

Estudio comparativo de la reparación intimal de la aorta de animales jóvenes y viejos ateromatosos

M.E. González-González ^a, M.V. Diago-Santamaría ^b,
C. Vaquero-Puerta ^c

*A COMPARATIVE STUDY OF INTIMAL REPAIR OF THE AORTA
IN YOUNG AND OLD ATHEROMATOUS ANIMALS*

Summary. Introduction. The purpose of this research work was to evaluate the effects exerted by an atherogenic risk factor –high fat diets– on the development of atheromatous lesions induced by traumatic endothelial injury in young and adult animals. Materials and methods. The study involved a sample of 72 Spanish giant-New Zealand rabbits divided into two groups, one consisting of young rabbits (750 g) and the other made up of adult rabbits (3,500 g), in all of which endothelial injury was induced. These groups were divided into two; one was fed on a normal diet and the other received an atherogenic diet. Finally, subgroups of six animals per group were formed, which were then sacrificed at 7, 15 and 30 days after the endothelial damage. A control group made up of six animals that did not receive any kind of treatment or damaging manoeuvre was then added, as well as a reference group of six animals in which atherogenesis was induced without endothelial injury. It was expected that the alterations produced in the endothelial layer could be detected histologically and that a morphometric study would allow them to be quantified. Results. The group of adult rabbits fed on an atherogenic diet showed more alterations, both in the clinical evaluation and from a morphological and morphometric point of view. Conclusions. Lesions induced by intimal damage and an atherogenic diet were not suitable for repair, and these injuries have been observed with greater intensity in adult rabbits than in younger animals. [ANGIOLOGÍA 2005; 57: 47-60]

Key words. Age. Atherogenic diet. Atherosclerosis. Endothelial damage. Intimal repair. Rabbit.

^a Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro. Logroño, La Rioja. ^b Servicio de Cirugía General. Hospital de León. León. ^c Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Clínico de Valladolid. Valladolid, España.

Correspondencia:
Dra. M.E. González González. Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro. Avda. Autonomía de La Rioja, 3. E-26004 Logroño (La Rioja). Fax: +34 941 294 596. E-mail: megonzalez@hsm. seris.es

Este trabajo de investigación ha recibido una ayuda para el desarrollo de proyectos de investigación por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), n.º exp. 428/2002.

© 2005, ANGIOLOGÍA

Introducción

Como se sabe ampliamente, las enfermedades vasculares constituyen la primera causa de mortalidad y discapacitación en los países desarrollados, y su incidencia se liga íntimamente al envejecimiento de la población. La atherosclerosis es la causa más frecuente de enfermedad vascular arterial y suscita en

la actualidad un interés relevante. Las ingentes consecuencias humanas, sociales y económicas derivadas de esta patología han llevado en los últimos años al desarrollo de un intenso programa de investigación, dirigido a solucionar los problemas complejos de su etiología, patogenia, prevención y tratamiento.

La atherosclerosis es un proceso patológico de carácter degenerativo [1] en-

caminado a alterar la estructura de los vasos arteriales, con el desarrollo de una serie de lesiones que van desde las menos intensas, como es la hiperplasia íntima, a otras de carácter degenerativo de toda la pared y que, en ocasiones, implica la oclusión del vaso [2]. Parece ser que en la génesis de estos procesos patológicos desempeña un papel primordial el endotelio, por lo que muchas teorías consideran necesaria la alteración del mismo para el desarrollo de la lesión.

En el siglo XIX existían dos hipótesis que intentaban explicar la patogénesis de la aterosclerosis, la hipótesis 'trombogénica' de von Rokitansky [3], modificada posteriormente por Duguid [4], y la hipótesis de 'imbibición lipídica' de Virchow [5]. Estas dos hipótesis se integran actualmente en una hipótesis más compleja, la de 'respuesta al daño', postulada por Russell Ross [6-8]. Este eminente investigador, considerado por muchos el padre de la biología vascular moderna, ha hecho comprensible la enfermedad aterosclerosa. Su teoría se basa en el resultado de la disfunción endotelial, que provoca una serie de respuestas celulares y moleculares altamente especializadas, que se traducen en una enfermedad con un componente inflamatorio importante [9].

En la actualidad el endotelio vascular cobra una especial relevancia en lo que se refiere al papel que desempeña en la barrera de permeabilidad selectiva de la pared vascular, su participación en la trombogenicidad de la superficie endoluminal y sus actividades metabólicas. Estas circunstancias han hecho cen-

trar los esfuerzos de la investigación en sus características fisiopatológicas [10, 11]. La pérdida de la integridad del endotelio puede conllevar serias consecuencias, como son el incremento de la permeabilidad vascular y la acumulación de proteínas y lipoproteínas procedentes del plasma en el interior de los tejidos intersticiales, además de una hiperaadherencia plaquetaria al subendotelio con la secreción del contenido granular y la formación de trombos, junto con la proliferación y migración de células musculares lisas procedentes de la capa media por la secreción de las plaquetas y los factores de crecimiento derivados de los monocitos [12]. De esta forma y como resultado final, puede llegar a un alto estado trombogénico del contenido vascular a partir de la pared [13].

De la misma forma, el endotelio desempeña un papel primordial en el mantenimiento de la permeabilidad del vaso una vez desarrollada la lesión ateromatosa y también en los procesos reparativos de la arteria [14,15]. Sobre el aspecto de reparación arterial, los fenómenos que se desencadenan no tienen un igual desarrollo en sujetos jóvenes o adultos, por lo que el factor edad también se implicaría, posiblemente debido a cambios degenerativos de la pared y capacidad reconstructiva del vaso [16,17].

Los factores dietéticos en el desarrollo de la aterosclerosis pueden tener especial relevancia, aunque en algunos casos se han cuestionado [18]. Sin embargo, son muy útiles en la investigación experimental con la creación de modelos patológicos que simulan modelos naturales y permiten la comprobación

de la evolución de la secuencia fisiopatológica y etiopatogénica de estos hechos [19,20].

La hipótesis del trabajo se centra en que se precisan ciertas circunstancias para que se desarrolle la lesión ateromatosa de la pared vascular. De esta forma, consideramos que la lesión arterial de la íntima puede ser un factor condicionante para el desarrollo de las lesiones degenerativas de la pared, siempre y cuando se den las circunstancias y factores de riesgo adecuados, como la hiperlipemia.

Los objetivos se dirigen a valorar, de forma experimental, la aparición y extensión de lesiones de la pared arterial tras la denudación endotelial en diferentes grupos de animales alimentados con dietas estándar y aterogénicas, y valorar la influencia que tiene la edad de la arteria en la evolución de dichas lesiones. Se constata que este tipo de alteraciones se pueden detectar desde el punto de vista histológico y cuantificarlas mediante métodos morfométricos.

Materiales y métodos

Para realizar este trabajo de investigación se utilizó el conejo neozelandés-gigante español de ambos性, con un peso de 750 y 3.500 g, procedentes del animalario de la Facultad de Medicina de Valladolid. El trabajo siempre se realizó según las Directrices del Consejo de Europa de 1986 y de la Legislación Española sobre la protección de los animales utilizados en experimentación animal y otros fines científicos (BOE n.º 67, del 18 de marzo de 1988), y se aprobó

por la Comisión Ética de Experimentación Animal del centro.

Se emplearon 72 conejos, divididos en dos grupos de 36 animales cada uno; uno de ellos era de animales jóvenes (750 g de peso) y otro de animales adultos (3.500 g de peso). A todos ellos se les provocó lesión endotelial mediante catéter-balón de Fogarty. Cada subgrupo se dividió, a su vez, en dos, y se alimentó uno de ellos con dieta estándar y el otro con dieta aterogénica, por un espacio máximo de 30 días. Finalmente, se hicieron subgrupos de seis animales cada uno, que se sacrificaron a los 7, 15 y 30 días tras el daño endotelial. A estos 72 animales se añadieron tres animales jóvenes y tres adultos, a los que no se les realizó ningún tratamiento ni maniobra y que se les consideró como animales control. Además, se añadió otro grupo testigo formado por tres animales jóvenes y tres adultos, a los que se les indujo aterogénesis sin daño endotelial, hasta completar la valoración de 84 animales en el trabajo.

Protocolo de aterogénesis

Al grupo de animales alimentado con dieta aterogénica se le administró un pienso aterogénico, preparado según el protocolo de Viver y Huguet [21], modificado con las siguientes mezclas: colesterol, 25,5 g; tiouracilo, 1,5 g; ácido cílico, 10 g; mantequilla, 200 g; agua destilada para mezcla, y polvo del pienso que se mezcla con el resto de los componentes, para dar consistencia y forma cilíndrica a este alimento –similar al de la casa distribuidora– en proporción de unos 200 g por cada kilo de mezcla.

Diseño experimental

La técnica anestésica empleada en todos los grupos de animales ha sido la misma. Como premedicación se utilizó xylacina en dosis de 5 mg/kg de peso por vía intramuscular, 10 minutos previos a la actuación quirúrgica. Posteriormente, se administró clorhidrato de ketamina en dosis de 60 mg/kg de peso (por vía intraperitoneal) hasta conseguir la pérdida del tono muscular y la sensación dolorosa. En ese momento, el animal se colocó en la mesa quirúrgica en posición de decúbito dorsal, fijándose las extremidades anteriores y posteriores.

A todos los conejos, salvo los controles y testigos, se les rasuró la pata posterior derecha. Con la utilización de una técnica aséptica, se expuso la arteria femoral derecha mediante una incisión oblicua en el pliegue inguinal. Se procedió a la disección de la arteria femoral, controlándola con *vessel-loops* por debajo de una rama circunfleja muy desarrollada en el conejo y, a través de una arteriotomía transversal, se introdujo en sentido craneal hacia la aorta abdominal un catéter-balón de Fogarty 3 Fr de grosor (Baxter Healthcare Corporation).

Se infló el balón con suero fisiológico y se traccionó del catéter con el balón inflado. El proceso se repitió seis veces, rotando el catéter 120° después de cada paso para asegurar una lesión uniforme a lo largo de la aorta abdominal. Posteriormente, se retiró el catéter y se procedió a la reconstrucción de la arteria femoral mediante técnicas de microcirugía con sutura entrecortada de polipropileno de 8/0, con la utilización de gafas lupa con 3,5 aumentos. Finalmente, se

procedió al cierre de la incisión quirúrgica en un monoplano mediante grapas metálicas.

Evaluación de los animales

Una vez concluido el tiempo experimental para cada subgrupo animal de 7, 15 y 30 días, se volvió a anestesiar a los animales con idéntico protocolo que el utilizado para producir las lesiones intimales. Previamente a la extracción del segmento arterial aórtico, se procedió a realizar las pruebas funcionales mediante velocimetría ultrasónica Doppler de la aorta terminal. También se realizó un estudio angiográfico del animal laparotomizado mediante la técnica de angiografía retrógrada por vía femoral del sector estudiado, con la utilización de un aparato radiológico Radiología 50. Se realizó una valoración macroscópica *in situ* de las vísceras abdominales y de la aorta abdominal. Posteriormente, previa disección, se procedió a la extracción de la aorta abdominal. Se abrió longitudinalmente, con el objeto de valorar la superficie endoluminal, la permeabilidad u obstrucción del vaso.

Se procesaron las muestras según un protocolo estándar y se realizó un estudio histológico con un microscopio fotónico Nikon, visualizando los segmentos histológicos a 40, 100, 400, 1.000 aumentos, en este último caso con objetivo de inmersión para la observación celular.

El estudio morfométrico se realizó con la utilización de un analizador de automático computarizado interactivo (Seecan Biological Applications). Se midió el área de la aorta, factor de forma, grosor máximo de la pared, grosor

Tabla I. Valores correspondientes a la tasa de mortalidad.

		7 días	15 días	30 días
Dieta normal	Jóvenes	0	0	0
	Adultos	0	0	1
Dieta aterogénica	Jóvenes	0	1	0
	Adultos	1	2	2
Control		0	0	0
Testigo		0	0	0

Tabla II. Valores correspondientes a la tasa de permeabilidad.

		7 días	15 días	30 días
Dieta normal	Jóvenes	0	0	0
	Adultos	0	0	0
Dieta aterogénica	Jóvenes	0	1	1
	Adultos	1	2	1
Control		0	0	0
Testigo		0	0	0

mínimo de la pared y la relación del tamaño vaso/luz.

Los datos obtenidos de las diferentes determinaciones llevadas a cabo en los diferentes grupos a estudio durante los períodos experimentales definidos se introdujeron, como matriz de datos, en el programa estadístico comercial SPSS/PC+ con la ayuda de un ordenador personal IBM Personal System/2, Model 30. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de *p* fue menor de 0,05.

Resultados

En la evaluación de los resultados se han considerado las siguientes técnicas y métodos de estudio:

Tasa de mortalidad (Tabla I)

El grupo de conejos adultos alimentados con dieta aterogénica fue el que registró un mayor número de fallecimientos.

Tasa de permeabilidad (Tabla II)

Se realizó mediante una valoración ultrasónica Doppler y angiográfica. Únicamente se observaron obstrucciones arteriales en el grupo de animales alimentados con dieta aterogénica, y fue en mayor proporción en el grupo de conejos adultos.

Valoración clínica

Los animales alimentados con dieta estándar presentaron un aspecto, pelaje y vitalidad que se pudo considerar normal, semejante al de los animales que no sufrieron ningún tratamiento.

En los animales que recibieron dietas aterogénicas, la vitalidad se parecía a la de los animales de otros grupos de estudio. Su pelaje apareció como más amarillento y deslustrado y las heces tenían una solidez diferente, de color amarillento y de consistencia pastosa y maloliente.

Estudio macroscópico

En el examen corporal de los animales del grupo no aterogénico no se apreciaron alteraciones reseñables ni visceral ni en las arterias, desde el punto de vista macroscópico.

Los grupos aterogénicos mostraron, especialmente, un hígado de color amarillento, con aspecto marcado de la limitación de los lobulillos hepáticos. Las arterias de los animales sometidos a dietas aterogénicas se mostraron de color más claro con tintes amarillentos y, a veces, formaciones petequiales.

Estudio microscópico

Las arterias de los animales del grupo control mostraron imágenes donde se distinguían claramente diferenciadas las tres capas estructurales, con una capa íntima bien diferenciada, la capa media muscular con apreciación de las fibras circulares y longitudinales, y una adventicia de límites mal definidos.

En las preparaciones de la aorta pertenecientes al subgrupo de animales jóvenes alimentados con dieta estándar y a los que se provocó lesión íntimal, la valoración histológica mostró lesiones postraumáticas íntimales, especialmente en el grupo valorado a los 7 días. Estas lesiones estaban constituidas por pérdidas de continuidad de la íntima, intuyendo desprendimientos fundamentalmente endoteliales. En este período no se observó el desarrollo de procesos de reparación parietal del vaso. Los cambios fueron similares a los que se observaron en el grupo de conejos adultos. En las arterias de los conejos jóvenes sacrificados a los 15 días, las lesiones íntimales no fueron tan ostensibles, impresionando como si un proceso de reparación hubiera tenido lugar. En el grupo de conejos adultos, las imágenes de reparación íntimal obtenidas fueron similares; sin embargo, las lesiones persis-

tieron en un mayor número de preparaciones. A los 30 días, en el grupo de conejos jóvenes no se apreciaron cambios ostensibles íntimales; quizás de algunas preparaciones pudo observarse un corrugado que afectaba a toda la sección de la pared del vaso. En el grupo de animales adultos se apreció un engrosamiento íntimal leve, formado fundamentalmente por acúmulo de tejido fibroso organizado en capas. Se conservó la lámina limitante interna, al igual que aparentemente la cubierta endotelial. Estas formaciones aparecieron de forma irregular, y no afectaron a toda la circunferencia interna del vaso, sino más bien de forma localizada puntual.

En el grupo de conejos jóvenes alimentados con dieta aterogénica a los que se les provocó lesión íntimal, a los 7 días se pudo apreciar la afectación de la cubierta interna, con pérdidas de la capa endotelial en algunos casos y, en otros, lesiones más profundas que pudieron afectar la membrana limitante interna. No se apreciaron diferencias con respecto al grupo de conejos adultos. Los conejos jóvenes sacrificados a los 15 días mostraron mayor engrosamiento íntimal con formaciones irregulares con discreta anarquía estructural. En el grupo de los conejos adultos se mantuvo el mismo patrón lesional, con formaciones más irregulares. A los 30 días, en el grupo de conejos jóvenes no se ha observado una clara disposición de tendencia a la reparación de la capa endotelial. El tejido conjuntivo ha sido el componente fundamental, con disrupturas íntimales (Figura). En los conejos adultos, las lesiones fueron más intensas e irregulares,

Tabla III. Valores correspondientes al área de la aorta.

		7 días	15 días	30 días
Dieta normal	Jóvenes	521.567,21 ± 25.634,56 NS	495.445,56 ± 23.198,88 NS	533.232,21 ± 24.576,54 NS
	Adultos	484.556,48 ± 26.657,77 NS	487.867,89 ± 24.989,66 NS	512.178,99 ± 23.356,23 NS
Dieta aterogénica	Jóvenes	488.956,91 ± 29.978,34 NS	495.755,76 ± 27.872,89 NS	399.978,78 ± 34.226,23 <i>p < 0,05</i>
	Adultos	376.878,12 ± 32.384,89 <i>p < 0,05</i>	367.867,35 ± 29.956,98 <i>p < 0,05</i>	358.323,74 ± 31.967,9 <i>p < 0,001</i>
Control		512.345,55 ± 31.078,12		
Testigo		366.667,64 ± 28.223,56 <i>p < 0,001</i>		

NS: no significativo.

**Figura.** Fotomicrografía de la pared aórtica de un animal joven ateromatoso a los 30 días del estudio (tinción H-E 100x).

con formaciones laminares en la parte central y aspecto ulcerado e irregular en la parte más interna, incluso con rupturas y desapariciones de la capa limitante interna. No se observaron alteraciones de la capa media ni de la adventicia.

El grupo de animales testigo, donde se había realizado solamente una inducción ateromatosa, mostró imágenes de engrosamiento intimal de forma fusiforme al corte, con discretas zonas de desestructuración interna, con alteraciones de la capa limitante interna.

Estudio morfométrico de la pared arterial

El estudio morfométrico mostró datos cuantificables con relación a los diferentes parámetros:

– *Área de la aorta* (Tabla III): se puede constatar que en la evaluación de los conejos alimentados con dieta estándar, tanto jóvenes como adultos, no se evidencia disminución del área y los datos se equiparan con el grupo control. En los conejos que recibieron dieta aterogénica y grupo testigo, el área es menor y esta diferencia es estadísticamente significativa con relación al control.

Tabla IV. Valores correspondientes al factor forma.

		7 días	15 días	30 días
Dieta normal	Jóvenes	0,7 ± 0,2 NS	0,7 ± 0,2 NS	0,8 ± 0,2 NS
	Adultos	0,9 ± 0,2 NS	0,8 ± 0,2 NS	0,7 ± 0,2 NS
Dieta aterogénica	Jóvenes	0,8 ± 0,2 NS	0,7 ± 0,2 NS	0,8 ± 0,2 NS
	Adultos	0,9 ± 0,1 <i>p</i> < 0,05	0,9 ± 0,1 <i>p</i> < 0,05	0,9 ± 0,1 <i>p</i> < 0,05
Control		1,0 ± 0,1		
Testigo		0,9 ± 0,1 <i>p</i> < 0,05		

NS: no significativo.

Tabla V. Valores correspondientes al grosor máximo de la pared.

		7 días	15 días	30 días
Dieta normal	Jóvenes	154,45 ± 21,12 NS	134,67 ± 34,31 NS	149,98 ± 31,12 NS
	Adultos	151,78 ± 24,45 <i>p</i> < 0,05	179,87 ± 32,35 <i>p</i> < 0,05	231,56 ± 36,79 <i>p</i> < 0,01
Dieta aterogénica	Jóvenes	359,88 ± 67,76 <i>p</i> < 0,01	353,34 ± 79,89 <i>p</i> < 0,01	437,78 ± 103,34 <i>p</i> < 0,01
	Adultos	301,91 ± 56,55 <i>p</i> < 0,01	388,91 ± 87,44 <i>p</i> < 0,01	488,99 ± 91,12 <i>p</i> < 0,001
Control		128,12 ± 14,12		
Testigo		324,46 ± 65,56 <i>p</i> < 0,01		

NS: no significativo.

- *Factor forma* (Tabla IV): ofrece datos similares a los del área, y existieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los conejos alimentados con dieta aterogénica y grupo testigo.
- *Grosor máximo de la pared* (Tabla V): se observa que el grosor es mayor en el grupo de animales adultos alimentados con dieta estándar, en los jóvenes y adultos alimentados con dieta aterogénica y en el grupo testigo, y esta diferencia resulta estadísticamente significativa con respecto al grupo control.
- *Grosor mínimo de la pared* (Tabla VI): existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de animales aterogénicos y testigo.
- *Relación tamaño vaso-luz* (Tabla VII): mostró valores disminuidos en el gru-

Tabla VI. Valores correspondientes al grosor mínimo de la pared.

		7 días	15 días	30 días
Dieta normal	Jóvenes	132,87 ± 23,32 NS	128,34 ± 19,91 NS	134,76 ± 27,78 NS
	Adultos	143,23 ± 23,34 NS	123,34 ± 18,45 NS	145,57 ± 26,78 NS
Dieta aterogénica	Jóvenes	145,57 ± 26,78 NS	189,98 ± 31,12 $p < 0,05$	191,92 ± 35,55 $p < 0,05$
	Adultos	248,81 ± 65,79 $p < 0,01$	267,89 ± 89,11 $p < 0,01$	257,77 ± 81,11 $p < 0,01$
Control		121,91 ± 21,21		
Testigo		234,56 ± 34,56 $p < 0,01$		

NS: no significativo.

Tabla VII. Valores correspondientes a la relación tamaño vaso-luz.

		7 días	15 días	30 días
Dieta normal	Jóvenes	35,78 ± 19,91 NS	36,88 ± 21,23 NS	27,12 ± 12,39 NS
	Adultos	29,91 ± 18,82 NS	37,78 ± 28,21 NS	34,45 ± 23,12 NS
Dieta aterogénica	Jóvenes	25,56 ± 20,02 $p < 0,05$	26,81 ± 14,44 $p < 0,05$	27,90 ± 15,23 $p < 0,05$
	Adultos	191,19,96 ± 12,26 $p < 0,01$	18,81 ± 16,65 $p < 0,01$	21,98 ± 17,78 $p < 0,01$
Control		34,98 ± 9,98		
Testigo		26,67 ± 13,38 $p < 0,01$		

NS: no significativo.

po de conejos que recibieron dieta aterogénica y en el grupo testigo, y esta diferencia fue estadísticamente significativa con el grupo control.

Discusión

Es extremadamente difícil obtener algo más que una línea esquemática de la respuesta de la cicatrización arterial en los humanos, porque los vasos que se han intervenido, sólo se abordan de nuevo si

las lesiones neointimales son grandes y reducen el flujo sanguíneo. La imposibilidad de poder hacer un estudio histológico y bioquímico de las lesiones ateroscleróticas en los humanos secuencialmente a lo largo del tiempo ha determinado que sea absolutamente imprescindible que se utilicen los modelos animales [22]. Y se puede afirmar que la mayor parte del conocimiento actual sobre la respuesta al daño arterial se fundamenta en los estudios realizados en el animal de experimentación, generalmente con el empleo

de un mecanismo de daño endotelial mecánico [23,24]. Pero, sin duda, el mayor problema está en que las arterias manipuladas de los humanos son arterias ateroscleróticas enfermas, mientras que las arterias de los animales de experimentación son arterias sanas. Para poder solventarlo se precisa el empleo de animales, reproduciendo aterosclerosis y manipulando sus arterias mediante técnicas de cirugía vascular idénticas a las empleadas en los humanos [25].

En los últimos años se han utilizado diferentes especies de animales y territorios vasculares en el estudio de la aterosclerosis [22,26]. Para el presente trabajo de investigación hemos escogido el conejo neozelandés-gigante español. Con la utilización del conejo hemos encontrado grandes ventajas prácticas: su tamaño es muy adecuado, por lo que es fácil de manejar y es muy sensible a la aterogénesis; el coste de su alojamiento y alimentación es asumible, sobre todo cuando se necesita utilizar un elevado número de animales, como en nuestro caso. Por otra parte, es un animal que ya se ha utilizado ampliamente en otros trabajos experimentales de características similares para el estudio de la aterosclerosis [18,27].

Existen diferentes modelos experimentales de daño endotelial, y la lesión arterial mediante catéter-balón es el mecanismo más utilizado. El primer modelo que hay descrito en la literatura data de 1963, es el clásico modelo de Baumgartner [28]. Nosotros hemos optado por modificar uno de los procedimientos de Clowes et al [29], que básicamente consiste en el arrastre de un catéter-balón de Fo-

garty inflado por la arteria del animal en varias ocasiones, para producir denudación endotelial. Este modelo tiene la ventaja de que simula un daño estructural de la arteria muy parecido al que se produce en la cirugía vascular, y además no se necesita abrir el abdomen para lesionar la aorta, ya que se realiza desde la arteria femoral inguinal, disminuyendo con ello la morbimortalidad y el sufrimiento de los animales de experimentación.

En nuestro trabajo de investigación hemos tratado de caracterizar la variabilidad de los mecanismos de reparación del vaso a la lesión intimal en función de la exposición o no a un factor de riesgo aterogénico –en este caso la dieta hiperlipídica– y la variabilidad individual de respuesta a la lesión según la edad.

Se ha podido observar que los fenómenos de reparación arterial que se desencadenan tras la lesión intimal no tienen el mismo desarrollo en individuos jóvenes o adultos; posiblemente esto se deba a cambios degenerativos de la pared arterial y de la capacidad reconstructiva del vaso que tienen lugar con la edad [16,17]. La edad se considera un factor de riesgo en la patogénesis de la aterosclerosis. La pared arterial en animales adultos muestra mayor susceptibilidad para desarrollar lesiones ateroscleróticas, aunque los mecanismos por los que influye la edad no se conocen bien. Todavía no está claro si la relación entre edad y aterosclerosis es el resultado de una mayor susceptibilidad de la pared arterial en relación con alteraciones intrínsecas dependientes de la edad, o la expresión de una mayor duración de exposición a los factores de riesgo [30,31].

Numerosos estudios en animales han demostrado que al incrementar el contenido de colesterol en la dieta y la duración de exposición a dietas hiperlipídicas, se produce un mayor desarrollo de aterosclerosis. Y la dieta aterogénica asociada a la denudación endotelial acelera la aterogénesis incluso más, e induce lesiones vasculares con características más comparables a las lesiones ateroscleróticas en humanos [32,33]. Por diversos trabajos experimentales de características similares, se sabe que una vez que la pared arterial se ha denudado de endotelio, una secuencia estereotipada de acontecimientos sucede y conduce al engrosamiento intimal [24, 34]. En nuestro trabajo de investigación decidimos sacrificar los animales secuencialmente en el tiempo (a los 7, 15 y 30 días después de la lesión endotelial), para poder observar en qué momento se producía una respuesta reparadora medible y cuantificable. La utilización de la microscopía óptica y el estudio morfométrico nos han permitido valorar alteraciones estructurales en los grupos estudiados.

Hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación morfométrica de los distintos grupos estudiados. Ha llamado la atención que los conejos que recibieron una dieta aterogénica presentaron un mayor desarrollo de lesiones intimales aórticas que los conejos alimentados con dieta estándar, y estas lesiones fueron más evidentes en el grupo de conejos adultos que en los jóvenes. Debemos señalar que estos hallazgos concuerdan con los de otros trabajos publicados en la bibliografía, en los que conejos adultos ex-

puestos a dietas hiperlipídicas (0,25% colesterol) durante un período corto (dos meses) [30] o más largo (18 meses) [31] desarrollaron más aterosclerosis que los conejos jóvenes.

Sin embargo, nuestros resultados discrepan con los obtenidos en un estudio de publicación relativamente reciente [35], en los que los animales se alimentan durante un período corto de tiempo (dos meses) con dietas muy elevadas de colesterol (1% colesterol); en este experimento, aunque los niveles plasmáticos de colesterol se aumentaban de forma similar en ambos grupos de edad, las lesiones ateroscleróticas en la aorta fueron más prominentes en los animales jóvenes que en los viejos.

Estas diferencias podrían deberse a las distintas dosis de colesterol empleadas en la dieta de cada estudio. Así, se podría decir que en un medio proaterogénico, las alteraciones intrínsecas dependientes de la edad sobre la pared del vaso parecen incrementar la susceptibilidad a la aterosclerosis en conejos adultos. En contraste, la predisposición a la aterosclerosis en animales alimentados con dietas extremas hiperlipídicas puede ser significativamente mayor en conejos jóvenes [35].

En conclusión, los resultados obtenidos del estudio nos muestran que en los animales no ateromatosos la lesión provocada por daño mecánico endotelial se ha seguido de un proceso de reparación intimal, y ésta fue más precoz en los animales jóvenes que en los adultos. La administración de dietas ateromatosas ha potenciado el desarrollo de las lesiones

provocadas con la denudación endotelial y ha frenado la evolución de curación natural de las mismas. Por tanto, en el estudio se ha obtenido la impresión de que las lesiones provocadas por daño mecánico y dietas aterogénicas han presentado una disposición al mantenimiento e incluso al incremento de las mismas, sin tendencia a la reparación o curación.

Con esta información obtenida de la exposición a dieta hiperlipídica, tipo de lesión y la variabilidad biológica de la respuesta en función de la edad, hemos intentado establecer un mejor modelo para la evaluación, en un futuro, de estrategias terapéuticas designadas para limitar la progresión de la enfermedad aterosclerótica en humanos.

Bibliografía

1. Joris I, Zand T, Nunnari JJ, Krolikowski FJ, Majno G. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. *Am J Pathol* 1983; 113: 341-58.
2. Flórez-Tascón FJ, Laher E, Mencías E, González JA, Goya J, Caso J, et al. Atherosclerosis: epidemiología, prevención, factores de riesgo. *Geriatría* 1990; 6: 240-53.
3. Von Rokitansky C. A manual of pathological anatomy. London: Sydenhams Society; 1852. p. 261.
4. Duguid JB. Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Pathol* 1946; 58: 207-13.
5. Virchow R. Gesammelt Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. Frankfurt: Meidinger John; 1856. p. 145.
6. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295: 369-77.
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis –an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500.
8. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
9. Ross R. Atherosclerosis –an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
10. Cazenave JP, Klein-Soyer C, Berez A. The vascular endothelium. An important site of blood-tissue exchanges. *Inter Angio* 1984; 3: 27-32.
11. Graham LM, Burkel WE, Ford JW, Vinter DW, Kahn RH, Stanley JC. Expanded polytetrafluoroethylene vascular prostheses seeded with enzymatically derived and cultured canine endothelial cells. *Surgery* 1982; 91: 550-9.
12. Stansby G, Chan YC, Berwanger CS, Shurey S, Rook GA, Stanford JL. Prevention of experimental myointimal hyperplasia by im- munomodulation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23: 23-8.
13. Stone DH, Sivamurthy N, Contreras MA, Fitzgerald L, LoGerfo FW, Quist WC. Altered ubiquitin/proteasome expression in anastomotic intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 2001; 34: 1016-22.
14. Shepro D. Endothelial cell metabolism. *Adv Microcirc* 1980; 9: 161-205.
15. Graham LM, Burkel WE, Ford JW, Vinter DW, Kahn RH, Stanley JC. Expanded polytetrafluoroethylene vascular prostheses seeded with enzymatically derived and cultured canine endothelial cells. *Surgery* 1982; 91: 550-9.
16. Herring MS, Baughman S, Glover J. Endothelium develops on seeded human arterial prosthesis: a brief clinical note. *J Vasc Surg* 1985; 2: 727-30.
17. Arts CH, Hedeman-Joosten PP, Blankenstein JD, Staal FJ, Ng PY, Heijnen-Snyder GJ, et al. Contaminants from the transplant contribute to intimal hyperplasia associated with microvascular endothelial cell seeding. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23: 29-38.
18. Sarembock I. The limitations of the rabbit athero/injury model. *J Vasc Surg* 1995; 22: 93-4.
19. Rogers KA, Karnovsky MJ. A rapid method for the detection of early stages of atherosclerotic lesion formation. *Am J Pathol* 1988; 133: 451-5.
20. Gutiérrez-Alonso V, Carpintero L, Diago MV, Coca M, Vaquero C. Efectos de los lípidos y el alcohol sobre la pared arterial. Estudio experimental. *Clínica Cardiovascular* 1996; 14: 13-23.
21. Viver-Manresa E, Huguet-Redecilla P. Estudio experimental del efecto del clorhidrato de ticlopidina sobre el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. *Angiología* 1986; 38: 134-49.
22. Vesselinovitch D. Animal models and the

- study of atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 1011-7.
23. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR, Dewanjee MK, Badimon L, et al. Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res* 1985; 57: 105-12.
24. Rodríguez-Piñero M, Linares-Palomino JP, García-Róspide V, Salmerón-Febres LM, Moreno-Escobar G, Urbano-Valero G, et al. Nuevo modelo experimental de hiperplasia intimal en la rata. *Angiología* 1996; 1: 7-16.
25. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 418-32.
26. Fan J, Watanabe T. Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2000; 7: 26-32.
27. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983; 49: 327-33.
28. Baumgartner HR. A New method for the induction of thrombi by controlled over-dilatation of the vascular wall. *Z Gesamte Exp Med* 1963; 137: 227-47.
29. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* 1983; 49: 208-15.
30. Orlandi A, Marcellini M, Spagnoli LG. Aging influences development and progression of early aortic atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1123-36.
31. Spagnoli LG, Orlandi A, Mauriello A. Aging and atherosclerosis in the rabbit. I. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1991; 89: 11-24.
32. Recchia D, Abendschein DR, Saffitz JE, Wickline SA. The biologic behavior of balloon hyperinflation-induced arterial lesions in hypercholesterolemic pigs depends on the presence of foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 924-9.
33. Verin V, Popowski Y, Urban P, Belenger J, Redard M, Costa M, et al. Intra-arterial beta irradiation prevents neointimal hyperplasia in a hypercholesterolemic rabbit restenosis model. *Circulation* 1995; 92: 2284-90.
34. Hansrani M, Gillespie JI, Stansby G. Homocysteine in myointimal hyperplasia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23: 3-10.
35. Cortés MJ, Díez A, Pérez P. Increased early atherogenesis in young versus old hypercholesterolemic rabbits by a mechanism independent of arterial cell proliferation. *FEBS Letters* 2002; 522: 99-103.

**ESTUDIO COMPARATIVO
DE LA REPARACIÓN INTIMAL DE
LA AORTA DE ANIMALES JÓVENES
Y VIEJOS ATEROMATOSOS**

Resumen. Introducción. La finalidad de este trabajo de investigación ha sido valorar los efectos que tiene un factor de riesgo aterogénico, dietas hiperlipídicas, sobre el desarrollo de la lesión ateromatosa inducida por traumatismo endotelial en animales jóvenes y adultos. Materiales y métodos. Se utilizaron 72 conejos neozelandés-gigante español, divididos en dos grupos, uno de conejos jóvenes (750 g) y otro de conejos adultos (3.500 g), a los que se les provocó lesión endotelial. Estos grupos se dividieron en dos; se alimentó uno con dieta normal y otro con dieta aterogénica. Finalmente, se hicieron subgrupos de seis animales cada uno, que se sacrificaron a los 7, 15 y 30 días tras el daño endotelial. Se añadió un grupo control de seis animales a

**ESTUDO COMPARATIVO
DA REPARAÇÃO DA ÍNTIMA
DA AORTA DE ANIMAIS JOVENS
E VELHOS ATEROMATOSOS**

Resumo. Introdução. A finalidade deste trabalho de investigação é avaliar os efeitos de um factor de risco aterogénico, as dietas hiperlipídicas, sobre o desenvolvimento da lesão ateromatosa induzida por traumatismo endotelial em animais jovens e adultos. Materiais e métodos. Utilizaram-se 72 coelhos neozelandês-gigantes espanhóis, divididos em dois grupos: um de coelhos jovens (720 g) e outro de coelhos adultos (3.500 g), em que se provocou lesão endotelial. Estes grupos dividiram-se em dois, um foi alimentado com dieta normal e outro com dieta aterogénica. Finalmente, criaram-se subgrupos de seis animais cada, que se sacrificaram aos 7, 15 e 30 dias após a lesão endotelial. Adicionou-se um grupo de controlo de seis animais em que

los que no se realizó tratamiento ni maniobra lesional, y un grupo testigo de seis animales a los que se indujo aterogénesis sin lesión endotelial. Se consideró que las alteraciones producidas en la capa endotelial se podían detectar desde un punto de vista histológico y cuantificarlas mediante un estudio morfométrico. Resultados. El grupo de conejos adultos alimentado con dieta aterogénica presentó más alteraciones, tanto en la valoración clínica como desde el punto de vista morfológico y morfométrico. Conclusiones. Las lesiones provocadas por daño intimal y dieta aterogénica no han presentado disposición a la reparación, y estas lesiones se han mostrado con mayor intensidad en los conejos adultos que en los jóvenes. [ANGIOLOGÍA 2005; 57: 47-60]

Palabras clave. Aterosclerosis. Conejo. Daño endotelial. Dieta aterogénica. Edad. Reparación intimal.

não se realizou qualquer tratamento nem manobra lesional, e um grupo de controlo de seis animais em que se induziu aterogénesis sem lesão endotelial. Considerou-se que as alterações produzidas na camada endotelial podiam detectar-se sob um ponto de vista histológico e quantificá-las mediante um estudo morfométrico. Resultados. O grupo de coelhos adultos alimentados com dieta aterogénica apresentou alterações em maior quantidade, tanto na avaliação clínica, como do ponto de vista morfológico e morfométrico. Conclusões. As lesões provocadas por lesão da íntima e dieta aterogénica não apresentaram disposição para a reparação, e estas lesões revelaram-se com intensidade maior nos coelhos adultos do que nos jovens. [ANGIOLOGÍA 2005; 57: 47-60]

Palavras chave. Aterosclerose. Coelho. Dieta aterogénica. Idade. Lesão endotelial. Reparação da íntima.