
 Coagulación-Fibrinolisis, tumor, hipoxia, endotoxinas,  
 catecolaminas, etc.

Fig. 10. Hipótesis multifactorial (Kottke y Subbiah 1976).

Según Fuster (1981) los acontecimientos más importantes para que se desarrolle la arteriosclerosis parecen ser los siguientes:

- Alteración hemodinámica y lesión endotelial.
- Paso y acumulación de lípidos.
- Interacción de plaquetas con la pared arterial y proliferación de células musculares lisas.
- Fibrosis y desarrollo de trombos.
- Ulceración, calcificación y formación de aneurismas.

De estos acontecimientos los tres primeros merecen una especial atención desde el punto de vista de la etiopatogenia de la enfermedad y por ello van a ser especialmente considerados en las próximas páginas.

#### 1.4.2.1. Sobrecarga Hemodinamica y Lesión Endotelial

Se ha demostrado que los lugares en los cuales la aorta presenta ramificaciones y otras áreas en las que se desarrollan frecuentemente placas arterioscleróticas, coinciden con zonas en las que el endotelio, por estar continuamente sometido a turbulencias, sufre más lesión, (Packman et al 1967, Jorgensen 1972) usando albúmina marcada con I 131 y azul de Evans en conejos jóvenes y cerdos han demostrado un incremento en el paso de proteínas en las áreas en las que la captación de colesterol libre y esterificado marcados también los estaba, (Somer y Schwartz, 1972). En estas mismas zonas arteriales (Bjorkerud y Bondjers 1972) demostraron por medio de tinciones supravitales que las células endoteliales estaban desvitalizadas, Wright (1972) demostró un incremento en el recambio de las células endoteliales. Todas estas observaciones indican que el grado de lesión y recambio de las células endoteliales puede estar aumentado precisa-

mente en aquellas zonas en las que suelen desarrollar las lesiones arterioscleróticas. El estudio de estas zonas arteriales por microscopía electrónica de transmisión y/o barrido demuestra además cambios en la forma de las células así como espacios intercelulares incrementados o "gaps" que sugieren lesión endotelial, (Reidy y Bowyer 1977). Existen pruebas de que participan por lo menos dos mecanismos en la producción de esta agresión vascular focal y continua. El primero, una agresión directa sobre el endotelio causada por factores hemodinámicos (Fry 1969, Glasgow 1973, Kottke et al 1978, Corhill 1980). En modelos hidráulicos con varios regímenes de flujo, Wesolowsky et al (1965), pudieron predecir que las zonas de máxima turbulencia corresponderían con las áreas de predilección para el desarrollo de lesiones dentro del árbol vascular humano. El segundo mecanismo estaría relacionado con la interacción de los elementos formes de la sangre con la pared arterial en las regiones con excesiva turbulencia, (Goldsmith 1974).

El concepto de que la arteriosclerosis es una respuesta local a una lesión endotelial continua, esta recibiendo últimamente un amplio soporte. Lesiones experimentales de la íntima, sin disrupción de la lámina elástica interna, que imitaba la lesión mecánica que fisiológicamente producen los factores hemodinámicos, han permitido reproducir el amplio espectro de las lesiones arterioscleróticas iniciales (Stenerman y Ross, 1972, Fishman et al 1975). En estos experimentos al igual que en la arteriosclerosis espontánea, uno de los primeros cambios estructurales, es la proliferación de células musculares lisas que, como se ha dicho, posiblemente derivan de la media arterial, (Spaet et al 1975).

#### 1.4.2.2. Pared Arterial y Lípidos en la Arteriosclerosis

Durante muchos años no se pudo aclarar exactamente cual era la procedencia de los lípidos y su influencia en

la etiopatogenia de la arteriosclerosis. Hoy en día parece definitivamente demostrado que el material lipídico de la lesión y específicamente el colesterol proceden del plasma circulante.

Los lípidos plasmáticos son transportados por cuatro tipos de lipoproteínas :

1.- Quilomicrones, definidos como partículas de lipoproteínas transportadoras de los triglicéridos ingeridos en la dieta, por consiguiente son partículas características de la fase postprandial.

2.- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Transportan la mayor parte de los triglicéridos circulantes durante las fases de ayuno. Dentro de la composición de las VLDL la fracción Apo A, sería la que participaría de una forma más activa en este transporte.

3.- Lipoproteínas de baja densidad (LDL). Transportan la mayor parte del colesterol circulante. Dentro de su composición las fracciones Apo B proteína tendría un papel preponderante en la función de transporte.

4.- Lipoproteínas de alta densidad (HDL). Transportan cantidades relativamente pequeñas de colesterol y triglicéridos. Dentro de su composición la fracción Apo C sería la que desarrollaría la mayor parte de la función de transporte.

Los estudios morfológicos realizados en humanos con arteriosclerosis espontánea y en animales a los que se les ha producido arteriosclerosis por lesión endotelial (Moore 1973) o por dieta aterogénica (Imai et al 1968) sugieren que son las células espumosas ("Foam cells") las que contienen la mayor parte del material lipídico contenido en las placas arterioscleróticas (Geer, 1965, Joris et al 1979). En este fenómeno, se han implicado a las células sanguíneas como fuente

de elementos macrofágicos pero sin que se haya podido demostrar de una forma cierta (Day, 1967, Wissler et al , 1968, Stary, 1976, Freudenberg y Riese, 1976, Baba et al 1977).

Los estudios de la composición lipídica de las lesiones arterioscleróticas han demostrado una notable similitud entre la arteriosclerosis espontánea en el hombre (Bottcher et al 1962, Day, 1967) y los animales (Wissler 1968). Esta gran similitud persiste cuando la arteriosclerosis es inducida en animales, sea por lesión (Bjorkerud y Bondjers, 1972) o por dieta aterogénica (Lofland et al 1965). En todos los estudios, especialmente en los llevados a cabo en lesiones primarias, predomina la presencia de colesterol esterificado con una alta proporción de ácido oleico-ácido linoleico. La diferente composición de los ácidos grasos de los ésteres de colesterol en el plasma (con alto contenido en ácido linoleico) y en las lesiones aórticas (con alto contenido en ácido oleico), (Swell et al, 1960) no invalida la proposición de que el colesterol aórtico deriva del plasma (hoff et al, 1975). La diferencia está de cualquier modo justificada ya que la participación de ácidos grasos en los ésteres de colesterol que se encuentran en la pared arterial, esta determinada primariamente por la actividad celular local.

Los fibroblastos humanos disponen de receptores específicos para lipoproteínas ( Goldstein y Brown, 1977) y las células musculares lisas se piensa que tienen receptores similares que jugarían un papel en el control de esta transformación intracelular del colesterol (Bierman et al, 1975). El enzima responsable de la esterificación del colesterol sería la colesteril ester sintetasa microsomal, según ha sido descrita por St.Clair et al (1970) y su presencia en la aorta ha sido confirmada por otros investigadores (Kothari et al, 1973, Hashimoto et al, 1974). Smith

et al (1974) confirmaron la acumulación intracelular de oleato de colesterol en las estrias grasas, pero también observaron acumulaciones significativas de colesteril-linoleato y de colesterol libre, especialmente cuando se desarrollan placas fibrosas. La elastina parece jugar un papel importante en la captación de estos lípidos extracelulares por la pared arterial (Kramsch et al 1973) y se ha sugerido que la propiedad del calcio para unirse a los centros sin carga de la elastina, favorecería este proceso. Además de esto, los glicosaminoglicanos extracelulares parece también ser importantes en la captación de lípidos por la pared arterial, proceso que ha sido últimamente revisado (Morris et al, 1978).

Aparte de que esta acumulación de lípidos extra e intracelular contribuye al desarrollo de la placa arteriosclerótica, en la actualidad se concibe que las lipoproteínas, actuando conjuntamente con otros elementos derivados del plasma, podrían estimular la proliferación de células musculares lisas.

Esta posible capacidad mitogénica de las lipoproteínas se fundamenta en estudios llevados a cabo recientemente en cultivo de células musculares lisas (Fischer et al, 1976). Sin embargo, Ross y Harker (1976) informan que según sus trabajos, las lipoproteínas probablemente proporcionarían los nutrientes necesarios para la proliferación celular especialmente para la formación de una nueva membrana. La inhibición lipídica incrementada en las lesiones arterioscleróticas más avanzadas podrían agravar la lesión por la estimulación subsiguiente de la proliferación de las células musculares lisas. Estudios en animales de experimentación utilizando dietas ricas en colesterol parecen indicar que el colesterol plasmático circulante cuando alcanza niveles elevados podría por si solo contribuir a la lesión endotelial en los estadios iniciales de la arteriosclerosis

(Shimamoto et al, 1971, Armstrong et al, 1980). Sin embargo dado que la interacción del colesterol exógeno con la pared arterial podría ser distinta a la producida por el colesterol endógeno, estas observaciones experimentales deberían interpretarse con cierta cautela (Imai et al, 1976).

A lo largo de estos últimos años no había sido considerada la posibilidad de que los mecanismos de eliminación de lípidos pudieran jugar un papel importante en la etiopatogenia de la arteriosclerosis. Como la mayor parte de lípidos que se acumulan son ésteres de colesterol, los mecanismos de eliminación de estos ésteres podría ser considerado como un importante mecanismo de defensa (Wolinsky et al 1978).

Sin embargo son varios los aspectos que deben ser tenidos en cuenta con respecto a esta eliminación de lípidos. En estos últimos años se ha informado que una deficiencia relativa del enzima lisosomal: colesterol-éster-hidrolasa puede ser responsable de la acumulación de ésteres de colesterol que normalmente se observan en la arteriosclerosis (Shio et al, 1974). Es posible que en algunas circunstancias, un nivel normal o quizás elevado del enzima no pueda hacerse cargo de la totalidad del flujo y acumulación de lipoproteínas en la pared arterial ( de Duve, 1974). En otras ocasiones una deficiencia genética primaria del enzima podría ser responsable en parte de la acumulación de lípidos y de la arteriosclerosis (Subbiah et al, 1967). La naturaleza de esta colesterol-éster-hidrolasa ácida ha sido mejor caracterizada por Brechner et al (1973) y Takanó et al (1974) que localizaron la actividad enzimática en los lisosomas de las células lisas.

Hay pruebas de que la íntima de las arterias recibe el oxígeno y el resto de requerimientos metabólicos a partir de la propia sangre circulante, mientras que la media

y la adventicia reciben estos nutrientes desde los "vasa vasorum", por lo tanto, la unión entre la íntima y el resto del vaso es muy susceptible a cualquier circunstancia que produzca hipoxia ya que esto disminuye el metabolismo y eliminación de las lipoproteínas (Walton, 1975). De hecho existen datos de que tanto la oxigenación disminuida a nivel de la íntima, como la exposición crónica al monóxido de carbono, aceleran la arteriosclerosis experimental y la proliferación de células musculares lisa, mientras que en la hiperoxigenación se impide el desarrollo de la arteriosclerosis experimental, (Wissler et al, 1975).

Gracias a los datos epidemiológicos, se ha podido establecer una importante correlación entre concentraciones altas de HDL en el plasma y disminución de la incidencia y progresión de la enfermedad arteriosclerótica (Rhoads et al, 1976, Gordon et al 1977, Moore et al 1979). Dado que las moléculas de HDL atraviesan fácilmente la pared arterial (Reichl et al, 1973) y son capaces de transportar colesterol de la pared arterial (Miller et al, 1975). Sin embargo, se ha sugerido también que la HDL y otras lipoproteínas en la regulación del metabolismo lipídico ha sido revisado ampliamente en distintos momentos (Eisenberg, 1976, Small y Tall, 1978, Gotto et al, 1980).

Un factor adicional en la movilización de los ésteres de colesterol desde la pared arterial es posiblemente el estado físico-químico de esos lípidos en las lesiones, y por consiguiente su utilidad como sustratos enzimáticos. El estado físico de los lípidos en las lesiones ha sido extensamente estudiado por Small (1977). En la íntima normal, los lípidos se presentan en fase lamelar, mientras en las estrías lipídicas existe un líquido termotrópico o aceitoso en fase cristalina que está formada primariamente por los ésteres de colesterol que están presentes. En las lesiones avanzadas, esta fase líquida-oleosa cristalina está saturada de colesterol libre y cristales de monohidratos de colesterol.

Desde un punto de partida físico-químico, a la temperatura corporal los ésteres de linoleato de colesterol podrían ser más estables en la fase líquido-oleosa cristalina que los ésteres de oleato de colesterol; y éstos tenderían a acumularse como cristales. La integración perfecta de estos conceptos con los resultados de los estudios enzimáticos, están pendientes de las conclusiones aportadas por estudios actualmente en curso.

#### 1.4.2.3. Plaquetas

A lo largo de estos últimos años, el papel de las plaquetas ha variado, de ser consideradas únicamente relacionadas con los problemas terminales de la arteriosclerosis a ocupar un lugar de relieve en el inicio de la enfermedad.

Dada la importancia de estas observaciones y siendo de hecho la fuente de inspiración de esta tesis, el papel de las plaquetas en la etiopatogenia de la arteriosclerosis va a ser ampliamente expuesto en el próximo apartado.

### 1.5. PAPEL DE LAS PLAQUETAS

### 1.5.1. PLAQUETAS/PARED ARTERIAL Y PROLIFERACION DE LAS CELULAS MUSCULARES LISAS.

Como ya se ha dicho anteriormente, los factores hemodinámicos, sumados a la lesión endotelial y la proliferación de células musculares lisas, se ha considerado que tienen gran importancia en el desarrollo de la arteriosclerosis.

Recientemente han ido aumentando las sospechas de que las plaquetas por interacción con la pared arterial, podían estar implicados en los estadios primarios de la enfermedad.

Pruebas de que las plaquetas y otros elementos formes de la sangre pueden participar en la lesión primaria del endotelio vascular en regiones con flujo turbulento se han obtenido en los trabajos de Murphy et al (1962), Goldsmith, (1974). El exámen de la superficie endotelial de vasos de cerdos, ratones, palomas (Jorgensen et al 1972 Joris et al, 1979) y humanos muertos repentinamente (Jorgensen et al 1973) demuestran agregados, compuestos por elementos formes, la mayor parte de ellos plaquetas y globulos blancos. Si esta acumulación es secundaria a la lesión causada por los factores hemodinámicos, las células sanguíneas y plaquetas contribuirían probablemente a incrementar la permeabilidad celular en determinadas zonas.

Tal como se ha dicho parece que la fijación o depósito de plaquetas sobre la superficies endoteliales lesionadas dependería principalmente de una compleja molécula relacionada con el factor VIII. Esta molécula, llamada factor Willebrand, que esta normalmente presente en el plasma circulante (Cornu et al, 1963, Zimmerman et al 1971) plaquetas (Howard et al 1974) asi como en las zonas endoteliales (Bloom et al 1973) y subendoteliales (Ramd et al

1980) probablemente depositado sobre las fibrillas de co lágeno (Nyman, 1980) parece que estaría relacionado con la interacción plaquetas/pared arterial en las zonas del endo telio lesionado (Baumgartner et al 1977, Weis et al 1978, Sakariassen et al 1979, Fuster et al 1981). En contraste con este mejor conocimiento de la adhesión plaquetar, la posible existencia de factores que favoreciesen la adherencia de leucocitos a la pared vascular lesionada parece más difícil de entender aunque no puede descartarse, ( Stewart et al 1974, Joris et al 1979).

Observaciones recientes han suscitado la posibilidad de que las plaquetas serían uno de los principales factores estimulantes de la proliferación de las células musculares lisas que tiene lugar en los estadios iniciales de las arteriosclerosis.

En la arteriosclerosis experimental inducida por lesión endotelial, uno de los primeros fenómenos es la aparición de plaquetas que han sufrido la degranulación intracitoplasmática y están adheridas a la superficie endotelial y a las áreas desnudas del subendotelio. Este fenómeno precedería a la migración y proliferación de las células musculares lisas (Stenerman y Ross, 1972, Harker, Ross et al 1976).

Un hallazgo importante realizado por Ross y Glomset (1973 y 1974) ha sido la necesidad de una sustancia derivada de las plaquetas para que se produzca la proliferación de células musculares lisas y fibroblastos en cultivo, se supone que esta sustancia es responsable en gran parte de la proliferación de células musculares lisas de las lesiones arterioscleróticas.

Según esto, el suero derivado de plasma no serviría para el crecimiento en los cultivos de células musculares lisas. La adición de plaquetas al plasma pobre en plaquetas,

y posterior coagulación por el calcio produce suero que sirve para el crecimiento de las células, siendo tan efectivo como el suero derivado de la sangre total. Estos experimentos han permitido a Ross, Glomset y Harker (1976) formular una hipótesis sobre la etiopatogenia de la arteriosclerosis. Según esta hipótesis la secuencia de la producción de arteriosclerosis seguiría la evolución que se muestra en la Figura 11.

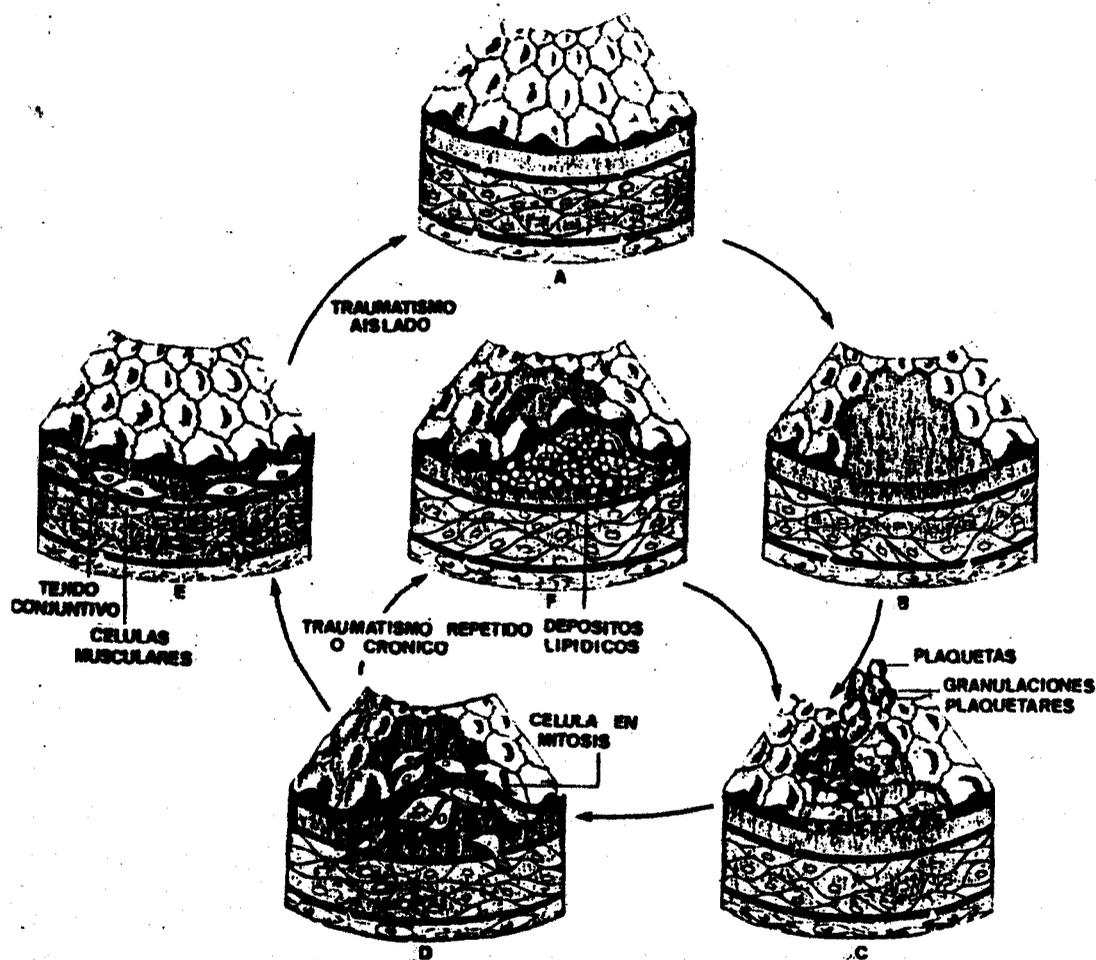


Fig. 11. Esquema de la Hipótesis sugerida por Ross y Glomset 1976.

En síntesis, tras un traumatismo o lesión el endotelio desaparece. Inmediatamente las plaquetas se agregan

sobre la zona lesionada para formar un pequeño microagregado. Las plaquetas se adhieren sobre el tejido conjuntivo puesto al desnudo (colágeno) y por esta reacción de adhesión y agregación las plaquetas pierden sus gránulos.

Como respuesta las células musculares van a migrar desde la media hacia la íntima donde se multiplican activamente en la zona traumatizada. Por otra parte algunas células endoteliales a nivel de la zona lesionada se dividen y regeneran para recubrir la zona denudada. Posteriormente la íntima se engrosaría como consecuencia de la multiplicación de células musculares a nivel de la lesión. Esta última fase regresaría parcialmente y el endotelio regenerado volvería a ser normal pero la íntima continuaría engrosada conteniendo numerosas células musculares. Cuando los traumatismos son crónicos o se repiten frecuentemente, en lugar del curso normal, se observa una persistente multiplicación de células musculares y un engrosamiento de la pared vascular con participación del tejido conjuntivo e impregnación por lípidos que dan lugar a la aparición de las denominadas células espumosas.

Cuando las plaquetas son destruidas por congelación y descongelación, o bien son incubadas en presencia de trombina, se obtiene el extracto, cuando este se añade al plasma, substituiría a las plaquetas en el proceso de iniciar el crecimiento. El PDGF (platelet derived growing factor) tiene un peso molecular bajo (13.000 d), proteína termoestable, recientemente purificada por Antoniades et al (1979). El PDGF, junto con el factor plaquetario 4 (PF 4), que es un factor antiheparina, y la  $\beta$ -Tromboglobulina, como se ha dicho en el apartado 1.2.2.2 de esta tesis, son liberadas por los granulos de las plaquetas durante la activación plaquetaria, (Kaplan et al 1979 a y b).

Si estas tres proteínas pueden sintetizarse o no a partir de otra proteína anterior, no se sabe todavía.

Interesantes estudios secuenciales realizados en palomos susceptibles a la arteriosclerosis demuestran una elevación progresiva de la actividad pro PF4 del suero. Este aumento de actividad coincide con el desarrollo de la arteriosclerosis; en contraste se observó una disminución de la actividad pro PF4 en los palomos resistentes a la arteriosclerosis (Fuster et al 1977). Puede concebirse que el incremento de la actividad PF4 del suero en los palomos susceptibles a la arteriosclerosis está determinado genéticamente, y quizás también el contenido de PDGF de las plaquetas que podría ser el mediador de la proliferación de la célula muscular lisa. De todos modos este incremento en la actividad PF4 en los palomos susceptibles a la arteriosclerosis, es como mínimo un indicador de un recambio de plaquetas aumentado, secundario a la adhesión de las plaquetas sobre la superficie endotelial dañada (Lewis y Kottke 1977). Ultimamente, se ha indicado que el PDGF podría originarse en la hipófisis y sería transportado por las plaquetas hasta lugares que presentan daño endotelial (Antoniades y Scher 1977, Tiell et al 1978). Lo más probable sin embargo es que el PDGF y este factor de crecimiento originado en la hipófisis (también llamado factor de crecimiento para los fibroblastos) son dos proteínas diferentes, la segunda con capacidad de promover la proliferación en vivo, no solo de las células musculares lisas, sino también de las células endoteliales (Gospodorowicz et al 1978, Stenerman 1979).

Gracias a los experimentos con animales, se ha conseguido un mejor conocimiento de la importancia de las plaquetas en el inicio de la arteriosclerosis. Cuando se inhibe la función plaquetaria de algunos animales de experimentación se observa una resistencia a la arteriosclerosis. Cohen y Mc Combs (1968) tras administración de  $P^{32}$  a conejos, obtuvieron una reducción de los contajes de hasta 1/4 de la normalidad. Cuando se alimenta a estos animales con yema de

huevo, se observa que existe un menor grado de arteriosclerosis en estos animales que en los conejos control, que se alimentan con la misma dieta. En contraste, los conejos con trombocitosis producida por flebotomías repetidas, presentan un incremento en el grado de arteriosclerosis. Friedman et al (1977) produjeron una marcada trombocitopenia (recuentos de plaquetas inferiores a  $10.000 \text{ mm}^3$ ) en conejos por administración de suero antiplaquetas. Lesionando el endotelio de estos conejos con un catéter de polietileno, no se producían lesiones arterioscleróticas. En animales con trombocitopenias menos importantes, se desarrollaron algunas lesiones pero siempre fueron menos importantes que las que se producían en los animales controles no trombocitopénicos.

En Rochester (Minnesota) se ha mantenido una colonia de cerdos que presentan una importante anomalía de la función plaquetaria: la enfermedad de Von Willebrand homocigótica. Fuster y colaboradores, han demostrado que estos cerdos con ausencia del factor Von Willebrand, presentan marcada pérdida de la capacidad de las plaquetas de adherirse a la pared vascular (Fuster, 1981) y son resistentes al inicio y progresión de la arteriosclerosis, tanto espontánea (Fuster et al 1979) como inducida por dosis moderadas de colesterol en la dieta (Fuster et al 1978). Sin embargo los cerdos que tenían menos afectada la función plaquetar, (cerdos con Von Willebrand heterocigótico) eran menos resistentes a la arteriosclerosis (Fuster et al 1979).

Estas experiencias indican que la interferencia del funcionalismo plaquetar tiene gran importancia en los estadios iniciales de la arteriosclerosis.

### 1.5.2. PLAQUETAS/PARED ARTERIAL Y SISTEMA DE LAS PROSTAGLANDINAS.-

El papel que juegan las prostaglandinas en el proceso de la interacción plaqueta/pared arterial se encuentra actualmente en investigación . En 1969 Piper y Vane encontraron que una sustancia inestable podía contraer la aorta aislada del conejo, que fue llamada R.C.S. (Rabbit aorta contracting substance) era liberada por el pulmón del cobaya. A su vez esta sustancia (RCS) era liberada también por las plaquetas durante la agregación (Vargaftig et al 1973). Se descubrió también que esta sustancia era un precursor de la prostaglandina (Gryglewski y Vane, 1972) que fue caracterizado (Svensson et al 1975) encontrandose que contenía un factor inestable, responsable de la actividad vasoconstrictora del músculo liso (Needleman et al 1977, Shimamoto et al 1977, Svensson 1977). Lo más importante es que este factor inestable es el inductor de la agregación plaquetaria mas potente que se ha descubierdo (Hamberg 1975) habiendo sido identificado como Tromboxano prostaglandina (Tx A2).

En el año 1976 fue descubierto un nuevo metabolito de la prostaglandina por el grupo de Moncada y Vane que fue llamado prostaciclina ( $PGI_2$ , ver apartado 1.2.2.2 de esta tesis). Este compuesto parece ser el principal metabolito de las prostaglandinas en el tejido vascular, particularmente en el endotelio, decreciendo progresivamente en actividad en dirección a la adventicia (Moncada 1977). La  $PGI_2$  es un potente vasodilatador a nivel sistémico (Jentzer et al 1979, Armstrong 1980) pero la acción quizás más importante es que la  $PGI_2$  es a su vez el mas potente inhibidor de la agregación plaquetaria que se ha descubierto hasta hoy (Higgs et al 1978 y posee propiedades antitrombóticas.

Basandose en la información anterior, se ha sugerido que bajo condiciones fisiológicas, las plaquetas se adhieren a las zonas vasculares lesionadas, liberan  $Tx A_2$  que promueve la posterior agregación de plaquetas a estas zonas (Moncada y Vane, 1979). Simultáneamente, las plaquetas liberarían endoperóxidos, que potencian la síntesis de  $PGI_2$  por la pared vascular, de esta forma se limitaría el proceso de agregación plaquetaria y se prevendría la trombosis (Needleman 1978). Realmente en la actualidad parece existir datos que hacen pensar que un desequilibrio entre este balance de la actividad proagregante y desagregante entre ambos sistemas de prostaglandinas ( $Tx A_2/PGI_2$ ) podría ser un factor importante que conduciría a la enfermedad vascular, (ver Figura 12).

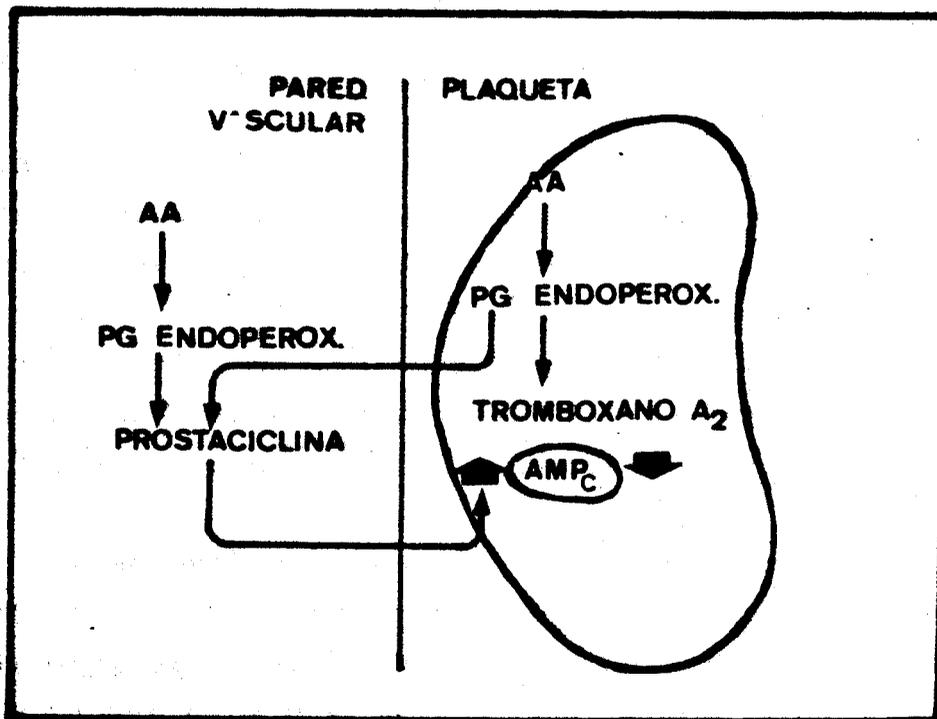


Fig. 12. Sistema de las prostaglandinas en la plaqueta y en la pared vascular.

Esto explicaría porque los esquimales de Groenlandia que tienen cierta tendencia al sangrado y no desarrollan arteriosclerosis, parecen tener menos  $TxA_2$  y una gran cantidad de ácidos grasos con 20 C y 5 insaturaciones que son

precursores del agente antiagregante  $\text{PGI}_2$  (Dyerberg, 1978).

El grupo de Gryglewski (1978) ha encontrado que la formación de  $\text{Tx A}_2$  esta aumentada en las plaquetas de conejos con arteriosclerosis inducida por dieta aterogénica y que la formación  $\text{PGI}_2$  esta disminuida en las arterias de estos mismos animales. El grupo de Sinzinger (1979) ha estudiado arterias humanas arterioscleróticas de diferentes localizaciones, encontrando que las cantidades de  $\text{PGI}_2$  producidas serían más bajas que las encontradas en arterias morfológicamente inalteradas que se utilizaron como control. Además las arterias de especies propensas a desarrollar arteriosclerosis muestran una producción de  $\text{PGI}_2$  más bajas (Sinzinger 1978).

Estos hallazgos han permitido al propio Gryglewski (1980) avanzar una hipótesis según la cual, la aterosclerosis sería una enfermedad resultante de la intoxicación de la prostaciclina-sintetasa por diferentes sustancias entre ellas los lipoperóxidos o los correspondientes radicales libres que pueden producirse durante la hiperlipidemia. El déficit de prostaciclina tendería a producir una disminución en los niveles de AMP(c) en las plaquetas y en la pared arterial, lo cual incrementaría la agregabilidad y la permeabilidad endotelial (Numano, 1977).

El endotelio arterial cuando queda desprovisto de su capacidad para sintetizar prostaciclina (Angelo et al 1978, Gryglewski et al 1978) se convierte en una superficie idónea para que se produzca la adhesión y agregación plaquetaria. La agregación de las plaquetas estaría activada no solo por la falta de esa oposición de la prostaciclina en la superficie endotelial, sino también por las bajas concentraciones de prostaciclina circulante y por la desviación del metabolismo del ácido araquidónico hacia la producción de metabolitos proagregantes en lugar de hacia la producción de prostaciclina. A partir de las

plaquetas agregadas se liberarían sustancias que causarían lesión endotelial, respuesta inflamatoria de la pared, migración de células musculares lisas y formación de la placa aterosclerótica, según ha sido descrito por Ross y Harker (1976).

Si los razonamientos anteriores son correctos, la terapia substitutiva con prostaciclina podría aliviar los síntomas de la aterosclerosis en el hombre. De hecho se ha podido comprobar la evidencia de una mejoría clínica en algunos casos de arteriosclerosis obliterante tratados con prostaciclina o análogos (Olsson, 1980, Szczeklik et al 1979).

### 1.5.3. FACTORES DE RIESGO. SU POSIBLE IMPLICACION CON LAS PLAQUETAS.-

Los estudios epidemiológicos de los últimos 20 ó 30 años han establecido una serie de hallazgos que comunmente se encuentran en pacientes que tienen la enfermedad arteriosclerótica. Estos hallazgos han sido denominados factores de riesgo, (Kannel et al, 1967). Los más importantes que se conocen hasta ahora son: fumar cigarrillos, factores genéticos o historia familiar de enfermedad arteriosclerótica, hiperlipoproteinemia, hipertensión y diabetes mellitus. Cualquiera de estos factores de riesgo incrementa el grado de incidencia primario de enfermedad arteriosclerótica (Keys, 1970, Blackburn, 1974) haciendo que la enfermedad se manifieste a una edad más temprana (Fuster, 1975) y una vez se ha hecho aparente clínicamente, acelerando su progresión secundaria (Moss, 1975). Vamos ahora a intentar aclarar los posibles mecanismos por medio de los cuales los factores de riesgo pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad arteriosclerótica poniendo un especial énfasis en su posible papel en el proceso de lesión endotelial e interacción de las plaquetas con la pared arterial.

## FUMAR CIGARRILLOS

Es el primero, hoy día está ampliamente reconocido que el fumar incrementa la reactividad plaquetaria y puede alterar la producción de prostaglandinas y los mecanismos que pueden promover el desarrollo de la arteriosclerosis (Mustard et al, 1963, Brinson, 1974, Wennmalm, 1978).

Una segunda alternativa por la que el fumar cigarrillos incrementa el proceso de enfermedad arteriosclerótica es por su efecto directo sobre la pared arterial. El monóxido de carbono produce hipoxia en los tejidos arteriales (Kjeldsen, 1969 a y b, Davies, 1976). La nicotina produce movilización de catecolaminas (Koch et al, 1980) a la vez que causa lesiones en la pared arterial e incrementa la reactividad de las plaquetas (Rowell et al, 1966 Haft, 1973). Una glicoproteína del tabaco (TGP) puede producir una reacción de hipersensibilidad que también tiene como consecuencia lesión endotelial (Becker et al 1976 y 1977). Finalmente una tercera alternativa por la cual el fumar cigarrillos puede influir sobre el proceso arteriosclerótico sería a través de su efecto disminuidor del nivel de apoproteínas HDL (Berg et al 1979).

## DISLIPOPROTEINEMIA

Numerosos trabajos demuestran que la hiperlipoproteinemia, y particularmente la hipercolesterolemia en edades jóvenes, incrementa la incidencia y progresión de la enfermedad arteriosclerótica (Gotto, 1979). Por ello, la hipercolesterolemia familiar, relacionada con un fallo en el metabolismo del colesterol a nivel de la pared arterial, es el factor de riesgo más clásico y convincente (Brown et al, 1976, Goldstein et al, 1977).

Probablemente son varios los mecanismos por los cuales una alteración de los lípidos plasmáticos pueden iniciar el proceso arteriosclerótico. El primero de ellos parece ser que la hipercolesterolemia favorecería el proceso de la lesión endotelial (Nelson et al, 1978, Armstrong, 1980) y también la iniciación y progresión de la placa arteriosclerótica. Segundo, existen pruebas de que la hiperlipoproteinemia incrementa la reactividad plaquetaria (Carvalho et al, 1974, Shattil et al, 1977, Harker et al, 1979) y puede alterar la producción de prostaglandinas (Stuart et al, 1980). Tercero, parece que estas lipoproteínas pueden promover la proliferación de células musculares lisas (Ross, Glomset y Harker, 1976, Fischer-Dzoga et al, 1976). Cuarto, recientemente se ha sugerido que los factores que alterasen el proceso de eliminación del colesterol podría favorecer su acumulación y también la progresión de la enfermedad. Tal como se ha mencionado anteriormente, una disminución en el enzima lissosomal colesterol-ester-hidrolasa (De Duve, 1974) o una disminución en la concentración de HDL (Barr et al, 1955, Castelli et al, 1977, Moore et al, 1979) son también factores recientemente implicados como responsables en esta alteración de los mecanismos de eliminación.

Es interesante observar que una dislipoproteinemia que cursa con una disminución de la concentración plasmática de HDL sin hiperlipoproteinemia asociada, suele verse en pacientes con una historia familiar importante de enfermos ateroscleróticos (Pometta et al, 1979).

También se ha sugerido que una disminución en la fracción de HDL es quizás la anomalía metabólica más relevante de algunos de estos pacientes con amplia historia familiar de enfermedad aterosclerótica en los que no se ha detectado cualquier otro factor de riesgo más específico (Gagne et al, 1979). Además se ha observado

que una baja proporción de HDL está asociada con un elevado riesgo de aterosclerosis (Mordasini et al, 1977). Inversamente, puede observarse en individuos que practican un deporte regularmente una elevada concentración de HDL posiblemente asociada con un riesgo disminuido de aterosclerosis, igualmente se ha observado este fenómeno en individuos con un consumo moderado de alcohol (Wilson, 1970).

## FACTORES GENETICOS

Si se excluyen los pacientes con hiperlipoproteíemia familiar, existen datos de que los factores genéticos están asociados de forma muy importante con el desarrollo de la arteriosclerosis, especialmente en edades jóvenes (Slack et al, 1966). Sin embargo, el razonamiento de que esta tendencia familiar puede estar influenciada por la transmisión genética no está aclarada completamente sobre todo si se considera hasta que punto los elementos genéticos actúan en combinación con factores ambientales como los nutricionales, socioeconómicos y otros factores de riesgo.

Una de las hipótesis sugiere que el factor genético contribuye a una respuesta hiperactiva por parte de la pared arterial frente a la lesión endotelial; es decir, que se podría inducir una proliferación exagerada de células musculares lisas o fibroblastos o una excesiva producción de colágeno que se iniciase antes o después del nacimiento.

Es compatible con esta hipótesis el incremento de la proliferación de células musculares lisas en los engrosamientos de la íntima que se observan en edades jóvenes, especialmente en poblaciones que genéticamente están predispuestas para desarrollar placas arterioscleróticas en estas áreas localizadas ( Dock, 1946), había

señalado que los niños varones empezaban su vida con un número casi tres veces mayor de zonas de engrosamiento de la íntima que las niñas; este autor propuso que estas diferencias en el grosor de la íntima era la responsable de las diferencias en la incidencia de enfermedad coronaria arteriosclerótica entre hombres y mujeres. En 1974, Pesonen cuantificó el engrosamiento de la íntima de arterias coronarias de niños finlandeses de menos de un año de edad que habían muerto por causas no infecciosas. Este autor encontraba un incremento del grosor de la íntima en los niños varones pero además ha observado también que los niños, cuyos padres y abuelos habían nacido en la zona oriental de Finlandia, tenían un engrosamiento de la íntima más pronunciado que los niños cuyos padres y abuelos habían nacido en la zona occidental de Finlandia. Desde el punto de vista genético esto tiene un gran interés ya que se sabía desde hacía muchos años que la incidencia de enfermedad coronaria era mucho más alta en Finlandia oriental que en la parte occidental del país.

En la experiencia clínica diaria es raro ver a un paciente de 50 años o menos con enfermedad coronaria arteriosclerótica que no tenga relación con uno de los siguientes factores de riesgo; historia familiar con varios casos de enfermedad coronaria arteriosclerótica en edades tempranas o hábito de fumar cigarrillos. Es menos raro ver pacientes más viejos con enfermedad arteriosclerótica que no han tenido relación con los factores de riesgo mencionados; posiblemente en estos pacientes algún tipo de factor predisponente o ambiental por si solo puede contribuir al desarrollo de la enfermedad.

A parte de la hiperlipoproteinemia, la homocistinuria, es otra de las anomalías genéticas bien definidas que han sido relacionadas con una alta incidencia de arteriosclerosis (Mc Cully, 1969, Harker et al, 1976) creen que la enfermedad vascular pudiera estar relacionada con la lesión endotelial producida por la homocistinemia.

Si se tienen en cuenta otros aspectos genéticos de la enfermedad, es posible considerar que las células musculares lisas que proliferan tras una lesión endotelial provengan de una mutación de células musculares lisas que se reproducirían y darían lugar a una proliferación monoclonal y engrosamiento de la íntima. Realmente los cultivos de células provenientes de placas arterioscleróticas están constituidos casi siempre por células de un solo tipo (Benditt et al, 1973). Sin embargo, la respuesta frente a una lesión parece consistir más en un fenómeno hiperplástico que un fenómeno de tipo neoplásico y según Fialkow (1974) debe considerarse la intervención de varios tipos de células.

## HIPERTENSION

Si bien la hipertensión podría incrementar la incidencia de enfermedad aterosclerótica (Welch et al, 1970, Waters et al, 1978) también es más conocido como un factor secundario que empeora el pronóstico de los pacientes que ya tienen una manifestación clínica de enfermedad aterosclerótica. No existen demasiados estudios de los efectos de la hipertensión propiamente sobre las placas arterioscleróticas.

En principio, la hipertensión y la distensión arterial pulsátil podrían conducir a la proliferación de células musculares lisas con engrosamiento de la media y lo más importante con un incremento del contenido de la pared arterial en elastina, colágeno y glicosaminoglicanos (Leung et al 1976, Report of the hypertension task force, 1979, Fischer et al 1980) todo ello contribuye al crecimiento de la placa aterosclerótica. En segundo lugar, no es raro pensar que un factor clave de la hipertensión para inducir la aterosclerosis podría ser la lesión endotelial causada por el efecto de la tensión sobre la pared arterial. En realidad, lo que se propone es que en la hipertensión, un incremento en la permeabilidad

del endotelio, favorecería una captación aumentada del colesterol y de los constituyentes plaquetarios que son capaces de promover la proliferación de las células musculares lisas. En tercer lugar, Wolinsky et al (1978 a y b) han indicado que tanto en la rata como en los primates, la hipertensión está asociada con un incremento en el número de lisosomas presentes en las células musculares lisas de la aorta; esto se asocia con una disminución relativa de las actividades del colesterol esterase-lisosomal de la eliminación del colesterol de la pared arterial, esto último promovería las lesiones ateroscleróticas.

#### DIABETES MELLITUS

La aterosclerosis acelerada es la complicación más importante de la diabetes insulín-dependiente que se inicia en edades tempranas (Paz-Guevara et al, 1975, Report of the National Commission on Diabetes USA, 1976). Existe una hipótesis que se supone que el mecanismo de la aterosclerosis está relacionado en parte o se añade a alteraciones de los lípidos plasmáticos. Por ello inicialmente se había sugerido que los efectos vasculares de la Diabetes mellitus eran el resultado de la dislipoproteinemia que a menudo suele asociarse (Howart et al 1978, Sosenko et al 1980).

Wolinski et al (1978 b) han estudiado ratas insulino deficientes obtenidas por inyecciones de Streptozocin o por Alloxan. La actividad específica del enzima colesterol-esterhidrolasa lisosomal está disminuido significativamente, lo cual presumiblemente favorece la acumulación de colesterol en la pared arterial; además el tratamiento con insulina reestablece los niveles normales del Enzima.

Lehner et al (1971) han informado que la arteriosclerosis aórtica inducida por dieta con elevado contenido en

colesterol producida en monos, se agrava de forma significativa por la inducción de diabetes mellitus.

Una segunda hipótesis, quizás complementaria de la hipótesis lipídica, es la que relaciona los mecanismos de la enfermedad vascular de la diabetes mellitus con la activación de las plaquetas. También existen datos de un incremento de la reactividad plaquetaria en la diabetes mellitus (Mustard et al, 1977) quizás un incremento en el factor Von Willebrand (Pandolfi et al, 1974, Bensoussan et al, 1975) en el control de la producción de prostaglandinas por las plaquetas (Colwell et al 1975, Halushka et al 1977) podrían ser las responsables para esta activación plaquetaria. Conjuntamente con este incremento en la reactividad plaquetaria, se ha observado una producción significativa de microtrombos en la microangiopatía diabética (Timperly et al, 1975).

**1.6. NECESIDAD DE LOS MODELOS  
EXPERIMENTALES**

### 1.6.1. METODOS

El uso de modelos experimentales en la investigación sobre la aterosclerosis y la acumulación de conocimientos sobre la etiopatogenia de esta enfermedad se desenvuelven a lo largo de líneas paralelas. Una revisión de la literatura revela que la mayor parte de la información existente sobre la que nosotros basamos nuestros conocimientos del proceso aterosclerótico, se debe a estudios realizados en animales.

Se han utilizado numeroso métodos para reproducir lesiones similares a las humanas y las complicaciones clínicas correspondientes, con la intención de entender mejor la morfogénesis de la aterosclerosis.

Estos métodos incluyen métodos nutricionales físicos, químicos e inmunológicos (Tabla 4) usados solos, en combinación simultánea o en combinación secuencial. Tales investigaciones, han indicado que la mayor parte de factores aterogénicos actúan principalmente a través de dos vías :

- . Proliferación de células musculares
- . Lesión endotelial

### 1.6.2. ANIMALES

CONEJO.- El conejo fue el animal utilizado en los primeros trabajos experimentales realizados por Ignatowsky (1909) Anitschow et al (1913) y Ssolowyew (1929) y desde entonces, ha sido uno de los más utilizados (Prior et al 1961, Constantinides 1965, Vesselinovitch 1974, Wissler et al 1974, Gresham y Howard 1962, Kritchevsky y cols. 1973, 1976).

**NUTRICIONALES**

Dietas altas en Colesterol, en grasas, en carbohidratos. Dietas semisintéticas dietas alternantes.

**FISICOS**

Cauterización, enfriamiento, abrasión endotelial, laceración, sutura vascular, doble ligadura, inanición por R.X., cateter (balón), fuerzas hemodinámicas (elongación, cizallamiento, turbulencia), pH, osmolaridad, suero fisiológico a 60 ° C.

**QUIMICOS**

Viosterol, Alilamina, surfactantes, turpentina, aminas vasoactivas, trombina, gelatina, enzimas líticas, alcohol polivinílico, calciferol, lipomul, hipoxia, CO, nicotina, cianamida, hormonas, catecolaminas (epinefrina, nor-epinefrina), serotonina, bradikinina, angiotensina II.

**LESION  
INMUNOLOGICA**

Infecciones (endotoxina, virus), rechazo de injerto. Complejos antígeno-anti-cuerpo. Enfermedades serológicas.

Aunque las lesiones guardan una relativa similitud con las obtenidas en humanos, se presentan una serie de inconvenientes como son: el conejo es un animal vegetariano, con un metabolismo del Colesterol distinto al del hombre, las lesiones experimentales solo se producen bajo condiciones de extrema lipidemia, la distribución topográfica e histológica de las lesiones no es la misma que la humana.

Como resumen de las observaciones realizadas en los diversos estudios, parecen concluir que la morfología de las lesiones obtenida, y la similitud de estas lesiones con la humana, depende mucho de los métodos utilizados para la inducción

CERDO.- Luginbuhl y Jones ( 1965 ) French y Jennings (1965) fueron los primeros que señalaron la presencia de aterosclerosis espontánea en algunas razas de cerdos. Detweiler et al ( 1968 ) detectaron lesiones cerebrales ateroscleróticas que se desarrollaban espontáneamente en cerdos alimentados con desperdicio de la comida humana.

Los cerdos han sido utilizados por diferentes investigadores (Rowell et al 1960, Florentin et al 1968, Lee et al 1970, Daoud et al 1976, Fuster 1979). Las ventajas de la utilización del cerdo como modelo experimental de aterosclerosis son : Anatomía y fisiología similar a la humana, facilidad para obtener líneas genéticamente puras, mayor tamaño que permite mediciones más fáciles (dificiles en especies pequeñas). Como inconvenientes hay que citar que desgraciadamente el cerdo es un animal caro y difícil de manejar. Otra desventaja es la necesidad de producir alteraciones importantes del metabolismo de los lípidos y en ocasiones hay que añadir la lesión del endotelio para obtener la enfermedad experimentalmente.

**PRIMATES.**- Su proximidad filogenética y su gran similitud antropomórfica, hacen de los primates (no humanos) los animales más adecuados para el estudio de la enfermedad humana.

Las ventajas de estos animales son evidentes ya que: es fácil encontrar especies de monos omnívoros. El metabolismo, estructura anatómica, fisiología cardio pulmonar, histogénesis y topografía de las lesiones ateroscleróticas, guardan una estrecha relación con el modelo humano, Finlayson y Simons (1963) describen estrías grasas espontáneas en un 44% de primates cautivos. Las repercusiones clínicas de la enfermedad desarrollada experimentalmente son a su vez muy similares a las humanas.

Algunas especies de monos desarrollan fácilmente lesiones y niveles lipídicos elevados que, dada la facilidad operativa, pueden ser controlados o modificados por procedimientos médicos o quirúrgicos.

En años recientes, se ha dado gran énfasis a la identificación y estandarización de los primates no humanos como modelos para el estudio de la aterosclerosis (Kottke, Subbiah, 1978). De estos estudios los más interesantes parecen ser los (Vesselinovitch y Wissler, 1966 a,b, 1979) realizados en monos rhesus (*Macaca mulata*) en los que se han conseguido lesiones similares a las humanas empleando dietas con diferentes contenidos lipídicos durante períodos variables de tiempo. Stary (1976) ha estudiado a su vez, la localización precisa de las lesiones coronarias en este tipo de monos.

Además de monos rhesus, se han empleado otras especies de primates con buenos resultados, así Wagner y Clarkson (1975) en un estudio comparativo en otras especies han encontrado que los monos de cola corta (*Macaca arctoides*)

desarrollan lesiones con una mayor proporción de tejido conectivo y lípidos que los monos rhesus al mismo tiempo que presentan lesiones importantes a nivel de coronarias, con estrechamiento de hasta un 75% de la luz arterial. El mono verdoso africano (*Cerapithecus aethiops*) parece ser más adecuado para estudios quirúrgicos, ya que desarrolla lesiones focales del tipo placa aterosclerótica. El mono ardilla (*Saimuir sciureus*) presenta una respuesta muy variable frente a dietas aterógenas, pero sus especiales características le hacen adecuado para estudiar las influencias de las variaciones genéticas.

En resumen puede decirse que, pese a su proximidad taxonómica con la especie humana, la gran variabilidad de las lesiones y la imprecisión en su localización, limitan en parte el uso de primates en estudios de etiopatogenia, quedando más indicados como modelos para el estudio de regresión o complicaciones de la enfermedad.

RATA.- Se había descrito que la aterosclerosis no se presentaba de forma espontánea en la rata, ni se la podía inducir experimentalmente. En 1956 Fillios et al describe la producción de lesiones ateroscleróticas en válvulas cardíacas y en la porción inicial de la Aorta, con una dieta rica en Colesterol, adicionada con Tiouracilo y Acido Cólico, en períodos de tiempo comprendidos entre treinta días y un año. Sin embargo, no se observaban las complicaciones típicas de infarto y otras secuelas. En contraste, Thomas et al (1959) usando una dieta similar a la que se añadía mantequilla, consigue la producción de infarto de miocardio e infarto renal pero sin lesión vascular aterosclerótica. Gresham et al (1960) estudia una serie de dietas sobre las bases anteriores, llegando a la conclusión de que si al Colesterol se le añade la mantequilla se producen infartos, pero si la mantequilla se

sustituye por aceite de cacahuete, desaparecen los infartos y en cambio surgen lesiones típicas sudanofílicas en cayado aórtico.

Otra serie de autores; Sos et al (1960), Gillman et al (1960) Altman (1972) y Aubert (1974) utilizan la vitamina D2 como inductor de la arteriosclerosis consiguiendo diferentes grados de necrosis miocárdica con calcificación y fibrosis de la aorta. El principal inconveniente de estos métodos es el alto índice de mortalidad y las lesiones fibrosas poco características.

Por otra parte, la rata ha sido considerada como el primer modelo animal a utilizar en el "screening" de fármacos que puedan prevenir o combatir la aterosclerosis (Day et al 1979).

El hecho de que se haya observado aterosclerosis espontánea en ratas reproductoras (Wexler 1964) y más recientemente incluso en machos viejos no reproductores (Wexler 1979) hace que la rata vuelva a ser considerada un animal de utilidad como modelo experimental de aterosclerosis, ya que pese a sus inconvenientes presenta unas innegables ventajas en cuanto a tamaño, manejabilidad, precio y expresión estadística de resultados.

#### OTROS ANIMALES DE INTERES

**AVES.**- Las aves muestran a menudo lesiones arterioscleróticas importantes y en algunas especies, como en gallina, se presentan lesiones avanzadas similares a las humanas. El pollo ha sido utilizado en los estudios de Katz et al en 1953 y 1961, Weiss (1959) Simpson (1961)

En la paloma también se han realizado estudios interesantes en cuanto a enfermedad espontánea y relación

con la dieta (Gresham et al 1963 , Clarkson et al 1967).

La codorniz japonesa también está siendo empleada como modelo de aterosclerosis experimental con muy buenos resultados (Day 1977, 1979).

En general, puede decirse que aunque las aves presenten la ventaja de su disponibilidad y facilidad de manejo, las diferencias con el tipo de alimentación humana, crean un factor limitante para su empleo masivo.

OTROS MAMIFEROS.- El perro y el gato han resultado ser bastante resistentes a la aterosclerosis, y han requerido, para que se produzca la lesión, la supresión de la actividad tiroidea y la adición de ácido Cólico, además de Colesterol en sus dietas.

Malmros y Sternby ( 1968 ) han inducido lesiones en perros eutiroideos con una dieta semisintética, conteniendo Colesterol y aceite de coco. Mahley et al (1974) han producido una alteración metabólica en perros muy similar a la hiperlipoproteinemia tipo III en el hombre.

### 1.6.3. ELECCION TEORICA DE UN MODELO

Desde los primeros trabajos llevados a cabo en conejos, se han utilizado numerosos animales, incluyendo pollos, perros, ratas, palomas, codornices, cerdos y no menos de 18 especies de primates. No todas las especies corrientemente empleadas en la investigación de la aterosclerosis, han sido plenamente caracterizadas, de hecho existen modelos que permiten escoger el animal más adecuado para cada problema. En la selección de modelos, son varias las consideraciones que deben jugar un papel

importante, entre ellas: Disponibilidad, Utilidad y Adaptatividad. Estas consideraciones están a su vez influenciadas por: tamaño de la población, facilidad de manipulación, coste del transporte, tamaño del animal, similitud con el hombre, adaptabilidad con el entorno y la nutrición. Estos mismos o parecidos aspectos han sido revisados por Virag (1980) que resume en forma de tabla (tabla nº 5) sus impresiones sobre los modelos experimentales.

Idealmente el investigador debería estar completamente familiarizado con el modelo experimental seleccionado, a fin de mejorar el rendimiento de los estudios. Otra condición exigible, sería que la inducción de las lesiones fuera similar a las humanas (no solo en el aspecto morfológico al final, sino también en las histogénesis) en el modelo escogido. Sobre esta condición el propio Virag (1980) ha revisado las características morfológicas de las lesiones espontáneas o provocadas en diferentes especies. El resumen se expone en la tabla nº 6.

La única salvedad a esta tabla, es que debe tenerse en cuenta que la lesión espontánea en la rata parece que también puede existir, según se ha citado anteriormente (Wexler 1964 y 1979) lo que incrementa el interés por este animal como modelo experimental. De todas formas, el hecho de que un animal padezca espontáneamente la enfermedad, puede resultar contradictorio, ya que si bien es deseable que pueda padecerla, lo que le hace similar al hombre, no es menos cierto que esto hace inmediatamente pensar en que la enfermedad espontánea puede actuar como "ruido de fondo" que puede encubrir o falsear las observaciones.

El modelo experimental además debería permitirnos el inducir respuestas consistentemente reproducibles para

TABLA Nº 5 VENTAJAS / DESVENTAJAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES UTILIZADAS EN ARTERIOSCLEROSIS EXPERIMENTAL

Parámetro	VENTAJAS ..... DESVENTAJAS				
	1	2	3	4	5
Enfermedad espontánea	CONEJO	RATA	AVES	CERDO	MONO
Hiperlipemia tras dieta	CONEJO RATA?	MONO	CERDO	AVES	RATA?
Similitud de las lesiones	MONO	CERDO	CONEJO	AVES	RATA
Afectación de pequeñas arterias	MONO	CERDO	CONEJO	AVES	RATA
Toma de muestras biológicas	CONEJO	RATA	MONO	CERDO	AVES
Manejabilidad	CONEJO	RATA	MONO	CERDO	AVES
Costo	RATA	AVES	CONEJO	MONO	CERDO
Peso	RATA	AVES	CONEJO	MONO	CERDO
Adaptibilidad	CONEJO	MONO	RATA	CERDO	AVES

TABLA Nº 6

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS COMPARATIVAS DE LAS LESIONES ESPONTANEAS E INDUCIDAS EXPERIMENTALMENTE EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES

	RATA		CONEJO		CERDO		MONO		AVES	
	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp
ESTRIA LIPIDICA	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
PLACA FIBROSA	NO	SI	SI	SI	NO?	SI	SI	SI	SI	SI
LESION COMPLICADA	NO	SI?	NO	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI?
AORTA	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
ARCO	NO	SI?	NO	SI	NO	S ?	SI	SI	NO HAY DATOS	
TORACICA	NO	SI	NO	SI	SI	S ?	SI	SI	SI	SI
ABDOMINAL	NO	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
ARTERIAS PEQUEÑAS	NO	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI	SI	SI

Exp = Espontaneamente

Exp = Experimental

permitir la comparación de los datos obtenidos en otros experimentos usando técnicas similares. Esto a su vez permitiría la oportunidad de investigar varios factores que podrían afectar a procesos relacionados, ofreciendo a los investigadores una oportunidad para explorar mejor los mecanismos implicados.

## **2. EXPERIMENTAL**

## 2.1. PROGRAMA DEL TRABAJO

- A - Desarrollo y caracterización del modelo experimental.
- B - Estudio en diferentes fases de la producción de la lesión arteriosclerótica de los siguientes aspectos:
- Funcionalismo plaquetario
  - Producción de prostaciclina ( $PGI_2$ ) por la pared arterial.
  - Morfología del endotelio aórtico y participación de los elementos formes.

Desarrollo del programa:

- A - En la primera parte del trabajo experimental se resumen los resultados obtenidos hasta alcanzar un modelo experimental válido, que es el que se expone en la pg. 133 de esta tesis.
- B - La segunda parte del trabajo experimental, que representa propiamente el núcleo central de esta tesis, se ha realizado sobre el modelo experimental ya definido en la primera parte. Para el estudio de la evolución de los parámetros previamente establecidos, se han elegido los siguientes tiempos:
- CUATRO HORAS. Cuatro horas después de la primera administración de vitamina  $D_2$ .
- VEINTICUATRO HORAS. Veinticuatro horas después de la primera administración de vitamina  $D_2$  e inmediatamente antes de la segunda.
- TRES DIAS. - Veinticuatro horas después de la tercera administración de vitamina  $D_2$  (72 horas desde el inicio).
- CINCO DIAS. - Iniciada ya la fase hiperlipídica (120 horas desde el inicio).
- DIEZ DIAS . - En pleno tratamiento hiperlipídico. (240 horas desde el inicio).
- QUINCE DIAS.- Al final del tratamiento (360 horas desde el inicio).

## 2.2. MATERIAL Y METODOS

### 2.2.1. MATERIAL

#### ANIMALES

- . Ratas Sprague-Dawley, colonia autóctona, hembras de 230  $\pm$  11 g.

#### APARATOS

- . Agitador magnético Janke-Kunkel K.G., mod. Ika Combimag.
- . Agregómetro de Born, con registro gráfico Bausch y Lomb.
- . Balanzas de precisión Sartorius, Mettler mod. 10 TM y Mettler mod. P 1200.
- . Baños María F.G.: Bode y Co. y Kotterman.
- . Cámara de deshidratación por punto crítico E3000 Polaron.
- . Centrifugas Janetzky mod. K 24, Janetzky mod. T 32, Janetzky mod. T 23 y Eppendorf mod. 3200.
- . Computadora Compucorp mod. 445/11 Estadístico.
- . Congelador -70°C Vöstch Frommern/Württ.
- . Cronómetros.
- . Diodo de "sputtering" E5000 Polaron.
- . Estufas Memmert y Investors.
- . Frigoríficos.
- . Microscopios de laboratorio Ortolux. Leitz Wetzlar y Jena.
- . Microscopio estereoscópico para disección Olympus.
- . Microscopio electrónico de "scanning" Stereoscan S-4 Cambridge Inst. Co. Ltd. y Stereoscan 180 Cambridge Inst. Co. Ltd.

- . Microtomo de congelación Pel Cool. M.S.E.
- . Microtomo de parafina tipo Minot. Reichert.
- . Procesador automático de tejidos. Shandon-Elliot.
- . Termómetro de precisión.
- . Termostatos Braun Melsungen mod. AG.

#### MATERIAL DE LABORATORIO

##### a) DE VIDRIO :

- . Cámara de contaje de Thoma.
- . Erlenmeyers de varios volúmenes.
- . Matraces y vasos de precipitados de varios volúmenes.
- . Pipetas.
- . Pipetas Pasteur.
- . Placas de Petri.
- . Portaobjetos y Cubreobjetos.
- . Probetas de varios volúmenes.
- . Tubos capilares.
- . Tubos de centrifuga siliconados.
- . Tubos de ensayo.

##### b) DE PLASTICO :

- . Jeringas de varios tamaños.
- . Placas de Petri.
- . Tubos de varios tamaños.
- . Tubos de polietileno de varios colores.

- . Puntas desechables para pipetas automáticas.

c) VARIOS:

- . Agujas hipodérmicas.
- . Pipetas Eppendorf para volúmenes comprendidos entre 5 y 1000 ml.
- . Sondas para rata.

MATERIAL QUIRURGICO

- . Bisturí con hojas intercambiables.
- . Pinzas normales con y sin diente.
- . Pinzas para Oftalmología.
- . Tijeras normales y para Oftalmología.

REACTIVOS

- . Acetato de amilo.
- . Acetato sódico Merck
- . Acetona.
- . Acido acético glacial.
- . Acido clorhídrico Merck.
- . Acido cólico.
- . Acido peryódico.
- . ADP Merck.
- . Alcohol absoluto Merck.
- . Alumbre aluminico potásico.
- . Azul Alcian Merck.

- . Azul Evans Merck.
- . Amobarbital.
- . Bisulfito sódico.
- . Carbonato de Litio.
- . Clorhidrato de Procaína Merck.
- . Cloruro sódico Merck.
- . Colágeno Stago según Caen y Legrand.
- . Colesterol.
- . Dietilbarbiturato sódico.
- . Eosina Panreac.
- . Eosina azulada Merck.
- . Formaldehido Merck.
- . Fosfato sódico monobásico.
- . Fucsina básica Merck.
- . Glucosa.
- . Glutaraldehido Merck.
- . Hematoxilina Merck.
- . Heparina.
- . Hidrato de cloral.
- . Hidróxido amónico.
- . Hidróxido sódico.
- . Iodato sódico Merck.
- . Nitrato de plata Merck.
- . Parafina Merck.
- . Rojo de Alizarina.
- . Sudan III Merck.
- . Sudan IV Gür.
- . Tetróxido de Osmio Merck.

- . Tiouracilo.
- . Trishidroximetilaminometano.
- . Verde Azul.
- . Vitamina D<sub>2</sub> Merck.
- . Xilol.

### SOLUCIONES HISTOLOGIA / MORFOLOGIA

#### BAÑO DE ACIDO SULFUROSO

- . Metabisulfito sódico 10 % 6 ml.
- . Acido Clorhídrico 1 N 5 ml.
- . Agua destilada 100 ml.

Prepárase antes del uso.

#### ACIDO PERYODICO

- . Acido peryódico 500 mg.
- . Agua destilada c.s.p. 100 ml.

#### AZUL ALCIAN

- . Acido acético glacial 3 ml.
- . Agua destilada 97 ml.
- . Azul Alcian 1 g.

#### AZUL DE EVANS

- . Azul de Evans 100 mg.
- . Solución fisiológica 5 ml.

#### CARBONATO DE PLATA

- . Sol. sat. de Carbonato de Litio 10 ml.
- . Sol. sat. de Nitrato de Plata 10 % 10 ml.

Al mezclar ambas soluciones aparece un precipitado blanco amarillento que debe decantarse y lavarse varias veces.

Se disuelve el precipitado con unas gotas de hidróxido amónico y se añaden 50 ml. de Agua destilada.

**EOSINA**

. Eosina azulada Merck	1 g.
. Eosina "Panreac"	3 g.
. Alcohol 96º c.s.p.	1 L.

**FORMOL SALINO**

. Formaldehido 37-40 % (neutro)	10 ml.
. Solución fisiológica	90 ml.

**GLUTARALDEHIDO**

. Gutaraldehido 25 %	12 ml.
. Solución fisiológica	88 ml.

**GLUTARALDEHIDO-FORMALDEHIDO**

. Formaldehido 37 % Merck	11 ml.
. Glutaraldehido 25 % Merck	4 ml.
. Tampón fosfato de Millonig	88 ml.

Este fijador debe prepararse inmediatamente antes del uso.

**HEMATOXILINA DE MAYER**

. Hematoxilina 10 % en Alcohol	10 ml.
. Iodato sódico	0,2 gr.
. Alumbre aluminico potásico	50 gr.
. Hidrato de cloral	50 gr.
. Acido cítrico	1 gr.
. Agua destilada c.s.p.	1 L.

**HERXEIMER**

. Sudan III	0,5 gr.
. Sudan IV	0,5 gr.
. Alcohol 70º	50 ml.
. Acetona	50 ml.

**ROJO DE ALIZARINA**

- . Rojo de Alizarina 100 mg.
- . Agua destilada c.s.p. 100 ml.

**REACTIVO DE SCHIFF**

- . Fucsina básica 1 gr.
- . Agua destilada 200 ml.
- . Ac. clorhídrico 1 N 20 ml.
- . Bisulfito sódico anhidro 1 gr.

Hiérvase 200 ml. de Agua destilada, agréguese la Fucsina y agítese. Déjese enfriar hasta 50° C y fíltrese. Agréguese el H Cl 1 N y déjese enfriar hasta 25° C ; anádase el bisulfito. Manténgase en la oscuridad. El líquido tarda unos días en volver se amarillo o color paja, lo que indica que está listo para su uso. Agréguese una pequeña cantidad de Carbón Activado. Agítese hasta la desaparición del color y fíltrese.

**TETROXIDO DE OSMIO**

- . Tetróxido de Osmio 0,1 gr.
- . Tampón fosfato de Millonig c.s.p. 10 ml.

**VERDE LUZ**

- . Verde luz S.F. 100 mg.
- . Agua destilada c.s.p. 100 ml.

**SOLUCIONES TAMPON****TAMPON FOSFATO DE MILLONIG**

- a) Fosfato sódico monobásico monohidrato 2,26 %
- b) Hidróxido de sodio 2,52 %
- c) Glucosa al 5,4 %

d) Solución a	41,5 ml.
Solución b	8,5 ml.
Ajustar pH 7,3	
Solución final del tampón	
Solución c	5,- ml.
Solución d	45,- ml.

#### TAMPON MICHAELIS (VERONAL ACETATO)

. Solución H Cl 0,1 N	
. Solución Veronal Acetato:	
Acetato sódico $\text{CH}_3\text{COO Na} : 3 \text{H}_2\text{O}$	19,4 gr.
Diethyl barbiturato sódico	29,4 gr.
Agua destilada hasta 1 litro	
. Solución tampón final:	
Solución H Cl 0,1 N	5,- ml.
Solución Veronal acetato	5,- ml.
Agua destilada	15,- ml.
Ajustar pH 7,3	

#### TAMPON TRIS 0,05 M

. Tris (hidroximetil) aminometano	24,2/ litro. Sol A.
. Acido clorhídrico 0,1 N	8,5 g/ litro. Sol B.
25 ml. sol. A + 45 ml. sol. B y llevar a 1 litro	
pH 7,3.	

#### TAMPON TRIS SALINO

. Cloruro sódico	2,605 gr.
. Tris (hidroximetil) aminometano	3,6342 gr.
. Agua destilada c.s.p.	1,- l.
Ajustar a pH 7,5 con H Cl 1 N.	

#### OTRAS SOLUCIONES

##### LIQUIDO DE RECuento DE PLAQUETAS

. Clorhidrato de procaína	2,43 gr.
---------------------------	----------

- . Cloruro sódico 0,20 gr.
  - . Agua destilada 0,20 gr.
- Filtrar

Este líquido se conserva en nevera durante 10 días.

## 2.2.2. METODOS

### METODO DE PRODUCCION DE ARTERIOSCLEROSIS

#### METODO DESARROLLADO POR VILLAVERDE Y COLS.

Se utilizan ratas hembras Sprague-Dawley, que se someten durante 15 días a un tratamiento aterogénico que consta de dos fases, la primera o hipervitamínica D<sub>2</sub> con la siguiente composición :

Vit. D <sub>2</sub>	320.000 UI
Colesterol	40 mg.
Aceite de Oliva	1,5 ml.

que se administra mediante sonda a razón de 1,5 ml/Kg/día durante los tres primeros días en los cuales aún se mantiene la alimentación con pienso normal y agua "ad libitum".

La segunda fase consta de una dieta hiperlipídica que sustituye al pienso normal, la composición es la siguiente :

Colesterol	50 gr.
Tiouracilo	3 gr.
Acido cólico	20 gr.
Mantequilla	400 gr.
Pienso Standard *	500 gr.

\*(Nutroton I.N.A.P.E.S.A.)

Esta dieta se mantiene durante 12 días, tras los cuales se sacrifican los animales.

El desarrollo del método y caracterización morfológica y bioquímica de las lesiones, aparece descrita en el apartado : 2.3. (Resultados)

## METODOS DE ESTUDIO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

### RECUENTO DE PLAQUETAS

Procedimiento: Contaje de plaquetas en cámara de Thoma.

Se toman 10  $\mu$ l. de la muestra (sangre o PRP) y se añaden a 990  $\mu$ l. del líquido de recuento. Con esta solución se llena el retículo de la cámara. Esta se coloca en una cámara húmeda y se deja reposar durante 10 minutos en posición horizontal para que sedimenten las plaquetas.

Transcurrido ese tiempo se lleva al microscopio y se cuentan las plaquetas de la fila superior e inferior del retículo.

#### Cálculo:

La cifra obtenida se multiplica por 10.000 que es la resultante de relacionar el factor de dilución, la superficie total del retículo y el volúmen.

El resultado se expresa en plaquetas /  $\text{mm}^3$ .

Si se hubiera empleado Heparina o Citrato al 10 % se deberá tener en cuenta para efectuar la oportuna corrección.

### METODO DE BORN PARA LA MEDIDA DE LA AGREGACION PLAQUETARIA

El método de Born (1962) es un test fotométrico basado en la medida de los cambios de transmisión de la luz que ocurren durante el proceso de la agregación.

El agregómetro consiste en un sistema analizador de luz, un termostato y un agitador magnético.

Las condiciones de trabajo se han establecido en una temperatura de 37°C y una velocidad de agitación de 700 r.p.m.

El agregómetro va conectado a su vez a un sistema de registro que proporciona resultados gráficos del proceso, la velocidad del papel es de 2,5 cm/minuto. Desde un punto de vista práctico los pasos a seguir son los siguientes:

- . Se establece la línea de base colocando en el tubo del agregómetro 0,4 ml. de PRP.
- . Se ajusta el PRP a 550.000 plaquetas  $\text{mm}^3$  con PRP.
- . Se colocan 0,4 ml de PRP ajustado en el tubo del agregómetro.
- . Se añade el agente agregante a estudiar en un volumen fijo que se determina en cada caso.

Tras la adición del agente agregante se inicia el fenómeno de la agregación produciéndose cambios fotométricos que se registran en forma de gráfica continua. ( ver figura 13).

#### Cálculo :

Se realiza sobre la gráfica. El parámetro de mayor interés :

- . Agregación máxima (A.M.). Expresa en % la altura alcanzada respecto a la línea de base ( figura 13).

Otros parámetros que se tienen en cuenta con algunos agentes agregantes son :

- . Velocidad de agregación que expresa la agregación en % obtenida en el primer minuto.
- . Tiempo de latencia que expresa el tiempo transcurrido entre la introducción del agente agregante y el inicio de la agregación.

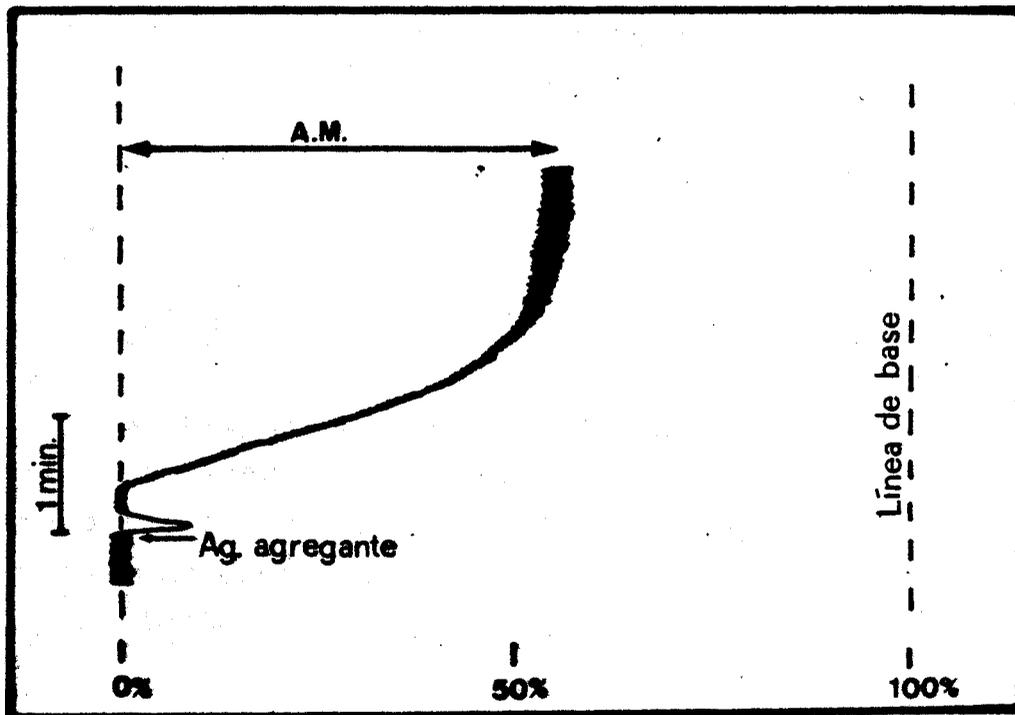


Fig. 13. Representación esquemática de una gráfica de agregación plaquetaria y de los principales parámetros utilizados en los cálculos.

## METODO PREPARACION DE LOS AGENTES AGREGANTES

### ADP

Se prepara una solución madre de ADP a una concentración de 30  $\mu$ M en Tampón de Michaelis pH 7,3. Esta solución se fracciona en alícuotas de 250  $\mu$ l que se conservan congeladas a  $-60^{\circ}$  C.

Momentos antes de llevar a cabo las agregaciones, a partir de la solución madre se preparan las oportunas soluciones en el mismo tampón de forma que añadiendo 10  $\mu$ l de solución final se consigan concentraciones de 0,93 0,46 y 0,23 nM de ADP en el PRP.

Estas soluciones agregantes se conservan en baño de hielo.

### Colágeno :

Se prepara una solución madre, reconstituyendo un vial liofilizado (STAGO) con 5 ml. de agua destilada; esta solución se conserva a  $4^{\circ}$  C. Poco antes de efectuar las agregaciones se prepara la solución final de la siguiente forma:

Se añaden 100  $\mu$ l de la solución madre a 900  $\mu$ l de tampón TRIS 0,05 M ( STAGO ) atemperado a  $33^{\circ}$  C, se incuba a esta temperatura durante 3 minutos, pasados los cuales se pone en baño de hielo. Se utilizan 100  $\mu$ l de esta solución para cada agregación, quedando una concentración de 50  $\mu$ g en el PRP.

## METODO DE ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE PGI<sub>2</sub>

### ENSAYO BIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE ACTIVIDAD PGI<sub>2</sub>

Se ha adaptado la técnica a la rata siguiendo las recomendaciones de los trabajos de Hornstra et al (1978) y T'Sao (1979).

#### Procedimiento:

- . El animal anestesiado 20' antes es desangrado vía carótida.
- . Se expone la cavidad torácica y se extrae el conjunto timo, corazón, pulmón con la mayor celeridad procurando cortar un fragmento de aorta torácica. Este conjunto se introduce en tampón TRIS 0,06 M pH 7,5 que se tiene previamente a 42 C.
- . Se procede al aislamiento y disección del fragmento de arco aórtico. El fragmento de unos 6-8 mm. deberá comprender la salida de la arteria innominada, carótida común y subclavia izquierda. Se procurará realizar estos pasos en el menor tiempo posible siguiendo un orden cronológico de tal forma que el tiempo empleado sea siempre muy parecido.
- . El fragmento de arco aórtico se introduce en 0,4 ml. de tampón TRIS 0,06 M pH 7,5 a 232 c.
- . De esta preparación se toman muestras de 10 ul a los 3, 10 y 30' de incubación. Estas muestras se añaden respectivamente a 0,4 ml. de PRP que se encuentra en el agregómetro en las condiciones pre-fijadas (550.000 plaq<sub>3</sub>/mm<sub>3</sub>, 700 r.p.m. 372 C) se esperan 10 segundos y se añade el agente agregante en nuestro caso, ADP a la concentración 0,93 μM.

- . Se valora la actividad inhibidora del incubado sobre la respuesta control inducida por el ADP.
- . Finalizada la prueba se pesa el fragmento ensayado.

NOTA : Se ha elegido la zona del arco aórtico para el estudio de producción de PGI<sub>2</sub> like dado que esta es la zona de la aorta que se lesiona de forma más temprana y constante y permite a su vez un fácil acceso para su estudio con M.E.S.

#### Cálculo :

La producción de prostaciclín "like" se calcula en función del % de inhibición de la agregación en la respuesta obtenida con una concentración conocida y constante de ADP. Esta concentración se introduce sistemáticamente durante las determinaciones utilizándose como testigo. En nuestras condiciones la concentración 0'93  $\mu$ M añadida a 0,4 de PRP + 10  $\mu$ l de tampón TRIS (0,06 M pH 7,5) produce una agregación máxima de 71,1 % (valor medio de 30 determinaciones). Se deshecharon los valores obtenidos en ensayos en los que el anillo de arco aórtico no alcanzó un peso comprendido entre 40 y 60 mg.

#### OBTENCION DE LA CURVA DE CALIBRACION CON PGI<sub>2</sub>

Se ha valorado la potencia inhibidora de la agregación de soluciones de PGI<sub>2</sub>. Dado que la PGI<sub>2</sub> natural no es estable, se ha utilizado un análogo sintético de la prostaciclina ZK 36 374 cedido por los laboratorios Schering que tiene la ventaja de su gran estabilidad (Schror 1981).

- . A partir de los viales suministrados por la firma citada cuya concentración es de  $1,35 \times 10^3$  nmoles/ml. se ha preparado una solución madre en tampón TRIS 0,06 M pH 10 a una concentración de 16 nmoles/ml.
- . Inmediatamente antes del uso se han preparado una serie de soluciones fijas en tampón TRIS 0,060 M pH 7,5 , 23°C de tal forma que en 10  $\mu$ l existieran  $4 \times 10^{-3}$  ,  $8 \times 10^{-3}$  ,  $12 \times 10^{-3}$  y  $16 \times 10^{-3}$  nmoles respectivamente.
- . Se añaden 10  $\mu$ l de estas soluciones a 0,4 ml. de PRP que se encuentran en el agregómetro en las condiciones prefijadas (550.000 plaq/mm<sup>3</sup> , 700 r.p.m. , 37°C) se esperan 10 segundos y se añade el ADP a la concentración de 0,93  $\mu$ M. Las concentraciones finales de ZK 36 374 son 10 , 20 , 30 y 40 nM respectivamente.
- . Se valora la actividad inhibidora del incubado sobre la respuesta control inducida por el ADP.

#### Cálculo :

Debe tenerse en cuenta que el ZK 36 374 en la rata posee una actividad 3,55 veces menor que la PGI<sub>2</sub> natural según datos del propio laboratorio.

## MÉTODOS DE ESTUDIO MORFOLOGICO, HISTOLOGICO/HISTOQUIMICO

### ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR

Según la técnica sugerida por Clopath ( 1979 ):

#### Técnica :

- . Dos horas antes de la autopsia, los animales fueron inyectados i.v. con 20 mg/Kg de Azul de Evans.
- . Se sacrifican los animales por inyección de 20 ml. de aire.
- . Se extrae la arteria cuidadosamente se limpia de grasa y tejido conectivo.
- . La aorta abierta longitudinalmente y lavada con agua destilada se pesa y fotografía.

En caso de interesar cuantificar la cantidad de colorante, se corta la aorta en segmentos. El colorante se extrae con formamida a 80°C durante dos horas, leyéndose el resultado el espectrofotómetro a 623 nm.

#### MÉTODOS DE FIJACION :

#### Técnica para el estudio general de vasos y órganos.

- . Se procede a la anestesia del animal mediante inyección intraperitoneal de una solución de amobarbital sódico a una concentración de 0,5 ml. por 100 gr. de rata.

- . Se canula la arteria carótida, se extrae la totalidad de la sangre y se procede a un lavado del árbol arterial mediante solución fisiológica.
- . Inmediatamente se perfunde glutaraldehído al 3% para realizar una fijación previa. Esta fijación mantenida durante unos 20 minutos permite conservar mejor el endotelio vascular.
- . Se procede a la extracción de la aorta y de los diferentes órganos que pasan a una solución de formol al 10%.

A partir de estos órganos se procede al estudio histológico realizando cortes por congelación o incluyendo en parafina dependiendo de la finalidad de la técnica. Las aortas son abiertas longitudinalmente y sometidas a la coloración Herxheimer lo que permite evaluar macroscópicamente el componente lipídico.

A partir de estas aortas se realizan también estudios histológicos sea mediante cortes por congelación o por impregnación y cortes en parafina.

#### Técnicas para el estudio mediante MES

En estos casos la fijación se realiza por un procedimiento similar, con ligeras modificaciones.

Para la fijación previa se emplea la solución de Formaldehído/Glutaraldehído. Las soluciones se preparan en tampones generalmente a un pH 7,3 teniendo en cuenta que la osmoticidad debe ser similar al tejido que se va a fijar.

La fijación previa se realiza a una presión constante para mantener al máximo la morfología original (Stachelberger et al 1977).

Para ello previamente a la perfusión del líquido fijador se determina la presión arterial del animal perfundiendo a una presión intermedia entre la máxima y la mínima ( generalmente 80-90 mm de Hg).

Se realiza una postfijación con tetróxido de osmio que preserva mejor las estructuras lipóideas a la vez que aumenta la conductividad de la muestra, favoreciendo la observación con el MES.

#### INCLUSION EN PARAFINA

##### Procedimiento rápido para procesadores automáticos

- . Lavado durante la noche
- . Alcohol de 50 1 h.
- . Alcohol de 70 1 h.
- . Alcohol de 90 1 h.
- . Alcohol de 96 1 h.
- . Alcohol absoluto 2 h.
- . Alcohol absoluto 2 h.
- . Alcohol absoluto/Xilol 30 min.
- . Xilol 30 min.
- . Xilol 1 h.
- . Parafina I ( 57º C ) 1 h. 30 min.
- . Parafina II ( 57º C ) 1 h. 30 min.
- . Parafina III ( 57º C ) 1 h. 30 min.
- . inclusión definitiva en parafina 55º C p.f.

**TINCION DE HERXEIMER****Técnica :**

- . El corte obtenido por congelación a partir de una pieza fijada en formalina, se sumerge por un momento en alcohol de 70º C.
- . Déjese en el colorante de grasas durante 5 min.
- . Enjuaguese en alcohol de 70º C sumergiendose el corte repetidas veces, hasta que no desprenda más colorante.
- . Lávese en agua. En este paso si se trata de un corte, flotará en agua, momento que se aprovechará para recogerlo con un porta sumergido en el liquido.
- . Puede contrastarse la coloración tiñiendo durante 10' con Hematoxilina de Mayer.
- . Los cortes se montan en medios acuosos.

**Resultados :**

Las grasas se tiñen de color rojo. Si se ha contrastado con Hematoxilina, los núcleos aparecen en un tono azul.

**TINCION HEMATOXILINA-EOSINA****Técnica :**

- . Hidrátense los cortes de parafina
- . Hematoxilina 10-15 min.

- . Agua con carbonato de Litio hasta color azul.
- . Lávese en agua destilada.
- . Eosina 2 min.
- . Deshidrátese, aclárese y móntese.

Resultados :

Los núcleos y zonas calcificadas aparecen de color azul, el citoplasma y fibras elásticas en color rojo amarillento.

#### IMPREGNACION ARGENTICA DE LA RETICULINA

Técnica:

- . Fijación de los órganos en Formol al 10 %, cortes por congelación de 15  $\mu$ m.
- . Los cortes se recogen en permanganato potásico al 0,5 %.
- . Lavado en agua destilada.
- . Decoloración en ácido oxálico al 5 %.
- . Lavado en agua amoniacal hasta flexibilidad.
- . Lavado.
- . Pásense los cortes a una placa de Petri que contenga solución de nitrato de plata al 3 % con unas gotas de Piridina, cúbrase la placa y póngase en

platina caliente graduada a 70 ° C.

- . Cuando los cortes hayan tomado un color amarillento, lávese en agua destilada.
- . Impréguese los cortes con carbonato de plata en solución, contenida en una placa de Petri. Colóquese la placa en una platina caliente graduada a 70° C, agreguese 5 gotas de Piridina y cúbrase. Impréguese hasta color tabaco oscuro, aproximadamente entre 10 y 12 min.
- . Lavado en agua destilada.
- . Lavado en agua con dos gotas de Piridina por cada 20 ml.
- . Reducción en Formol al 10 %.
- . Deshidrátese, aclárese y móntese.

Resultados :

Las fibrillas de reticulina aparecen en color negro y las fibras elásticas en marrón.

#### REACCION DE PAS

Técnica :

- . Trátese el corte hasta hidratación completa.
- . Colóquese 5' en solución de ácido peryódico 0,5 %.
- . Lávese en agua del grifo y luego en agua destilada.

- . Colóquese en el reactivo de Schiff 15'. En caso de tratarse de cortes por congelación, bastarán 10 min.
- . Colóquese 2' en cada baño  $H_2 SO_3$  hasta tres veces consecutivas.
- . Pásese rápidamente por agua caliente.
- . Deshidrátese en los alcoholes, aclárese y móntese.

Resultados :

Las sustancias PAS positivas aparecen en color rosa.

**AZUL ALCIAN - SCHIFF**

Técnica :

- . Póngase el corte en agua.
- . Tíñase en Azul Alcian durante 30'.
- . Lávese en agua corriente 2' y enjuáguese en agua destilada.
- . Pásese al reactivo de Schiff durante 10'.
- . Lávese en 3 cambios de ácido sulfuroso, cada uno de 2' de duración.
- . Lávese en agua corriente 5'. Deshidrátese, aclárese y móntese.

Resultados :

Los mucopolisacáridos ácidos aparecen en color azul, los básicos y neutros en rosa.

#### TINCION ROJO DE ALIZARINA

##### Técnica :

- . Hidrátense los cortes en parafina.
- . Pásense a la solución acuosa de Rojo de Alizarina 0,1 % y déjense una hora a temperatura ambiente.
- . Enjuáguese en agua corriente.
- . Tíñase durante 30' en solución acuosa de Verde luz al 0,1 %.

##### Resultados :

Las zonas calcificadas aparecen en color rojo el resto de la preparación en verde.

#### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

##### METODO DE PREPARACION M.E.S.

Modificaciones a partir de los métodos propuestos por Stachelberger et al (1977) y Kjeldsen y Thomsen (1977):

- . Fijación del animal anestesiado por perfusión i.v. con solución de Formaldehido 4% , Glutaraldehido 1%, tamponado a pH 7,3 (Sol. tampón de Millonig).

- . Se extrae la aorta, se aísla la zona del cayado y se termina la fijación en la misma solución fijadora.
- . Lavado en solución tampón pH 7,3.
- . Postfijación en Os O<sub>4</sub> al 1% tamponando a pH 7,3.
- . Lavado.
- . Deshidratación por pases sucesivos en alcohol etílico.
- . Antes de la observación, las muestras son desecadas por el método del punto crítico, utilizando acetato de amilo como líquido de transferencia y CO<sub>2</sub> como líquido de transición. Las muestras fueron metalizadas con el diodo de "sputtering" el grosor de oro depositado es de 400 Å aproximadamente. La observación se realizó en el microscopio a 20 Kv de aceleración.

#### OBSERVACION Y FOTOGRAFIA DE LAS MUESTRAS EN EL M.E.S.

Se ha sistematizado la observación, para ello se ha dividido la pantalla en 10 cuadrantes, 5 en la zona superior y 5 en la zona inferior.

Se realiza la observación inicial a unos 25x. Esta imagen inicial se copia por transparencia sobre una lámina de celuloide, en la que figura reproducido el retículo. De esta forma se dispone de una esquema sobre el cual se pueden fijar las referencias de las fotos. ( fig. 14 ).

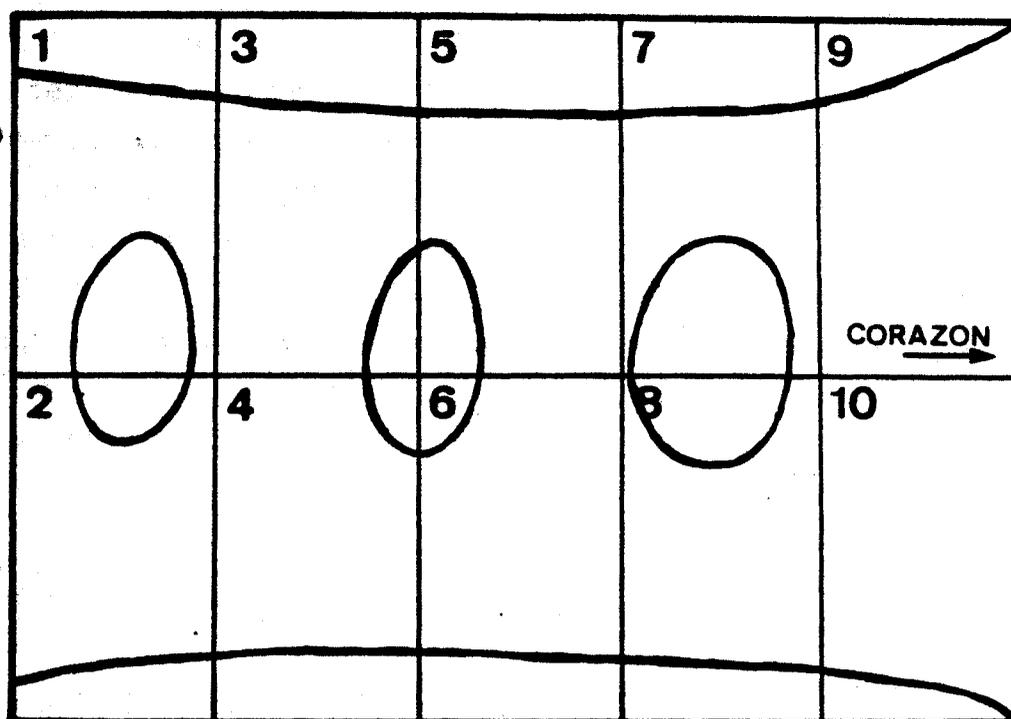


Fig. 14. Visión esquemática de la luz del arco aórtico. De izquierda a derecha se representan las salidas de la arteria subclavia izquierda, carótida común izquierda y arteria innominada.

Se procede a una observación general a 250-500X fijando las zonas de interés, ayudándose de unas anotaciones o de un dictáfono.

Posteriormente se realizan una secuencia de fotografías a 500 (bajo aumento), 1000, 2500, (aumento intermedio), 5000 y 10000 X (gran aumento) de las zonas más representativas.

Por último se realizan fotografías de detalles de especial interés, en estos casos se emplea el grado de ampliación más apropiado al elemento o campo en el que se centra la atención. Con las fotografías y el resumen obtenido en cada sesión, se procede a rellenar la ficha de cada aorta estudiada.

En los casos en que fué posible se cuantificó el fenómeno observado. En general se ha tomado como referencia la frecuencia con que aparece el fenómeno en uno o varios campos a un aumento fijo (p.e. 500 x). Sin embargo los problemas técnicos (inclinación de la muestra) y la variación individual entre ratas del mismo grupo e incluso en diferentes campos de la misma muestra hacen que estas cuantificaciones solo tengan un interés orientativo.

### METODOS VARIOS

#### OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE

##### Técnica :

- . Se anestesia la rata con solución de Amobarbital 2 %. Dosis: 0,5 ml. /100 g. de peso.
- . Incisión a la altura del rombo de la traqueotomía.
- . Se aísla por disección una de las carótidas separando cuidadosamente el nervio vago, que se encuentran próximo a ella.
- . Se liga la parte distal de la carótida para evitar el reflujo, con ayuda de un "clamp" se pinza también la parte proximal.
- . En el segmento carotídeo entre las dos ligaduras, se efectúa una incisión por la que se introduce la cánula (tubo de polivinilo de 0,8 mm. de diámetro).
- . Se fija la cánula mediante dos ligaduras.

- . Para la obtención de muestras se aspira a través de la cánula con una jeringa.

#### OBTENCION DE MUESTRAS PARA RECIENTOS DE PLAQUETAS

Según hemos podido comprobar, no se pueden realizar recuentos sucesivos en un mismo animal, ya que la repetición de punciones cardíacas o la misma canulación carotídea producen "per se" caídas en el número de plaquetas, que oscila entre 14 y 18 % (Escolar et al 1981), posiblemente relacionadas con fenómenos de lesión vascular y liberación de sustancias agregantes. El procedimiento empleado ha sido la punción cardíaca única, empleando grupos de animales para cada tiempo de observación.

#### Técnica :

- . Se anestesia el animal con eter etílico o Amobarbital (100 mg/Kg).
- . Se procede a la punción cardíaca con jeringa de plástico tipo insulina-tuberculina, previamente heparinizada. La aguja más apropiada es la 16/5.
- . Se toma una muestra de sangre de 0,3-0,4 ml. y se deposita en un tubo Eppendorf.
- . A partir de esta muestra se procede inmediatamente a realizar el recuento. Se desecha cualquier muestra defectuosa o que haya debido repetirse.

#### OBTENCION DE PLASMA

- a) Plasma rico en plaquetas :

Se recoge la muestra de sangre en una jeringa que contiene una solución de heparina 100 U/ml. en solución fisiológica. Este anticoagulante se emplea en la proporción de 1 ml. por cada 9 ml. de sangre. La muestra obtenida se pasa a tubos que se centrifugan a 900 r.p.m. (136 xg) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se separa el plasma rico en plaquetas (PRP).

b) Plasma pobre en plaquetas :

Una vez separado el plasma rico, la muestra se centrifuga a 12.000 r.p.m. ( 7250 x g.) durante 4 minutos. Tenemos así la separación total del plasma pobre (PPP) de los elementos formes.

#### METODO DE ELABORACION DE DATOS Y ESTUDIO ESTADISTICO

Previamente se realizó un estudio de distribución de los datos para comprobar el tipo de distribución. En los casos en que la distribución resultó normal, se procedió a un estudio comparativo de las variaciones entre grupos aplicando el criterio de la "f" de Snedecor. Cuando los resultados superaron este test, se aplicó el test de la "t" de Student (test paramétrico) comparando siempre con los resultados correspondientes del grupo control,

La "t" de Student se ha podido utilizar en los estudios de agregación plaquetaria y en los recuentos de plaquetas.

Cuando los resultados obtenidos no reunían las condiciones previamente citadas se empleó para su estudio comparativo el test de Wilcoxon (test no paramétrico). Los resultados de la producción de  $PGI_2$  fueron estudiados con este último test.

En cualquier caso se estudiaron los niveles de significatividad de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.001$  (\*\*) y  $P < 0.005$  (\*\*\*). El nivel mínimo exigido fue  $P < 0.05$ .

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. DESARROLLO Y CARACTERISTICAS DEL MODELO EXPERIMENTAL**

### 2.3.1. DESARROLLO Y CARACTERISTICA DEL MODELO EXPERIMENTAL DE ARTERIOSCLEROSIS EN RATA.

El desarrollo del modelo experimental es sin lugar a dudas el punto de arranque de esta tesis. La consecución de un modelo experimental útil, precisade innumerables horas de dedicación de un equipo.

El modelo de arteriosclerosis en rata utilizado en esta tesis ha sido desarrollado por el equipo del Dr. C.A. Villaverde, entre cuyos colaboradores me encuentro. Los trabajos iniciales proceden del año - 1975, desde entonces han dado lugar a varias publicaciones y presentaciones a Congresos (Villaverde et al. 1975, 1976 a, b y c, 1978 a, b y c, 1980, 1981 a,b y c).

En el III Simposium Internacional sobre Arteriosclerosis, celebrado en Berlín, Wissler (1974) expuso las diferencias entre las lesiones obtenidas experimentalmente y las desarrolladas en el hombre. Sólo el mono parecía desarrollar lesiones similares a las humanas y los modelos desarrollados en rata, distaban mucho de asemejarse al humano.

Basándonos en los trabajos de Gresham y Howard (1960) que habían conseguido lesiones experimentales con dietas hiperlipídicas, realizamos algunas experiencias en rata, sin que pudieramos producir lesiones arterioscleróticas. La adición de Tiouracilo a las dietas, recomendada por Hartrof y Thomas (1959) indujo un escaso número de infartos, tras 3 ó 4 meses de tratamiento sin que aparecieran las lesiones ateromatosas típicas.

Continuamos la búsqueda utilizando otros agentes lesionantes. La vitamina D<sub>2</sub> había sido utilizada

por otros autores Gillman et al. (1960), Sos (1961), Constantinides (1965), Altman (1972) y Aubert (1974).

Nosotros utilizamos también este método en nuestras experiencias, encontrando diferencias con respecto a los resultados obtenidos con la dieta hiperlipídica. Cuando producíamos sobrecarga de vitamina D<sub>2</sub> sola, encontrábamos lesiones localizadas en la aorta, de tipo fibroso con calcificación, pero que no podían ser coloreadas con el Sudan por lo que no pueden ser consideradas como ateromatosas. Estas lesiones se producían en un corto espacio de tiempo (5 días) y la mortalidad era muy elevada.

En vista de estos resultados, decidimos ensayar una combinación de sobrecarga de vitamina D<sub>2</sub> en los primeros días, seguida de una dieta hiperlipídica. Dado el efecto tóxico de la vitamina D<sub>2</sub>, se ensayaron dos pautas: 3 ó 4 días de administración antes de la dieta hiperlipídica. Sacrificados los animales al 5<sup>a</sup> día, las lesiones encontradas macroscópicamente, fueron prácticamente las mismas en ambos grupos, pero la supervivencia fué mayor en los grupos que tomaban 3 dosis de vitamina D<sub>2</sub> (Ver figura 15).

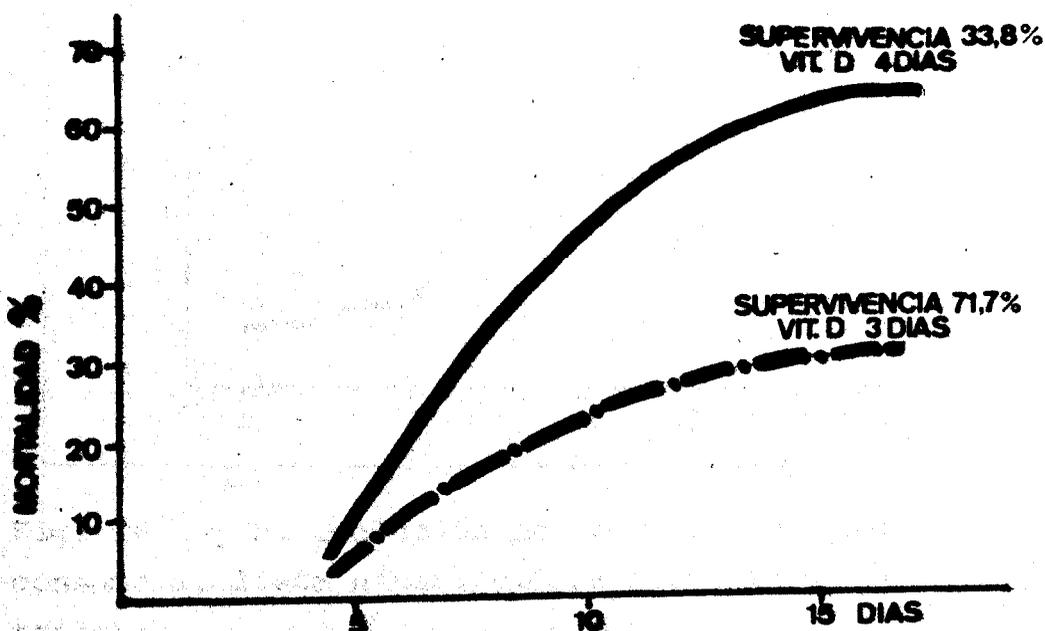


Fig. 15.- Variación de la mortalidad.

En consecuencia se eligió la pauta de 3 administraciones de vitamina D<sub>2</sub> (1 administración diaria) seguidas de 12 días de dieta hiperlipídica, tal como se ha descrito detalladamente en el apartado Material y Métodos (ver Método de producción de arteriosclerosis).

Los animales supervivientes a la inducción de la arteriosclerosis por este método sufren una pérdida de peso que se documenta en la Figura 16 a.

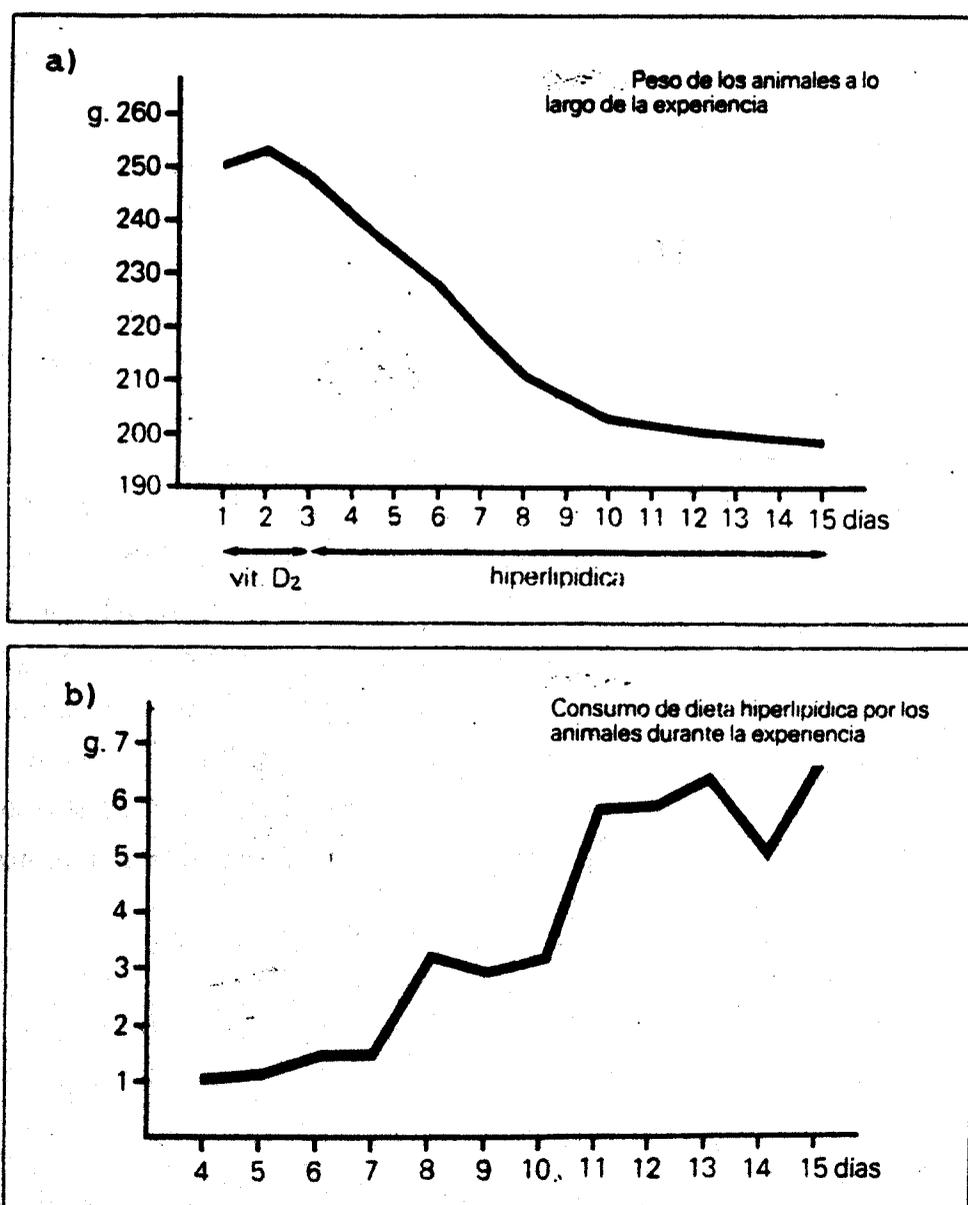


Fig. 16 a y b. Evolución del peso de los animales y consumo de dieta hiperlipídica a los largo del tratamiento.

En diferentes experiencias, llevadas a cabo en los últimos 4 años sobre un total de 2370 animales distribuidos en 198 grupos de experimentación, se ha producido una mortalidad de 28,27% con una desviación standard de  $\pm 8,51$ . La mortalidad se produce en los ocho primeros días del tratamiento. El 50% de esta mortalidad se produce entre el 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> día (tras la fase hiper vitamínica). Otro 30% ocurre entre el 5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup> día y el 20% restante se produce entre el 7<sup>a</sup> y 15<sup>a</sup> día.

En el 94% de los animales supervivientes se encontraron lesiones en la aorta.

El estudio de estas lesiones finales mediante técnicas histoquímicas resultó positivo, detectándose lesiones características que se describen a continuación.

#### LOCALIZACION DE LAS LESIONES

Los resultados de las autopsias realizadas el 15<sup>a</sup> día de tratamiento, demuestran una importante afec tación del árbol arterial, especialmente de las arterias de mediano y gran calibre. La aorta se encuentra casi siempre afectada, las lesiones no solo se producen a nivel del arco aórtico sino también a nivel de colaterales renales e ilíacas. La tinción con solución de Herxheimer, demuestra la presencia de lípidos que aparecen coloreados en rojo (Ver figura 17 y 18).



Fig. 17. Aspecto macroscópico de la aorta de una rata al final del tratamiento, se observan numerosas lesiones. Tinción Sudán. (Herxeimer).

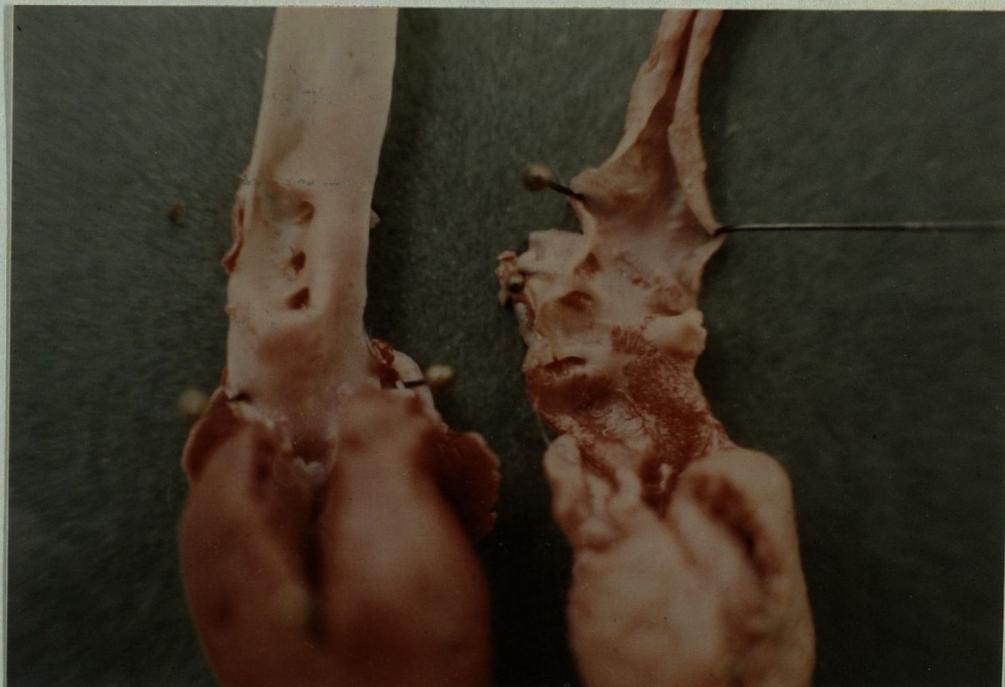


Fig. 18. Detalle de lesiones macroscópicas en el inicio del arco aórtico. La muestra de la izquierda pertenece a una animal normal. Tinción Sudán. (Herxeimer).

Mediante estudios de permeabilidad con Azul de Evans, según técnica descrita por Clopath et al. (1979), hemos comprobado depósitos azules, de colorante a nivel de arco aórtico a las 36 horas de iniciada la inducción de la arteriosclerosis (fig. 19). Esta observación indica una alteración incipiente de la permeabilidad endotelial.

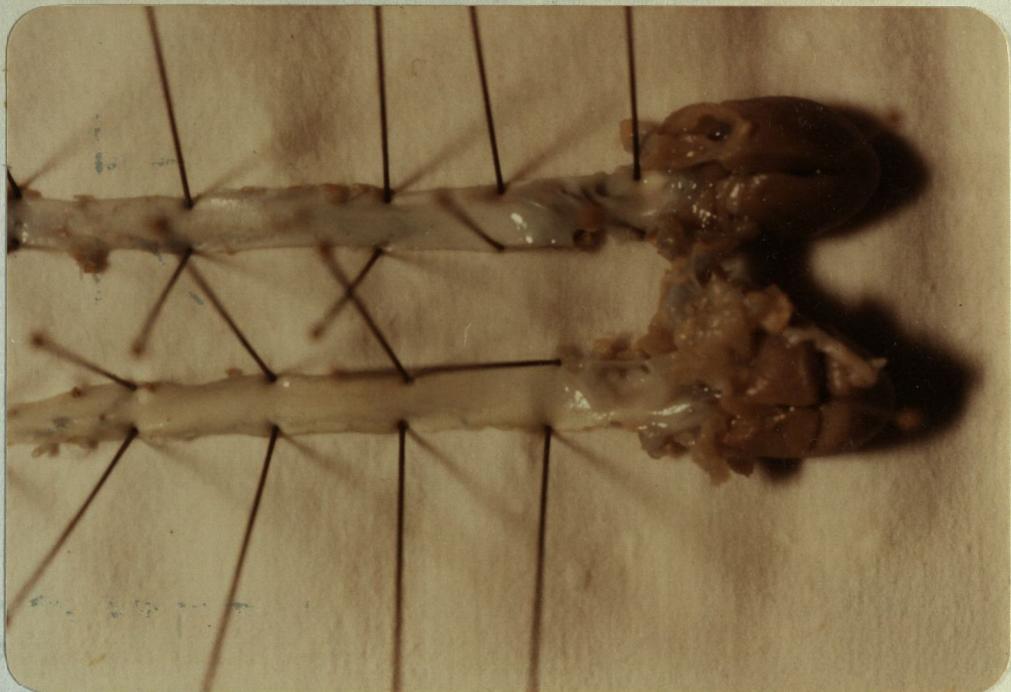


Fig. 19. La aorta de la parte superior pertenece a rata a las 36 horas de tratamiento. Se aprecia un aumento de la permeabilidad para el Azul de Evans con respecto a un animal control (parte inferior).

Las lesiones finales a nivel de aorta pueden encontrarse asociadas con otras alteraciones, hemorragias, aneurismas, etc. (fig. 20). Simultáneamente a nivel de corazón, puede observarse zonas desvitalizadas incluso macroscópicamente.