

IMBRICACIÓN DE LOS MECANISMOS DE LA HEMOSTASIA, PLAQUETAS, PGI₂ Y FIBRINOLISIS EN LA GÉNESIS DE LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL Y ESPONTÁNEA EN EL CONEJO

M.J. Aza Pascual-Salcedo*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
Pared vascular	7
Etiopatogenia de la aterosclerosis	9
Hipótesis de la respuesta a la injuria vascular	10
Plaquetas y aterosclerosis	11
Factor de desarrollo derivado de las plaquetas y de otros sustratos celulares	11
La prostaciclina como sustancia reguladora del mecanismo plaqueta-pared vascular y aterosclerosis	13
Fibrinólisis en la génesis ateromatosa	15
EL CONEJO COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA GÉNESIS ATEROSCLEROSA	19
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Grupo de estudio de la influencia de una dieta rica en colesterol en la génesis ateromatosa en animales de 5 meses	21
Grupo de estudio de la evolución espontánea de lesiones ateroscleróticas a los 18 meses	21
Extracción de la arteria aorta	21
Procedencia de las muestras para los diferentes estudios	22
Estudio con microscopía ordinaria	22
1. Preparación de muestras	22
2. Composición topográfica para el estudio de lesiones y clasificación de las mismas	22
3. Técnicas de tinción	22
Estudio con microscopía electrónica	23
1. Preparación de muestras	23
2. Reactivos	23
Estudio de la fibrinólisis en la pared arterial	24
1. Preparación de muestras	24
2. Reactivos	24
Valoración de las prostaciclina en su forma de metabolito 6-oxo-PGF _{1a} por radioinmunoensayo	25
1. Preparación de muestras	25
Determinación de colesterol	25
Análisis estadístico	25
CASUÍSTICA	27

* Investigadora agregada. Departamento de Ciencias Experimentales, Instituto de Estudios Riojanos. Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital San Millán de la Seguridad Social, Logroño.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
Determinación de colesterol (mg/100 ml) en suero	29
1. Grupo de 5 meses	29
Determinación del metabolito 6-oxo-PGF _{1a} en cayado aórtico	29
1. Grupo de 5 meses	29
2. Grupo de 18 meses	30
3. Comparación de la producción del metabolito entre el lote control y el grupo de 18 meses	31
RESULTADOS	33
Valoración con microscopía óptica de la incidencia de lesiones ateroscleróticas en arteria aorta y de la estructura histológica y de las lesiones ateroscleróticas	33
1. Grupo de 5 meses	33
2. Grupo de 18 meses	39
Valoración ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión del cayado aórtico y de sus lesiones ateroscleróticas. Especial referencia al elemento plaquetar	47
1. Grupo de 5 meses	47
2. Grupo de 18 meses	52
Valoración del colesterol en el grupo de 5 meses de experimentación	57
Determinación de 6-oxo-PGF _{1a} en cayado aórtico	58
1. Grupo de 5 meses	58
2. Grupo de 18 meses	60
3. Comparación de la producción del metabolito entre el lote control de 5 meses y el grupo de 18 meses	61
Valoración de la actividad fibrinolítica en el tercio distal del cayado aórtico	61
1. Grupo de 5 meses	61
2. Grupo de 18 meses	64
Correlación entre la actividad fibrinolítica y la liberación de 6-oxo-PGF _{1a}	66
1. Grupo de 5 meses	66
2. Grupo de 18 meses	69
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	71
Análisis de la incidencia y características de las lesiones ateroscleróticas en el cayado aórtico del grupo de 5 meses	71
Análisis de la incidencia y características de las lesiones ateroscleróticas en el cayado aórtico del grupo de 18 meses	72
Análisis de la valoración del colesterol en el grupo de 5 meses	73
Análisis de la determinación de 6-oxo-PGF _{1a} en el grupo de 5 meses	74
Análisis de la determinación de 6-oxo-PGF _{1a} en el grupo de 18 meses	74
Análisis comparativo de la producción de 6-oxo-PGF _{1a} entre el lote control de 5 meses y el grupo de 18 meses	74
Análisis del estudio de la actividad fibrinolítica del cayado aórtico en el grupo de 5 meses y comparación con la producción del metabolito 6-oxo-PGF _{1a} ...	74
Análisis del estudio de la actividad fibrinolítica del cayado aórtico en el grupo de 18 meses y comparación con la producción del metabolito 6-oxo-PGF _{1a} .	75
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	89

INTRODUCCIÓN

Como es bien sabido, el término de arteriosclerosis fue ideado por LOBSTEIN (138) a principio del siglo XIX para designar los procesos que aparecen en el envejecimiento de la pared arterial. Los datos más importantes de su etiología fueron descritos en el año 1904 por MARCHAND (144), que estudió el papel de los procesos inflamatorios vasculares crónicos como causa de arteriosclerosis. Este mismo autor describió los mecanismos degenerativos de las placas de ateroma, e hizo alusión a las alteraciones de las grasas en el plasma. WINDAUS (249) demostró en el año 1910 la importancia de los lípidos en el desarrollo de placas de ateroma y comprobó el papel de la colesterolina como causa primaria de la lesión ateromatosa.

La OMS en el año 1958 definió la aterosclerosis como la asociación en proporciones variables de modificaciones de la capa íntima de las arterias, consistentes en el acúmulo local de lípidos complejos, carbohidratos, sangre, depósitos de calcio, productos de origen sanguíneo y tejido fibroso, con modificaciones de la capa media. Por tanto, el centro de desarrollo de la aterosclerosis es la pared de grandes y medianos vasos arteriales.

De los diferentes elementos que conforman los vasos arteriales, la lámina endotelial y el subendotelio constituyen el centro biológico de gran parte de los fenómenos relacionados con el desarrollo de la aterosclerosis.

Pared vascular

El endotelio vascular consiste en una simple capa alisada, uniforme y poligonal de células elongadas de aproximadamente 25 a 50 micras de largo por 10 a 15 micras de ancho, cuya longitud axial está orientada en dirección a la corriente sanguínea y se articulan por sus extremos constituyendo una capa fina e impermeable en condiciones fisiológicas, que controla la entrada de nutrientes al interior de la pared arterial.

Las células endoteliales están cubiertas por carbohidratos o glicocáliz, identificados como una capa endocapilar por LUFT (142), utilizando un término empleado en 1940 por CHAMBERS y ZWEIFACH (32 Y 33) para describir un material similar al del cemento intercelular que cubre la superficie intraluminal del endotelio. Los carbohidratos en el glicocáliz incluyen polisacáridos ricos en radicales, glicoproteínas y glicolípidos, así como polisacáridos libres y glicosaminglicanos.

Aunque desde el punto de vista morfológico las células endoteliales son relativamente homogéneas, hay diferencias en su tamaño y grosor: las células aórticas son más gruesas que las de los capilares y las venas, SIMIONESCU y SIMIONESCU (203), SIMIONESCU et al. (201), existen variaciones en el número de ciertas organelas etc. De gran

interés son las diferencias halladas en las uniones interendoteliales. Hay fundamentalmente dos categorías de endotelio: 1) endotelio continuo, hallado en arterias, venas y capilares musculares y 2) endotelio fenestrado, formando los capilares viscerales. SIMIONESCU et al. (202) evidencian que cada segmento de la circulación tiene distintas características en las uniones intercelulares: las arteriolas poseen un sistema de unión más complejo, compuesto por una red continua de uniones permeables en las cercanías de las grandes uniones de comunicación, SIMIONESCU et al. (200); las arterias tienen también un sistema compuesto por uniones permeables y uniones con acceso o entrada considerado menos complejo que el de las arteriolas, SIMIONESCU et al. (202); los capilares por el contrario difieren por ser menos complicada su organización y no poseer uniones comunicantes, SIMIONESCU et al. (200).

La célula endotelial se adhiere a la zona subendotelial por medio de unas condensaciones densas y es muy sensible a los cambios físicos o químicos derivados de las agresiones múltiples, que le provocan alteraciones funcionales pudiendo llegar a producirse la denudación o caída del endotelio dejando al descubierto la zona subendotelial.

El subendotelio vascular es la estructura principal en el inicio de la patología aterosclerótica y está formado por membrana basal, colágeno, elastina y microfibrillas, SPAET y STEMERMAN (217).

La membrana basal aparece como una estructura en estrías, unas veces finas y otras anchas, teniendo su máxima expresión en los capilares.

El colágeno es un material de tejido conectivo abundante en los vasos de calibre intermedio y de gran tamaño. Desde que BOUNAMEAUX (18) y HUGUES (113) demostraron por primera vez la adhesión de las plaquetas al colágeno, su interés fue creciendo por el papel que podía desempeñar en la génesis de la aterosclerosis y trombosis. Se han caracterizado diversos tipos de colágeno que difieren no solamente en su estructura al microscopio electrónico, sino también en sus propiedades fisicoquímicas además de las biológicas. Los colágenos de tipo III y IV, de gran interés por su naturaleza y actividad biológica, son sintetizados fundamentalmente por el endotelio y el tipo I, de menor interés biológico, es sintetizado por las fibras musculares lisas.

La elastina y microfibrillas son formaciones fibrilares de tejido conectivo que difieren en aspecto y propiedades fisicoquímicas y constituyen, en un vaso denudado de su endotelio, el principal lecho para la adhesión plaquetar, fundamentalmente las microfibrillas.

La capa íntima, constituida por endotelio y subendotelio, queda separada de la capa media por la lámina elástica interna, formada por una membrana tubular fenestrada compuesta por elastina y cuyo grosor depende del calibre del vaso arterial correspondiente.

Capa media. Está formada por estratos sucesivos de fibras musculares lisas dispuestas en sentido circular y fibras elásticas. En los espacios existentes entre los estratos hay capas de tejido conectivo con fibras de colágeno muy finas, fibroblastos y células musculares lisas con el núcleo alargado que adquieren forma plana.

Adventicia. Está formada por tejido conjuntivo y fibras elásticas.

La capa íntima es el principal sustrato involucrado en la aterosclerosis, aunque secundariamente procesos muy importantes se localizan en la capa media. Según MCGILL (146 y 149) y MCGILL et al. (148), el primer cambio objetivo que se produce en las arterias coronarias desde el nacimiento es un ensanchamiento difuso de la capa íntima. En los estadios avanzados de la vida se pueden identificar tres tipos diferentes de lesiones: estrías grasas, placas fibrosas y lesiones complicadas. Las estrías grasas son las primeras lesiones de la aterosclerosis, comúnmente halladas en niños, que consisten en una planicie gruesa con abundantes lípidos, macrófagos y alguna célula muscular lisa, MCGILL (147). Las

placas fibrosas hacen prominencia hacia la luz del vaso y están formadas por células musculares lisas cargadas de lípidos, así como por lípidos rodeando las mismas, colágeno, fibras elásticas y proteinglicanos. Las lesiones complicadas proceden de placas fibrosas alteradas como resultado de hemorragias, calcificaciones, necrosis celular y trombosis mural.

Etiopatogenia de la aterosclerosis

Hasta hace unos años, para explicar y entender la patogenia de la aterosclerosis se invocaba a observaciones referidas fundamentalmente a lípidos como las siguientes: a) el ateroma tiene abundantes lípidos intra y extracelulares; b) la hiperlipemia es un factor de riesgo aterogénico de gran importancia y c) en la experimentación animal únicamente se pueden reproducir las lesiones de la pared vascular de tipo aterosclerótico, sometiendo a los animales a dietas ricas en colesterol o adoptando medidas dietéticas especiales. Por este motivo la investigación en aterosclerosis se centra durante mucho tiempo en el metabolismo y transporte de los lípidos y su posible tratamiento, considerando a los diferentes procesos hemostáticos que de alguna manera pueden imbricarse en la génesis ateromatosa como fruto de complicación sin significación causal.

En los últimos años la aplicación de nuevos métodos a la biología celular, sobre todo el aislamiento de células de la pared vascular de cultivos in vitro, han creado nuevas perspectivas de investigación y por consiguiente de comprensión de la patogenia de la aterosclerosis y de la hemostasia las cuales, como expondremos más adelante, se interrelacionan.

Hace unos 135 años ROKITANSKY (187) describió el ateroma como un excesivo depósito de productos sanguíneos, particularmente de fibrina, que se acumulaban a nivel de la membrana de los vasos. Este criterio o hipótesis se ha conocido clásicamente como la teoría trombogénica de la aterosclerosis. Frente a esta teoría VIRCHOW (241) dio a conocer cuatro años más tarde lo que también clásicamente se denomina como la teoría de la proliferación celular o teoría inflamatoria, la cual considera la placa de ateroma como el resultado de un proceso inflamatorio y el engrosamiento de la capa íntima como una proliferación celular de tejido conectivo. Se puede considerar que ambas teorías tienen validez en la actualidad. La primera de ellas está en íntima conexión con la imbricación del sistema de la hemostasia en la génesis aterosclerosa y la segunda sería compatible con la teoría de la proliferación de células musculares lisas tras la injuria vascular, teoría desarrollada en los años 70 por ROSS y su escuela.

Es evidente que la etiopatogenia de la aterosclerosis abarca diferentes fenómenos, lo que ha conducido a sugerir y plantear multitud de hipótesis o teorías que de alguna manera llegan a explicar distintas parcelas del origen de este proceso. Este criterio de la multifactorialidad del origen de la aterosclerosis fue perfectamente desarrollado por KOTTKE y SUBBIAH (127) conteniendo su explicación una síntesis de las diferentes teorías. Prácticamente todas las hipótesis parten de la rotura de la integridad de la línea endotelial como consecuencia de diferentes agentes o noxas tras la cual, por medio de sustancias con actividad de proliferación y migración de las células musculares lisas así como de activación de la síntesis de elastina, colágeno y mucopolisacaridos, se produce la formación de la placa aterosclerótica que origina la clínica correspondiente al lugar de su formación.

A pesar de que los fenómenos de la coagulación sanguínea se han relacionado con la aterosclerosis desde la época de ROKITANSKY, como ya se ha indicado, algunos de los mecanismos que intervienen no están totalmente aclarados. No obstante, los mecanismos

hemostáticos que se relacionan con la patogenia de la aterosclerosis han servido de base para la puesta en marcha de una de las pocas terapéuticas eficaces contra complicaciones derivadas de las lesiones ateroscleróticas, la terapéutica antiagregante.

Hipótesis de la respuesta a la injuria vascular

Una de las teorías más recientes sobre la patogenia de la aterosclerosis se debe a ROSS (189 y 190) y representa una modificación de la teoría inflamatoria de VIRCHOW (241) modificada más tarde por DUGUID (68) y posteriormente por FRENCH (79). Esta hipótesis sugiere que algunas formas de injuria vascular tales como fuerzas hemodinámicas FRY (83), bacterias DALLDORF et al. (55), GAYNOR et al. (89), virus BURCH (26), endotoxinas KNIKER y COCHRANE (125), complejos antígeno-anticuerpo LePOW et al. (134), metabolitos anormales como la homocisteína HARKER et al. (108), monóxido de carbono MUSTARD y MURPHY (161) y radicales oxígeno SHATOS et al. (198), IMAI et al. (115), alteran y por tanto modifican el estatus fisiológico de las células endoteliales. Si esta alteración es leve el resultado puede ser un aumento en la permeabilidad celular, pero si los cambios en las células endoteliales son importantes, la descamación local que se produce deja expuesta una zona de tejido conectivo constituida por membrana basal, fibras de colágeno, proteoglicanos y células musculares lisas.

La hipótesis sugiere que la exposición del tejido conectivo subendotelial permite una secuencia de pasos que involucran a plaquetas y monocitos, que van a desempeñar un papel primordial en la génesis ateromatosa. Las plaquetas van a adherirse y agregarse liberando más tarde el material contenido dentro de sus gránulos. Durante esta situación la función celular está alterada y la barrera endotelial pierde su capacidad fisiológica y selectiva y permite que constituyentes plasmáticos, tales como las lipoproteínas, puedan acceder libremente a la pared del vaso arterial. La presencia del material procedente de la liberación plaquetar y del plasma, promueve la migración de las células musculares lisas de la capa media a la íntima y su proliferación, terminando por desarrollar la lesión aterosclerótica. En cuanto a la participación de los monocitos en la génesis aterosclerótica, aunque no es objetivo fundamental de este estudio, resulta obligado reseñar que su papel está relacionado con las etapas iniciales del proceso. Una de las primera intervenciones de los monocitos, que ocurre en la hipercolesterolemia, es produciendo una injuria a la célula endotelial, FAGGIOTTO et al. (75), GERRITY et al. (92). Varios estudios han analizado la capacidad de las sustancias asociadas a respuestas inflamatorias mediadas por los macrófagos, de inducir el ataque leucocitario al endotelio. DICORLETO y De la MOTTE (65) observan que la línea celular monocitaria U-937 y los monocitos de sangre periférica, alteran o regeneran células endoteliales en cultivo. BEVILACQUA et al. (16) hallan que la interleukina-1, producto tanto de los macrófagos como de las células endoteliales, podría inducir un incremento en la adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio arterial. Ulteriormente los macrófagos producen una de las más potentes sustancias quimiotácticas conocidas, el leucotrieno B₄, producto derivado del ácido araquidónico por el sistema de la lipoxigenasa, MARTIN et al. (145). Esta sustancia puede ser muy importante en la modulación de la pared arterial durante y después de la aterogénesis.

Esta hipótesis también sugiere que si la injuria vascular no es muy intensa, las lesiones pueden ser reversibles llegando a desaparecer las modificaciones que pudieran haberse producido.

Estudios de cinética y morfometría celular han establecido que la proliferación de las células musculares lisas es fruto de la injuria vascular y han demostrado una sustancial migración de estas células de la capa media a la íntima, THOMAS et al. (228). Los estu-

dios celulares junto con los estudios de interacción plaquetar y del mecanismo de la denudación del endotelio de la pared vascular arterial, permitieron comprobar que la proliferación de las células musculares lisas es el resultado de la acción de un factor de desarrollo derivado de las plaquetas (PDGF), ROSS Y HARKER (192), HARKER et al. (107).

Plaquetas y aterosclerosis

Existe evidencia en la experimentación con modelos animales, de que las lesiones proliferativas de la capa íntima a partir de la denudación endotelial son dependientes del sistema plaquetar.

Varios estudios experimentales han apoyado esta hipótesis desde diferentes hechos. MOORE et al. (158) indican que en el conejo las lesiones ateroscleróticas producidas por continuas o repetidas injurias vasculares, pueden ser inhibidas significativamente induciendo trombocitopenias con antiseros antiplaquetas. FRIEDMAN et al. (81) señalan que las lesiones fibromusculoelásticas que se desarrollan como respuesta arterial a una simple injuria vascular, son inhibidas en animales con severa trombocitopenia producida por antiseros antiplaquetas. HARKER et al. (108) observan en un modelo de primate sometido a la administración intravenosa de homocisteína, que se desarrollan placas de aterosclerosis con gran denudación endotelial que se previenen con fármacos con actividad antiagregante plaquetar. FUSTER et al. (85) han demostrado que la interacción de las plaquetas es necesaria para el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, pues en cerdos con la enfermedad de von Willebrand y con dieta aterogénica no se generan lesiones y por el contrario en animales normales con el mismo régimen hipercolesterolémico se desarrollan lesiones proliferativas de aterosclerosis. Todos estos trabajos reconocen un papel primordial o central a las plaquetas en la inducción de la aterosclerosis, sugiriendo que el factor de desarrollo derivado de las plaquetas puede ser uno de los componentes más importantes en la respuesta proliferativa.

De los últimos ensayos con hipercolesterolemias experimentales se llega a la conclusión de la responsabilidad de las plaquetas en la génesis de las placas ateromatosas. FAGGIOTTO et al. (75) han observado una correlación entre el nivel y duración de la hipercolesterolemia y la localización de las alteraciones celulares arteriales que preceden a la formación de las placas grasas o fibrosas avanzadas, sugiriendo que la interacción plaquetar precede a la lesión proliferativa y de esta forma el factor de desarrollo derivado de las plaquetas desempeña un papel importante en este proceso. No obstante, existen observaciones clínicas que de alguna manera contrastan con estos resultados. Hay pacientes con enfermedad de von Willebrand del tipo I (con tasas de F-W entre el 15 y el 60 por cien) que desarrollan placas de ateroma y por tanto parecen no estar protegidos en el desarrollo de las mismas, HOAK (112), RAPAPORT (183).

Factor de desarrollo derivado de las plaquetas y de otros sustratos celulares

Cuando se altera la pared arterial y se produce una denudación endotelial quedando al descubierto el espacio subendotelial, una capa o alfombra de elementos plaquetares se adhiere a la porción denudada y esta adhesión plaquetar parece ser independiente de los procesos coagulativos sanguíneos, pues no se inhibe con heparina a la concentración inhibitoria de los procesos de coagulación, siendo posible que se produzca por principios termodinámicos, BOYCE et al. (19). La adhesión plaquetar depende del balance entre las fuerzas

positivas y negativas que aportan la zona desnuda y la membrana plaquetar y la extensión del trombo está relacionada con el balance entre las fuerzas coagulantes y anticoagulantes del medio en el que se desarrolla el proceso. El acúmulo de las plaquetas dependerá en gran manera de la constitución histológica de la zona a la que van a adherirse, ya que la membrana basal va a ser poco receptiva en contraste con las zonas donde exista gran riqueza de colágeno y microfibrillas, lugares de gran sensibilidad para la adhesión plaquetar, BARNES y MACINTYRE (14), donde se forma el microtrombo plaquetar y de forma no muy conocida se produce la liberación granular y por tanto la liberación del factor de desarrollo derivado de las plaquetas, ROSS y HARKER (192).

Los factores de desarrollo constituyen un grupo de polipéptidos biológicamente activos que tienen la propiedad de que a bajas concentraciones y por interacciones específicas inducen la proliferación de las células de origen, RAINES y ROSS (182). El primer factor de desarrollo bien estudiado y el mejor caracterizado de todos ellos es el derivado de las plaquetas (PDGF), ANTONIADES (4). El descubrimiento se produjo por la observación de BALK (12) de la mayor eficiencia del suero respecto al plasma en la estimulación del desarrollo de un cultivo de fibroblastos. Posteriores ensayos demostraron que las plaquetas eran las causantes de desencadenar la actividad del desarrollo en los cultivos de células de tejido conectivo. ROSS et al. (191) demostraron en un cultivo de células musculares lisas que el suero sanguíneo y no el plasma aportaba el factor de desarrollo. KOHLER y LIFTON (126) observaron la influencia de las plaquetas en un cultivo de fibroblastos y WESTERMARK y WASTESON (245 y 246) en un cultivo de células gliales. Estudios posteriores llevaron a la identificación del PDGF en los megacariocitos y en los alfa-gránulos plaquetares, CHERNOFF et al. (35), KAPLAN et al. (121). Además de la propiedad mitogénica, recientes estudios han demostrado otras propiedades del PDGF como la de ser quimotáctico para las células musculares lisas, GROTENDORST et al. (101) y estimulador de la producción de prostaciclina en las células endoteliales a pesar de que estas células no tengan respuesta mitogénica.

Otros factores de desarrollo son los producidos por las células endoteliales (ECDGF), GAJDUSEK et al. (86), monocitos/macrófagos (MDGF), VAN FURTH (236), LIEBOVICH y ROSS (136), GLENN y ROSS (94), fibroblastos (FGF), GOSPODAROWICZ et al. (99), WITTE et al. (252) y el factor epidérmico hallado en la orina, leche y suero (EGF), SCHWATZ y GAJDUSEK (196). En estos factores enumerados se detecta actividad mitogénica pero no están tan estudiados como el derivado de las plaquetas, aunque últimamente se han podido documentar algunas de sus propiedades fisicoquímicas.

De todos los factores mitogénicos descritos, son los derivados de las plaquetas y de los monocitos los más relacionados con la génesis de la aterosclerosis. El PDGF además de poseer acciones quimiotácticas y proliferativas sobre las células musculares lisas va a intervenir: a) induciendo la activación de la proteinquinasa que produce su autofosforilización incrementando los receptores LDL, CHAIT et al. (29), WITTE et al. (251), b) estimulando el metabolismo fosfolipídico, HABENICHT et al. (104) y c) aumentando la síntesis proteica y del mRNA, COCHRAN et al. (46), procesos fundamentales en el desarrollo de la aterogénesis. Por otra parte, el factor derivado de los monocitos (MDGF) puede desempeñar un papel muy importante en el mismo lugar de la lesión, donde su presencia es manifiesta, pudiendo liberarse "in situ" y producir los componentes proliferativos fibrosos de que se acompañan estas lesiones, ROSS (190).

En los últimos años, aparte de los factores mitogénicos han tenido gran importancia dos sustancias con un potente efecto vasodilatador cuyo origen se localiza en la célula endotelial, la prostaciclina y el factor relajante derivado del endotelio. Sus mecanismos de acción comprenden la regulación del tono vascular entre otros efectos importantes.

La prostaciclina como sustancia reguladora del mecanismo plaqueta - pared vascular y aterosclerosis

En los últimos 15 años se viene estudiando con gran interés en las arterias y en las venas de los mamíferos, incluyendo el hombre, y dentro del sistema de las prostaglandinas (PG), una sustancia inestable denominada prostaciclina (PGI₂) con una potente acción antiagregante plaquetar y vasodilatadora, MONCADA et al. (155). Esta sustancia tiene su origen principalmente en la capa endotelial y su síntesis desciende progresivamente de la capa íntima a la adventicia, MONCADA et al. (156). Tras la estimulación de la célula endotelial se produce la liberación intracelular del ácido araquidónico (AA) y en ella intervienen dos enzimas: la primera de ellas es la fosfolipasa C que de forma específica escinde el monofosfatidil-inositol liberando 1,2 diglicérido e inositol-1-fosfato; la segunda es una diglicérido-lipasa que libera el AA. El AA por medio de una enzima ciclooxigenasa forma el endoperóxido PGG₂ que tras una nueva acción enzimática peroxidasa se transforma en PGH₂. A partir de esta etapa la transformación de las prostaglandinas difiere según el tejido que se trate. Así a nivel de las células endoteliales o fibras musculares lisas el endoperóxido PGH₂, por la acción de una prostaciclina sintetasa, se transforma en prostaciclina la cual se libera a la sangre con producción de una gran actividad antiagregante y vasodilatadora en el lugar de la liberación y siendo estas acciones biológicas muy efímeras, alrededor de dos minutos CHIST-HAZELHOF y NUGTEREN (37). En la sangre, tras una hidrólisis la PGI₂ se transforma en un metabolito estable, 6-oxo-PGF_{1a}, sin gran efecto antiagregante y vasodilatador que puede ser detectado por técnicas de RIA facilitando de esta manera el estudio de la liberación de la PGI₂.

A nivel plaquetar, la actividad de la fosfolipasa C requiere la presencia de los iones calcio y su acción se inhibe cuando los niveles de c-AMP están elevados. En este elemento celular, partiendo del endoperóxido PGH₂ y por la acción de una enzima tromboxán-sintetasa se origina el Tromboxano A₂, sustancia con gran acción proagregante y vasoconstrictora que también es muy inestable y se transforma en Tromboxano B₂, de escasa actividad biológica que puede ser detectado por RIA, VERSTRAETE y VERMYLEN (238).

Algunos investigadores han querido relacionar la iniciación y subsiguiente evolución de la aterosclerosis con un defecto de síntesis de PGI₂, no obstante esta relación hasta el momento actual no está totalmente aclarada.

MONCADA et al. (153) han demostrado que el tejido vascular aterosclerótico genera menos cantidad de prostaciclina que el tejido vascular normal. D'ANGELO et al. (56) confirmaron esta observación en el tejido humano aterosclerótico. SINZINGER et al. (206) pudieron comprobar que la generación de prostaciclina era significativamente más baja en las diferentes lesiones ateroscleróticas (estrías grasas, engrosamientos fibrosos de la íntima, placas fibrosas y lesiones complicadas) que en el tejido arterial normal. También observaron la ausencia de diferencias significativas en la liberación de prostaciclina de los diferentes tipos de lesiones, así como en relación a la edad y sexo. El hecho de que en las lesiones primarias la formación de PGI₂ se encuentre significativamente disminuida al igual que en las lesiones ateroscleróticas avanzadas, sugiere que las lesiones estrías grasas, morfológicamente ateroscleróticas, podrían ser desde el punto de vista metabólico un estado crítico en el proceso aterosclerótico. La disminución de la síntesis de PGI₂ en las lesiones ateroscleróticas supondría un defecto en los mecanismos de defensa contra el depósito plaquetar que favorece la progresión de la aterosclerosis.

En el campo experimental existe abundante información que de alguna manera corrobora los hallazgos clínicos anteriormente señalados. En un estudio realizado en diferentes

especies animales se pudo comprobar que había una producción reducida de prostaciclina en aquellas especies de mayor susceptibilidad a padecer aterosclerosis, SINZINGER et al. (209). En los pulmones y riñones de conejos sometidos a una dieta aterogénica a base de colesterol y aceite de oliva durante cinco meses, se produce un 50 por cien menos de prostaciclina que en los conejos controles normales, DEMBINSKA-KIEC et al. (61). En la misma línea, la generación de prostaciclina en conejos sometidos a dieta aterogénica durante 1-3 meses está francamente reducida en aorta y arteria mesentérica, pudiendo comprobarse que a los cinco meses tras dieta normal tiende a normalizarse, GRYGLEWSKI et al. (102).

En contraposición con estas últimas afirmaciones se encuentran algunos resultados obtenidos del estudio de la aterogénesis experimental inducida con dieta rica en colesterol. DONATI et al. (66) observan aumentos de prostaciclina en las lesiones primarias ateroscleróticas en ratas. LASIERRA et al. (131) hallan una producción normal de prostaciclina en anillos aórticos con lesiones ateromatosas importantes de conejos sometidos a dieta aterogénica. BEETENS et al. (15) y SINZINGER et al. (207) observan incrementos temporales de prostaciclina que se interpretan como una reacción compensatoria al daño de la pared vascular retardando de esta manera la lesión ateromatosa y originándose por proliferación de la células musculares lisas que inducen o aumentan su síntesis. Es posible que más que una inducción de la síntesis de prostaciclina por parte de las células musculares lisas, lo que se produzca sea un aporte por las mismas ya que estas células sintetizan prostaciclina, hecho observado tanto en estudios de cultivos de células musculares lisas, LARRUE et al. (130), como en estudios de tejido arterial humano con la capa endotelial denudada, SILBERBAUER et al. (199). No obstante, en las últimas investigaciones se ha podido evidenciar que las células musculares lisas obtenidas de lesiones ateroscleróticas y cultivadas "in vitro", producen constantemente menor cantidad de prostaciclina que las células musculares lisas normales y estos resultados se han interpretado como el reflejo de un incremento en los vasos ateroscleróticos de la síntesis de productos de las lipoxigenasas, los cuales son inhibidores selectivos de la formación de prostaciclina, MONCADA et al. (154). Finalmente también se han podido detectar incrementos de prostaciclina en pacientes afectados de grave y generalizada aterosclerosis, TREMOLI et al. (234).

Como hemos expuesto anteriormente, la aterosclerosis no se asocia siempre con una disminución de la síntesis de prostaciclina sino que más bien se acompaña de un incremento. Este incremento puede ser el resultado de la liberación por parte de las plaquetas de sustancias que tienen la propiedad de activar su síntesis en la pared de los vasos, tales como la serotonina y el factor activante plaquetar, MONCADA et al. (157). La existencia de incrementos en la producción de prostaciclina en las lesiones aterosclerosas puede influir en la disminución del metabolismo del colesterol en la propia arteria, pues es conocido que en cultivo de células de aorta torácica de conejo la prostaciclina, a bajas concentraciones, incrementa la enzima que metaboliza los ésteres de colesterol en las células musculares lisas, mientras que la PGE2 inhibe la síntesis de los ésteres de colesterol, HAJJAR y WEKSLER (105).

La prostaciclina también puede inhibir el lugar de unión del fibrinógeno de las plaquetas limitando la interacción de las mismas con la pared vascular, MONCADA y HIGGS (152).

Uno de los papeles estelares de la prostaciclina es su actividad antiagregante plaquetar. La prostaciclina inhibe la agregación plaquetar estimulando la enzima adenil-ciclasa e incrementando de esta manera los niveles de c-AMP en las plaquetas. Este mecanismo de acción de la prostaciclina es más potente que el de otras prostaglandinas tales como la PGE1 y PGD2, que también tienen la propiedad de aumentar los niveles de c-AMP. La

prostaciclina también es un estimulador de la adenil-ciclasa en la membrana celular aislada. La PGI₂, PGE₁ y PGD₂ aumentan la actividad de la adenil-ciclasa actuando sobre dos receptores distintos en la membrana plaquetar: la PGI₂ y la PGE₁ actúan sobre el mismo y la PGD₂ sobre otro diferente, MONCADA y HIGGS (152).

La actividad antiagregante de la pared vascular está principalmente relacionada con la liberación de la prostaciclina pues los inhibidores de la formación de prostaciclina, ácido 15-hidroxi-peroxi-araquidónico (15-HPAA) y ácido 13-hidroxi-peroxi-linoléico (13-HPAA), permiten la agregación plaquetar en las células endoteliales, BUNTING et al. (25). No obstante no está totalmente aclarado que la producción de prostaciclina sea la responsable de la tromborresistencia del endotelio vascular, pues DEJANA et al. (60), estudiando el efecto inhibitorio de la síntesis de prostaciclina por la acción de la aspirina, concluyen que tanto in vitro como in vivo la disminución de la producción de PGI₂ no afecta al número de plaquetas que se adhieren al endotelio o al subendotelio en estas condiciones experimentales. El hecho de que la prostaciclina inhiba la agregación plaquetaria a concentraciones más bajas que las necesarias para inhibir la adhesión plaquetar, sugiere que la prostaciclina permite la adhesión al subendotelio pero impide las siguientes etapas de formación del trombo y liberación de sustancias tras la agregación.

En los últimos años se le ha concedido un papel especial al factor relajante derivado del endotelio (EDRF), puesto de manifiesto en el trabajo realizado por FURCHGOTT y ZAWADZKI (84) en el que demostraban la necesidad del endotelio intacto para que la acetilcolina desarrollara la acción hipotensora. El papel que desempeña este factor relajante, indistinguible del producido por el óxido nítrico, MONCADA et al. (157), es el de mediar la acción inducida por diversas sustancias entre las que se encuentran acetilcolina, trombina, vasopresina, ácidos grasos saturados e insaturados etc, MONCADA et al. (157). Además de su acción relajante de las grandes arterias como la aorta y coronarias del conejo, se ha demostrado que posee una acción antiagregante plaquetar, AZUMA et al. (9), perfectamente diferenciable de la acción antiagregante de la prostaciclina, LUGNIER et al. (143). Al igual que esta última, es posible que el factor relajante desempeñe un papel importante en las enfermedades vasculares y más concretamente en la aterosclerosis; sin embargo este aspecto no está aclarado en la actualidad.

Fibrinólisis en la génesis ateromatosa

La moderna historia de la fibrinólisis comienza hace 56 años cuando TILLET y GARNER (230) demuestran que ciertas cepas de estreptococos liberan una sustancia capaz de disolver coágulos. Estos hallazgos despiertan un gran interés y estimulan intensamente la investigación del mecanismo de la fibrinólisis. Unos años más tarde se halla que el factor del estreptococo denominado estreptoquinasa activa un proenzima, plasminógeno, convirtiéndolo en una enzima proteolítica, plasmina, CHRISTENSEN y MACLEOD (38). Para explicar la transformación del plasminógeno en plasmina, algunos estudiosos sugirieron en las primeras décadas de este siglo que la actividad fibrinolítica generada se producía por medio de una sustancia o activador que se liberaba de las células, DEMUTH y Von RIESSEN (62), FISCHER (78). Partiendo de estos conocimientos ASTRUP y PERMIN (6) y ASTRUP et al. (7) demuestran claramente con la técnica de la placa de fibrina, que el componente liberado por las células produce la fibrinólisis a través de la activación de un proenzima y no porque tuviera actividad proteolítica. Esta sustancia es conocida comúnmente como activador tisular del plasminógeno.

Con la incorporación de la técnica histoquímica de TODD (231) se demuestra que la localización del activador tisular del plasminógeno se halla en la pared vascular y más

concretamente en las células endoteliales, TODD (232), TODD (233), WARREN (243), de venas y capilares, aparentemente en mayor cantidad que en las arterias, ONOYAMA y TANAKA (174). La presumible menor actividad fibrinolítica de las arterias es explicada por NOORDHOECK (169), utilizando un procedimiento de determinación de inhibidores de la fibrinólisis, por la presencia de un inhibidor en las células musculares lisas de las capas íntima y media de estos vasos. Su localización en la pared vascular pone de manifiesto la importancia de ésta en el equilibrio hemostático, LASIERRA et al. (133).

Los estudios de LOSKUTOFF y EDGINTONG (141) en células endoteliales de aorta de conejo y los de LEVIN y LOSKUTOFF (135) en células endoteliales bovinas y humanas, muestran que la actividad fibrinolítica es una característica constante de estas células en cultivo. En el mismo sentido LOSKUTOFF (140) indica que las células endoteliales cultivadas tienen un sistema fibrinolítico complejo que responde a una gran variedad de agentes añadidos al medio de cultivo, incluyendo urea, guanidina, tiocianato potásico y otros. En resumen, la actividad fibrinolítica de estas células es el resultado de la interacción de un activador tisular y de un antiactivador capaz de inhibir su actividad, siendo este inhibidor desde el punto de vista inmunológico y bioquímico igual al detectado en las plaquetas, ERICKSON et al. (72) y en el plasma, WIMAN et al. (248), CHMIELEWSKA et al. (36).

Es bien conocido que la fibrinólisis se encuentra en equilibrio dinámico con el sistema de la coagulación plasmática con el fin de mantener intacto el lecho vascular, NOLF (167), ASTRUP (5). La interrelación entre fibrinólisis y aterosclerosis puede existir a dos niveles: 1) una deficiente fibrinólisis puede predisponer al depósito de fibrina, contribuyendo de esta manera a la patogenia de la aterosclerosis y 2) una deficiente fibrinólisis puede contribuir a la formación de un trombo oclusivo en una placa ateromatosa complicada, provocando el síndrome aterotrombótico y la clínica correspondiente, COLLEN y JUHAN-VAGUE (47).

Desde el siglo pasado y debido a la teoría trombogénica de ROKITANSKY (187), corroborada por DUGUID (68) y defendida por ASTRUP (5), se ha hecho hincapié en la importancia de la continua formación y disolución de pequeñas cantidades de fibrina a nivel de la pared arterial porque según esta teoría, un descenso de la actividad fibrinolítica llevaría consigo un incremento del depósito de fibrina y la subsiguiente alteración celular de su entorno, facilitando de esta manera el mecanismo patogénico de la aterosclerosis y la alteración vascular, hecho íntimamente relacionado con la hipótesis de la injuria vascular de ROSS (189). No obstante COPLEY (52) propone una nueva teoría para explicar la aterogénesis según la cual, tanto el revestimiento arterial de fibrina como el fibrinógeno desarrollan un papel muy importante y rechaza la injuria vascular como mecanismo necesario, dando mayor importancia a la existencia de un aumento en la permeabilidad de la pared vascular que facilita el transporte de grasas a través de: fibrinógeno alterado, fibrinopéptidos, plasminógeno y plasminopéptidos, COPLEY (50), COPLEY (51), COPLEY y TSULUCA (53), COPLEY et al. (54), SUMIYOSHI (226).

En la actualidad hay evidencia de que la fibrina acumulada y depositada en la pared arterial puede iniciar y contribuir al desarrollo de la placa ateromatosa, SMITH (210). En la experimentación animal los trombos murales se convierten en lesiones con la característica de placa fibrosa, WEIGENBERG et al. (244). No obstante, los resultados de los estudios dirigidos a valorar la relación entre la severidad de una placa y su contenido en fibrina o fibrinógeno, YORK y BENJAMIN (255), WOLF y CRAWFORD (254) indican que no hay correlación directa entre el grado de evolución de las placas ateromatosas y el contenido en fibrinógeno pero sí con la fibrina ya que en las lesiones de grado 1, estrías grasas, su concentración es menor que en las lesiones más evolucionadas. Este descenso de

fibrina en las lesiones de grado 1 puede ser explicado sobre la base de un descenso en la penetración y una disminución en la afinidad por el efecto hidrofóbico de las lesiones estrías grasas. Puesto que el contenido en fibrinógeno de estas lesiones no es significativamente diferente del de las lesiones más severas, el descenso en fibrina puede ser indirectamente atribuido a una disminución de la reactividad o penetración de la trombina al interior de la placa. Sea cual fuere la causa, estos hallazgos son importantes en relación a la etiología de la placa. Si uno acepta el concepto de que las estrías grasas son precursoras de las placas fibrosas en el humano, SMITH et al. (211), STRONG y MCGILL (225), la teoría trombogénica de la formación de la placa pierde interés a causa del relativo descenso de fibrina en las estrías grasas. La importancia de la fibrina en esta teoría se debió al fracaso en la detección de antígenos plaquetares en las placas primarias o no complicadas, CARSTAIRS (28). Estos hallazgos anteriores no son consistentes con la teoría trombogénica de la formación de las placas ateromatosas, YORK y BENJAMIN (255).

El estudio de la influencia de los inhibidores de la fibrinólisis también ha sido motivo de experimentación, aunque los resultados tampoco han llegado a aclarar su importancia. A este respecto KATO (123) observa tras la administración del inhibidor ácido-épsilon-amino-caproico (EACA) por vía oral a conejos sometidos a una alimentación rica en colesterol, un aumento del acúmulo de células espumosas en la arteria pulmonar sin cambios patológicos en la aorta. KATO et al. (124) detectan tras la administración de otro inhibidor, el ácido tranexámico (AMCHA), un incremento del edema subendotelial de la aorta y del edema de la capa elástica interna de las arterias pulmonares, en conejos sometidos a dieta con y sin colesterol. Por el contrario, otros autores en la misma línea de investigación no hallaron modificaciones en la pared arterial tras la administración del inhibidor EACA a animales con dieta rica en colesterol, FRITSTH et al. (82).

Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación entre niveles altos de fibrinógeno y una acelerada aterosclerosis, WEIGENSBERG et al. (244). Del mismo modo MEADE et al. (151) hallan en un estudio prospectivo un incremento de la concentración plasmática del fibrinógeno en hombres que mueren por procesos cardiovasculares respecto a los que sobreviven con las mismas afectaciones, e incluso observan una menor actividad fibrinolítica sin relevancia significativa en el grupo de pacientes que murieron. En otros estudios prospectivos de pacientes con enfermedad cardiovascular también se han encontrado concentraciones altas de fibrinógeno en plasma, GOTEBORG STUDY (247), LEIGH STUDY (224), FRAMINGHAM STUDY (120). Con anterioridad a estos interesantes estudios, ya se había aludido al incremento de la concentración del fibrinógeno en la enfermedad arterial, CHAKRABARTI et al. (30), PEABODY et al. (179). El aumento de los niveles de fibrinógeno en plasma podría explicar su incremento en la capa íntima y media por un aumento de la presión hidrodinámica y por una mayor difusión, factores determinantes de la entrada de proteínas del plasma en el interior de la íntima. El fibrinógeno plasmático aumenta progresivamente con la edad siendo significativamente elevado en pacientes con aterosclerosis, POLA y SAVI (180).

Se ha valorado por diferentes estudiosos la actividad fibrinolítica en la aterosclerosis, midiéndose en plasma y en la pared vascular. Algunos investigadores han hallado una disminución de la actividad fibrinolítica en la aterosclerosis, CHAKRABARTI et al. (31), ROSING et al. (188), SARKAR (194), BROWSE et al. (22). No se detecta actividad fibrinolítica en las placas ateromatosas complicadas de especímenes de arteria carótida tras la endoarterotomía, D'ANGELO et al. (56).

En contraposición de estos resultados, SMOKOVITIS (214) y SOMOKOVITIS et al. (215) observan marcadas diferencias al estudiar la actividad del activador del plasminógeno, del inhibidor de la plasmina y del inhibidor del activador del plasminógeno en especímenes

de aorta humana con lesiones de estrías grasas y placas fibrosas. Tanto la actividad del activador del plasminógeno como la del inhibidor de la plasmina se incrementan gradualmente de la íntima normal a la placa fibrosa y de manera opuesta se comporta el inhibidor del activador del plasminógeno. Este mismo autor, SMOKIVITIS y BINDER (213), también ha observado un aumento de la actividad fibrinolítica en el inicio de la lesión aterosclerótica. En el campo experimental, PADRO et al. (175) estudiando en la rata la influencia de la hiperlipemia en la actividad fibrinolítica, observan una correlación entre la actividad del activador del plasminógeno y el nivel de hiperlipemia sin que la hubiera entre la actividad fibrinolítica de la aorta y los niveles de colesterol y triglicéridos de la pared vascular. Como podemos entender ante estas publicaciones, el papel de la actividad fibrinolítica en la aterogénesis no está totalmente alcarado, por lo que sigue siendo objeto de estudio.

EL CONEJO COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA GÉNESIS ATEROSCLERÓTICA

Aunque la aterosclerosis no reviste en los animales la importancia que posee en el hombre, la extrapolación de su estudio experimental permite conocer algunos aspectos de esta entidad, máxime desde que se ha demostrado mediante experimentación animal la existencia de una conexión entre la aterosclerosis y el incremento del colesterol en plasma.

IGNATOWSKI (114) estudia en conejos el posible efecto de la dieta y observa que una alimentación a base de leche, mantequilla y huevos les produce unas lesiones semejantes a las de la aterosclerosis en el humano. Unos años más tarde ANITCHKOW y CHALATOW (3) y ANITCHKOW (2) publican los primeros resultados obtenidos del estudio de la aterosclerosis en modelos con dieta grasa y determinan que el componente dietético responsable de las lesiones es el colesterol. A lo largo de más de 70 años se ha tenido conocimiento de la diferente susceptibilidad de las distintas especies animales al efecto aterogénico de las dietas ricas en colesterol. Así animales como cobaya BAILEY(11), cerdo BRAGDON et al. (20), pollo DAUBER y KATZ (57) y varias especies de primates no humanos CLARKSON et al. (41) CLARKSON et al. (42) SRINIVASAN et al. (219), son menos sensibles que el conejo para reproducir las lesiones ateroscleróticas. Los perros y las ratas son extremadamente resistentes a una dieta exclusivamente a base de colesterol siendo necesarias manipulaciones hormonales o vitamínicas para inducir una hiperlipemia y el desarrollo subsiguiente de las lesiones, STEINER y KENDALL (223), WISSLER et al. (250), CANOVAS (27). La información obtenida a través de multitud de estudios avala la utilización del conejo como animal de experimentación para la investigación de la génesis aterosclerótica, por poseer elementos estructurales semejantes a los humanos en sus vasos arteriales, RODMAN et al. (186).

La aterosclerosis experimental ha sido inducida en el conejo en reiteradas experiencias por diferentes investigadores, FRIEDMAN y BYERS (80), GENDRE (91), ADAMS y BAYLISS (1), BORDIA et al. (17), JAIN y KONAR (116), RODMAN et al. (186), KROON et al. (128), mediante la administración de una dieta grasa en la que una cantidad de colesterol entre 0,5 y dos gramos por día complementa la alimentación ordinaria diaria (150 g. de granulado comercial). En general con este suministro el animal adquiere una hipercolesterolemia que al cabo de un mes se manifiesta en una infiltración lipídica de la capa íntima de la arteria aorta, a los dos meses la infiltración es más abundante y aparecen las primeras alteraciones de las fibras elásticas y a los tres meses la pared de la aorta está muy alterada y con alto índice de lesiones ateromatosas siendo muy semejantes a las humanas, GENDRE. (91).

Además del estudio de las lesiones ateromatosas inducidas en el conejo con diferentes dietas ricas en colesterol, algunos investigadores han dedicado especial atención a las lesiones ateromatosas espontáneas de la aorta de estos animales. RENAIIS et al. (184) observan que su frecuencia no está relacionada con la línea a la que pertenece el animal de experimentación ni con sus atributos de raza y sexo, pero sí con el de la edad. SCEBAT et al. (195) hallan lesiones macroscópicas en un 23% de los animales entre 13 y 18 meses de edad y en un 23% de los animales entre 13 y 18 meses de edad y en un 83% de los mayores de 24 meses. GAMAN et al. (87) opinan que la severidad de las lesiones arteriales espontáneas del conejo no aumenta necesariamente con la edad.

El estudio microscópico revela una mayor incidencia y extensión de las lesiones arteriales espontáneas que las detectadas macroscópicamente. Dichas lesiones ateromatosas se encuentran habitualmente limitadas al cayado aórtico, observándose en escasas ocasiones en aorta torácica y excepcionalmente en aorta abdominal, SCEBAT et al. (195), y se caracterizan por un engrosamiento de la capa íntima fibromuscular con denudación endotelial generalizada o en ocasiones de forma segmentaria, alteraciones de las fibras elásticas (desordenadas o incluso fragmentadas), disposición radial de las células musculares lisas y aparecen focos de necrosis, SCEBAT et al. (195), SHARK et al. (197).

El estudio con microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.) de las lesiones arterioscleróticas inducidas experimentalmente con dieta rica en colesterol, muestra que la localización aórtica de las lesiones ateromatosas más severas se produce a nivel de cayado aórtico con disminución progresiva de la severidad hacia la aorta distal, RODMAN et al. (186). Desde el punto de vista ultraestructural las lesiones arterioscleróticas de la aorta de conejo presentan semejanza con las humanas, ya que las células musculares lisas se hallan incrementadas en la capa íntima, los lípidos se observan tanto intracelularmente como en los espacios extracelulares, la lámina elástica interna se halla desorganizada y las células musculares lisas de la capa media se encuentran vacuolizadas. Algunas lesiones están ulceradas y en algunas úlceras se observan células sanguíneas de varios tipos (eritrocitos, leucocitos y agregados plaquetares). Esta semejanza entre las lesiones hace que el conejo constituya un buen modelo experimental para el estudio de la aterosclerosis en el hombre, RODMAN et al. (186).

MATERIAL Y MÉTODOS

Como animal de experimentación se ha elegido al conejo macho neozelandés distribuyéndolo en diferentes grupos y dentro de cada uno en lotes específicos para cada experiencia.

Grupo de estudio de la influencia de una dieta rica en colesterol en la génesis ateromatosa en animales de cinco meses

Para este estudio se emplean conejos de dos meses de edad con un peso de 2.3 ± 0.300 kg. al inicio de las pruebas experimentales y se distribuyen en dos lotes, uno de 30 conejos constituye el lote control y otro también de 30 conejos sometidos a dieta rica en colesterol el lote de ensayo. La dieta rica en colesterol consiste en una dieta normal (160 g/día de pienso compuesto de granulado comercial) junto con 1.2 g/día de colesterol (MERCK) y 0.37% de ácido cólico (MERCK) para aumentar la absorción del colesterol. El tiempo total de experimentación es de tres meses para ambos lotes. Los conejos se sacrifican siguiendo normas deontológicas y previa anestesia con pentobarbital sódico a la dosis de 30 mg/kg. de peso, e infusión de heparina sódica a la dosis de 1 mg/kg. de peso con el fin de inhibir la posible formación de trombina que pudiera alterar la pared vascular y provocar subsiguientes alteraciones plaquetares, BUCHANAN et al. (23), ESSIEN et al. (74).

Grupo de estudio de la evolución espontánea de lesiones ateroscleróticas a los 18 meses

Se parte de 30 conejos de dos meses de edad y un peso de 2.3 ± 0.300 kg. y se les mantiene con una dieta normal (160 g. de pienso compuesto granulado comercial) durante 16 meses. Los conejos se sacrifican a los 18 meses de edad con la misma metodología que anteriormente se ha descrito.

Extracción de la arteria aorta

Se lleva a cabo como a continuación se detalla, empleando idéntico procedimiento quirúrgico en todos los grupos de ensayo. Bajo efecto anestésico se procede por disección a la apertura del tórax y abdomen del animal con liberación de cayado aórtico, porción torácica y porción abdominal (fig.1). Extraída la aorta, cada uno de los segmentos se divide en tres porciones: tercio proximal (TP), tercio medio (TM) y tercio distal (TD).

Procedencia de las muestras para los diferentes estudios

Para el estudio con microscopía óptica se utilizan muestras de las tres porciones en que se divide cada uno de los segmentos; para el estudio con microscopía electrónica de transmisión las muestras proceden del tercio medio del cayado aórtico; para la valoración del metabolito de la prostaciclina 6-oxo-PGF1a del tercio proximal del cayado aórtico y para el estudio de la actividad fibrinolítica del tercio distal del cayado aórtico.

Estudio con microspía ordinaria (M.O.)

Preparación de las muestras

Las muestras obtenidas de los fragmentos proximal, medio y distal de cayado aórtico, aorta torácica y abdominal, se fijan en formol tamponado Sörensen al 10% para su posterior inclusión en parafina o se procesan en congelación. Posteriormente se realizan cortes de 10 micras que se tiñen con hematoxilina de Harris para el estudio histológico, con Sudán III para el estudio de las grasas y con colorante específico para el estudio de las fibras elásticas, como se expone más adelante.

Composición topográfica para el estudio de lesiones y clasificación de las mismas

El estudio de la incidencia de lesiones ateroscleróticas se lleva a cabo haciendo una composición topográfica lo más aproximada posible de los tres segmentos en los que se ha dividido la arteria aorta, mediante cortes sucesivos y continuados de las porciones proximal, media y distal de cada uno de ellos. Se valoran las lesiones aterosclerosas más o menos evolucionadas en las que participa la capa íntima, sin incluir las lesiones fibrosas aisladas que aparecen en la capa media.

Las lesiones anatomopatológicas se clasifican en grados:

- Grado 0 (0).- No se observan alteraciones en la capa íntima, conservando íntegras sus estructuras.
- Grado I (+).- Lesiones iniciales. Se observa un ensanchamiento de la capa íntima con despegamiento, presumiblemente producido por edema intersticial.
- Grado II (++).- Lesiones avanzadas. Además del ensanchamiento de la capa íntima, se aprecia rotura de las fibras elásticas.
- Grado III (+++).- Lesiones muy evolucionadas. Incluye desde lesiones ateromatosas o ateroscleróticas con desorientación celular hasta la formación de placas.

Técnicas de tinción

- 1- Fijador formol tamponado de SORENSEN
 - a) Fosfato monopotásico 9.08 g/l.
 - b) Fosfato disódico 11.88 g/l.Solución tampón: X ml de a + (100-X) ml de b.
Solución final fijadora: Formol comercial al 10% en solución tampón.
- 2- Técnica de tinción con Hematoxilina-eosina.
Se utilizan cortes de 10 micras en parafina y se procede según la técnica automatizada AMES HISTOTEK.
- 3- Técnica de tinción con Sudán III (150) para grasas.
Se emplean cortes de 10 micras en congelación a los que se aplica la siguiente metodología:
 - a) Sumergir los cortes en agua destilada.

- b) Introducirlos en pocillos con Sudán III y en estufa a 37° C durante 15 minutos.
 - c) Lavar con agua destilada durante 3-4 minutos.
 - d) Añadir Hematoxilina de Harris a los pocillos durante 3-5 minutos.
 - e) Lavar con agua corriente.
 - f) Cubrir con medio de Farrant.
- 4- Técnica para la tinción de fibras elásticas(150).
- Se parte de cortes de 10 micras en parafina y se procede como sigue:
- a) Deshidratar con alcohol.
 - b) Añadir Hematoxilina alcohólica de 20 a 30 minutos.
 - hematoxilina: 1 g.
 - alcohol absoluto caliente: 20 ml.
 - c) Lavar con agua corriente.
 - d) Cubrir con medio de Farrant.

Estudio de microscopía electrónica

Preparación de las muestras

Del tercio medio del cayado aórtico se obtiene un anillo de 0.5 a 1 mm. procediendo inmediatamente a su fijación con glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.1 molar pH 7.2-7.4 durante 1-2 horas a 4° C. Tras la fijación se realizan tres lavados con tampón fosfato y cada muestra se fracciona endos por corte transversal. Posteriormente se practica una segunda fijación con tetraóxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0.2 molar pH 7.2-7.4 durante 30 minutos a 4° C. Se realiza un nuevo lavado con tampón fosfato 0.1 molar. Se deshidrata con concentraciones de alcohol crecientes y óxido de propileno. Posteriormente se preincuba la muestra con una mezcla a volúmenes iguales de óxido de propileno y epon en cápsula de Been y se incuba durante 30 minutos a la temperatura del laboratorio. Para la incubación se utiliza epon y en lugar de cápsulas de Been un soporte especial de forma rectangular para hacer posible la colocación exacta de la muestra arterial de tal forma que en el corte puedan visualizarse simultáneamente las capas íntima, elástica, media y adventicia a partir de la luz arterial. La capa íntima está siempre en el centro de la muestra. La polimerización del epon se realiza en estufa a 60° C durante 24 horas. Los cortes semifinos se practican con cuchilla de vidrio en un Reichert OM V3 y se tiñen utilizando ácido peryódico, azur II, tetraborato de sodio y azul de metileno. Se comprueban los cortes semifinos al microscopio óptico localizando la capa íntima y seleccionando la zona más adecuada para los cortes ultrafinos. Dichos cortes deben realizarse con cuchilla de diamante y contrastarse con acetato de uranio saturado y plomo, Reynolds modificado (185). Para su visualización se utiliza un Zeiss E.M. 109.

Reactivos

- 1- Fijador glutaraldehído tamponado:
 - Glutaraldehído solución comercial 25% ... 10 ml.
 - Solución tampón fosfato de Milloning ... 90 ml.
 - Tiempo de fijación mínimo 5 horas.
- 2- Tampón fosfato de Milloning:
 - Solución A.- Fosfato monosódico (Pm=137.99) al 2.26%
 - Solución B.- Hidróxido sódico al 2.52%
 - Glucosa al 5.4%
 - Cloruro cálcico al 1%.

Se prepara el tampón mezclando las soluciones A y B en proporción de 83 ml. y 17 ml. respectivamente. A 90 ml. de esta mezcla se le añaden 10 ml. de la solución de glucosa al 5.4% y 0.5 ml. de cloruro cálcico. Se ajusta el Ph entre 7.2 - 7.4.

3- Tampón fosfato 0.2 molar pH 7.2-7.4:

Solución A.- Fosfato monosódico 0.2 molar

Solución B.- Fosfato bisódico 0.2 molar

Mezclar 44 ml. de solución A con 156 ml. de solución B.

4- Tampón fosfato 0.1 molar pH 7.2-7.4:

Solución formada por volúmenes iguales de agua destilada y tampón fosfato 0.2 molar pH 7.2-7.4.

5- Tetraóxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0.2 molar pH 7.2-7.4.

6- Óxido de propileno.

7- Epon.

8- Ácido peryódico

9- Azur II

10- Tetraborato de sodio

11- Azul de metileno

12- Acetato de uranilo saturado

13- Plomo.

Estudio de la fibrinólisis en la pared arterial (168)

Preparación de las muestras

Del tercio distal del cayado aórtico se obtienen dos anillos de aproximadamente 0.5 mm. y se introducen en un tubo de ensayo de plástico conteniendo tampón Tris de tal forma que los cubra totalmente, procediendo seguidamente a su congelación a -70° C. En cada uno de los anillos se practican cortes de 30 micras de grosor con un microtomo criostático colocándolos posteriormente en número de dos sobre un portaobjetos. A cada porta se le adicionan 0.6 ml. de fibrinógeno bovino al 1% en tampón fosfato Sörensen pH 7.8 enriquecido con plasminógeno 0.1 unidades caseolíticas (U.C) por ml. Posteriormente se le añaden 20 microlitros de una solución de trombina humana que contiene 20 unidades internacionales (U.I.) por ml. Las soluciones, rápidamente mezcladas en un área de 2.5 x 4 cm., forman una película de fibrina que cubre los cortes de tejido. Los portas se dejan en cámara húmeda durante una hora tras la cual se eleva la temperatura de la cámara a 37° C donde permanecen 120 minutos. Pasado este tiempo, todas las preparaciones son fijadas en solución de formol al 10% y una vez lavadas con cuidado con agua se tiñen con hematoxilina de Harris. La preparación seca se visualiza con el microscopio óptico para observar las posibles zonas de lisis. La actividad fibrinolítica correspondiente a la capa íntima y desarrollada por los cortes de tejido, se valora de forma arbitraria con una, dos y tres cruces y a la ausencia de lisis de fibrina se le da el valor O.

Reactivos

1- Fibrinógeno bovino Kabi.

2- Tampón fosfato Sörensen pH 7.8 molar.

3- Trombina humana (Fibrindex Ortho).

Valoración de la prostaciclina (PGI₂) en su forma de metabolito 6-oxo-PGF₁α por radioinmunoensayo

Preparación de las muestras

Para valorar la liberación de PGI₂ de determina su metabolito 6-oxo-PGF₁α siguiendo la metódica de bioensayo de acuerdo con Moncada et al(155).

Del tercio proximal del cayado aórtico se extrae un anillo de 3 mm. que se introduce en tampón Tris 1 molar a 4° C y pH 7.5, procediendo a realizar la técnica antes de los 5 minutos tras su extracción. Se ajusta el anillo, previa limpieza externa de todo resto visible que no sea aorta, exactamente a 1,5 mm. Se incuba en 0.4 ml. de tampón Tris durante 3 minutos a 22° C extrayéndose el anillo y congelando el líquido de incubación a -70° C. El anillo una vez pesado se fija en formol tamponado y se procesa para el estudio con microscopía óptica.

La determinación de 6-oxo-PGF₁α en el líquido de incubación se realiza según la técnica recomendada por New England Nuclear Thromboxane B₂-6-Keto-Prostaglandin F₁α (3H RIA KIT). Las muestras han sido procesadas en el laboratorio de isótopos del Servicio de Hematología del Hospital de San Pablo de Barcelona por el personal especializado en estas determinaciones. Los resultados se expresan en picogramos de metabolito producido / mililitro de líquido de incubación / miligramo de peso de anillo / 3 minutos de incubación.

Determinación de colesterol

La determinación de colesterol se lleva a cabo en suero siguiendo el método de Liebermann-Burchard directo, según metodología y KIT de Clínica Médica Aplicada S.A.

El fundamento consiste en que en presencia de anhídrido acético y ácido sulfúrico, el colesterol se transforma en 3,3 bis (3,5 colastedieno) monosulfónico, de color verde azulado, con una absorción máxima a 625 nm. El método cumple la ley de Beer.

La valoración del colesterol en suero se centra en el grupo de experimentación de cinco meses comparando los niveles hallados en el lote control con los del lote con dieta aterogénica con el fin de detectar en este último el efecto hipercolesterolemia de la administración de una dieta rica en colesterol. Esta técnica no se aplica al grupo de experimentación de 18 meses por no contener ningún lote de animales sometido a régimen graso que posibilite la comparación anterior.

Análisis estadístico

El estudio se realiza con un Ordenador PC utilizando un programa de estadística SIGMA PLUS. Se aplica la estadística básica a cada grupo estudiado, calculando su media, desviación típica, valores mínimo y máximo, tamaño de la muestra, rango, coeficiente de variación y error estandar de la media. Igualmente se estudia la comparación de medias entre los diferentes grupos calculando la diferencia de medias, t de Student y grados de libertad corregidos en el caso de comparación de muestras en función de si las varianzas son o no similares, el nivel de probabilidad que corresponde al valor de la t y finalmente la significación del contraste.

Se determina el colesterol en el grupo de cinco meses comparando los valores obtenidos en el lote control con los del lote sometido a dieta aterogénica.

La determinación del metabolito 6-oxo-PGF1a en cayado aórtico, se realiza tanto en el grupo de cinco meses de experimentación como en el de 18 meses. En el primer grupo se realizan tres comparaciones: los valores hallados en el lote control con los del lote con dieta aterogénica, los encontrados en el lote control con lesiones ateroscleróticas con respecto a los de los animales con lesiones y los valores del lote con dieta aterogénica con lesiones ateroscleróticas en relación a los de los animales sin lesiones. En el grupo de 18 meses se comparan los valores obtenidos en los animales con y sin lesiones. Finalmente se realiza la comparación de la producción del metabolito entre ambos grupos de experimentación.

CASUÍSTICA

Los animales de experimentación se distribuyeron en los grupos que a continuación se exponen:

1) Grupo de cinco meses:

- Lote control (L. Control): constituido por 30 conejos macho que al iniciar la experimentación tienen dos meses de vida y al finalizar el ensayo cinco meses.
- Lote con dieta aterogénica (L. Aterog.): compuesto por 30 conejos macho de dos meses de edad al comienzo de la experimentación y cinco meses al finalizar el ensayo.

2) Grupo de experimentación de 18 meses (G. 18 meses):

Formado por 30 conejos macho que al iniciar la experimentación tienen dos meses de edad y participan en el ensayo durante 16 meses.

Alimentación

L. Control: alimento granulado comercial a razón de 160 g/día y agua libremente.

L. Aterog.: alimento granulado comercial a razón de 160 g./día, 1.2 g./día de colesterol, 0.5 g./día de ácido cólico y agua libremente.

G. 18 meses: alimento granulado comercial a razón de 160 g./día y agua libremente.

Perfil de investigación

	L. Control	L. Aterog.	G. 18 meses
Microscopía óptica	+	+	+
M. electrónica	+	+	+
6-oxo-PGF1a	+	+	+
Act. Fibrinolítica	+	+	+

Microscopía óptica

	Cayado	Aorta Torácica	Abdominal
L. Control	+	+	+
L. Aterog.	+	+	+
G. 18 meses	+	+	+

Microscopía electrónica

Tercio medio de
cayado aórtico

L. Control	+
L. Aterog.	+
G. 18 meses	+

6-Oxo-PGF1a

Tercio proximal de
cayado aórtico

L. Control	+
L. Aterog.	+
G. 18 meses	+

Actividad fibrinolítica de la pared vascular

Tercio distal de
cayado aórtico

L. Control	+
L. Aterog.	+
G. 18 meses	+

El signo (+) corresponde a las pruebas que se han realizado en este estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Determinación de colesterol (mg/100 ml) en suero

Grupo de 5 meses. Lote Control y Lote con dieta aterogénica

	Media (\bar{x})	Desviación típica	Tamaño	Mínimo	Máximo
L. control	43.667	16.533	30	22	87
L. aterog.	275.367	146.077	30	105	570

	Rango	Coef. variación	Error Est. Media
L. control	65	37.861 %	3.018
L. aterog.	465	53.048 %	26.669

Comparación de las medias: Diferencia: 231.700
 Error estadístico: 26.840
 $t = 8.633$
 Significativo: $p < 0.001$

Determinación del metabolito 6-Oxo-PGF1a (pg/ml/mg/3min) en cayado aórtico

1. Grupo de 5 meses

1.1. Lote control y Lote con dieta aterogénica

	Media (\bar{x})	Desviación típica	Tamaño	Mínimo	Máximo
L. control	228.869	42.810	24	142.500	338.460
L. aterog.	126.586	34.509	24	63.150	211.260

	Rango	Coef. variación	Error Est. Media
L. control	195.960	18.705 %	8.739
L. aterog.	148.110	27.261 %	7.044

Comparación de las medias: Diferencia: 102.283
 Error estadístico: 11.224
 $t = 9.113$
 Significativo: $p < 0.001$

1.2. Lote control con y sin lesiones ateroscleróticas

	Media (\bar{x})	Desviación típica	Tamaño	Mínimo	Máximo
Con lesiones	204.066	25.661	5	182.350	246.930
Sin lesiones	236.178	44.148	19	142.500	338.460

	Rango	Coef. variación	Error Est. Media
Con lesiones	64.580	12.575 %	11.476
Sin lesiones	195.960	18.693 %	10.128

Comparación de las medias: Diferencia: 32.112
 Error estadístico: 20.812
 t = 1.543
 Significativo: p>0.05

1.3. Lote con dieta aterogénica con y sin lesiones ateroscleróticas

	Media (\bar{x})	Desviación típica	Tamaño	Mínimo	Máximo
Con lesiones	124.767	31.966	10	77.300	190.900
Sin lesiones	127.886	37.352	14	63.150	211.260

	Rango	Coef. variación	Error Est. Media
Con lesiones	113.600	25.621 %	10.109
Sin lesiones	148.110	29.207 %	9.983

Comparación de las medias: Diferencia: 3.119
 Error estadístico: 14.594
 t = 0.214
 Significativo: p>0.05

2. Grupo de experimentación de 18 meses. Animales con y sin lesiones

	Media (\bar{x})	Desviación típica	Tamaño	Mínimo	Máximo
Con lesiones	373.712	53.157	12	294.300	463.200
Sin lesiones	343.017	107.782	12	184.500	475.200

	Rango	Coef. variación	Error Est. Media
Con lesiones	168.900	14.224 %	15.345
Sin lesiones	290.700	31.422 %	31.114

Comparación de las medias: Diferencia: 30.695
 Error estadístico: 34.692
 t = 0.885
 Significativo: p>0.05

3. Comparación de la producción del metabolito entre el Lote Control del grupo de experimentación de 5 meses y el grupo de 18 meses

	Media (\bar{x})	Desviación típica	Tamaño	Mínimo	Máximo
L. control	228.869	42.810	24	142.500	338.460
G. 18 meses	358.394	84.583	24	184.500	475.200

	Rango	Coef. variación	Error Est. Media
L. control	195.960	18.705 %	8.739
L. 18 meses	290.700	23.601 %	17.265

Comparación de las medias: Diferencia: 128.525
 Error estadístico: 19.351
 t = 6.693
 Significativo: p<0.001

RESULTADOS

Valoración con microscopía óptica de la incidencia de lesiones ateroscleróticas en arteria aorta y de la estructura histológica aórtica y de las lesiones ateroscleróticas

1. Grupo de conejos de 5 meses

1.1. Incidencia de lesiones ateroscleróticas

Los conejos se sacrifican a los cinco meses de vida, valorando en ambos lotes (control y con dieta aterogénica) con microscopía óptica la incidencia de lesiones ateroscleróticas en la capa íntima de la arteria aorta (Fig. 1), para lo cual se hace una composición topográfica lo más exacta posible con cortes sucesivos y continuados de las porciones proximal, media y distal de cayado aórtico, aorta torácica y abdominal.

En el lote control la incidencia de estas lesiones es de un 16.6 por cien, concentradas en cayado aórtico y sin encontrarse en aorta torácica ni abdominal, siendo de grado medio (++) y muy evolucionadas (+++). Cuadro 1. Gráfica 1.

En el lote con dieta aterogénica la incidencia de lesiones es de un 50 por cien localizándose principalmente en cayado aórtico (80%), en menor cuantía en aorta torácica (20%) y ausentes en aorta abdominal, perteneciendo también a los grados medio (++) y muy evolucionado (+++). Cuadro 1. Gráfica 2.

Cuadro 1: Grado de las lesiones ateroscleróticas. Grupo de 5 meses

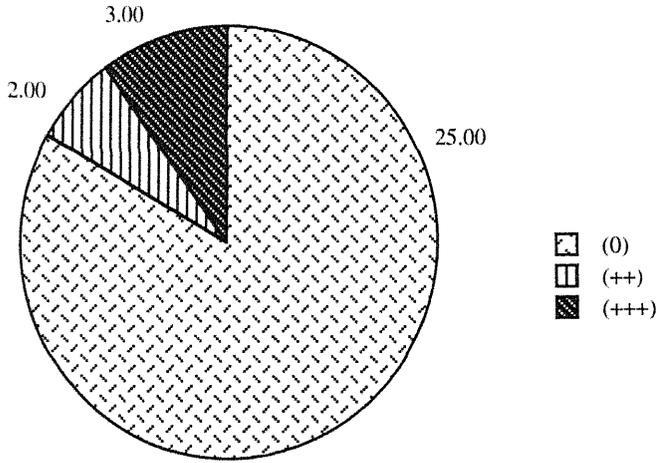
Casos	L. Control	Casos	L. Aterog.
1	++	1	+++
2	++	2	+++
3	+++	3	++
4	+++	4	++
5	+++	5	+++
6-30	0	6	++
		7	+++
		8	++
		9	++
		10	++
		11	++
		12	++
		13	+++
		14	++
		15	++
		16-30	0

(0) Grado 0. Ausencia de lesiones.

(++) Grado II. Lesiones de grado medio.

(+++) Grado III. Lesiones muy evolucionadas.

Gráfica 1: Grado de lesión aterosclerótica. Grupo 5 meses: Lote Control



Gráfica 2: Grado de lesión aterosclerótica. Grupo 5 meses: Lote Aterog.

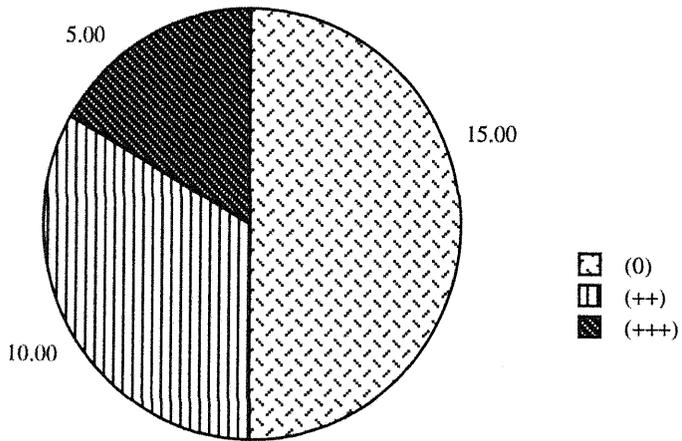
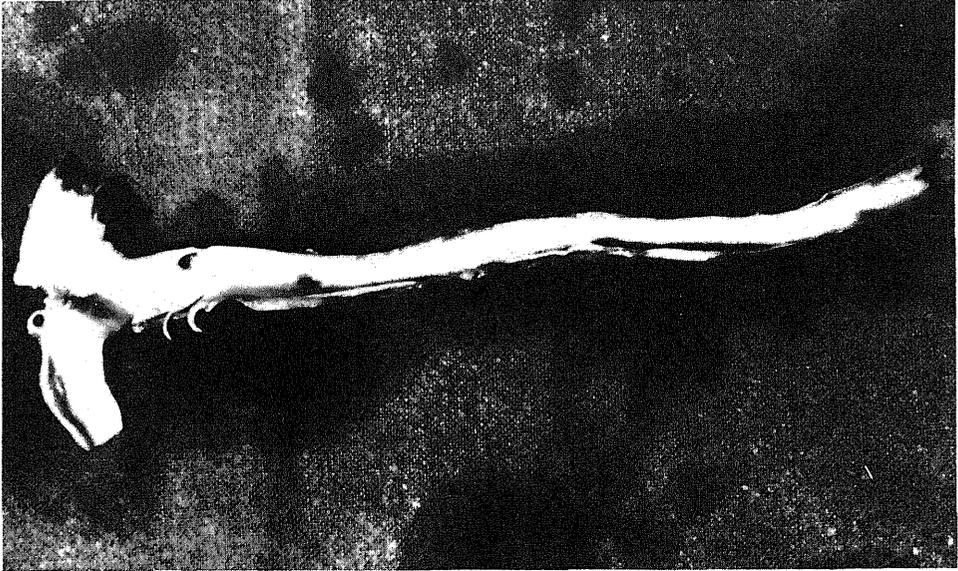


Fig. 1: Aorta de conejo abierta longitudinalmente en la que se pueden apreciar estrías grasas en cayado aórtico. Lote con dieta aterogénica. Grupo de 5 meses.



1.2. Estructura histológica aórtica y de las lesiones ateroscleróticas

El estudio histológico con microscopía óptica de las diferentes porciones aórticas de los animales del lote control sin lesiones aparentes, muestra mediante la tinción de hematoxilina-eosina un aspecto homogéneo sin desorden estructural (Fig. 2). Los casos con lesiones ateroscleróticas del mismo lote presentan un marcado engrosamiento de la capa íntima, segmentario o generalizado, apreciándose en algunas ocasiones desprendimiento de la línea endotelial edematizada (Fig. 3), acompañándose de alteraciones de las fibras elásticas, desordenadas e incluso fragmentadas (Fig. 4) y de infiltración de elementos musculares lisos y mononucleares (Fig. 5), llegando a formar placas que muestran en su centro un vacío que corresponde a la existencia de calcio. En las lesiones con pérdida endotelial se observan frecuentes formaciones trombóticas plaquetares que constituyen los trombos murales (Fig. 5).

En los animales del lote con dieta aterogénica se observa en todas las muestras una manifiesta infiltración grasa muy similar en disposición intra y extracelular (Fig. 6) y delimitada exclusivamente a la capa íntima, con presencia de células espumosas que le dan una imagen muy característica (Fig. 7), hecho que contrasta con el lote control donde la infiltración grasa es muy escasa y difuminada.

Fig. 2: Cuyado aórtico normal (TM). Corte transversal. Lote control. Grupo de cinco meses. (40x).

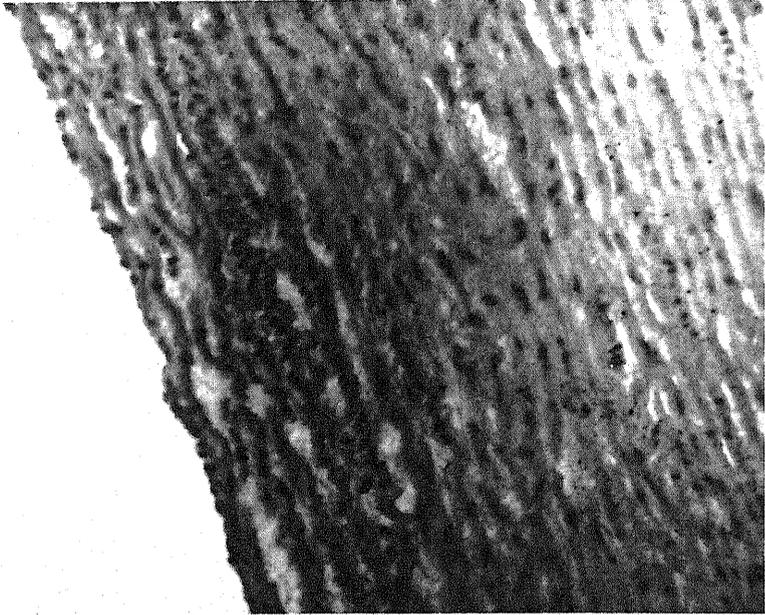


Fig. 3: Aorta torácica (TP). Desprendimiento de la línea endotelial edematizada. Lote control. Grupo de cinco meses. (10x).

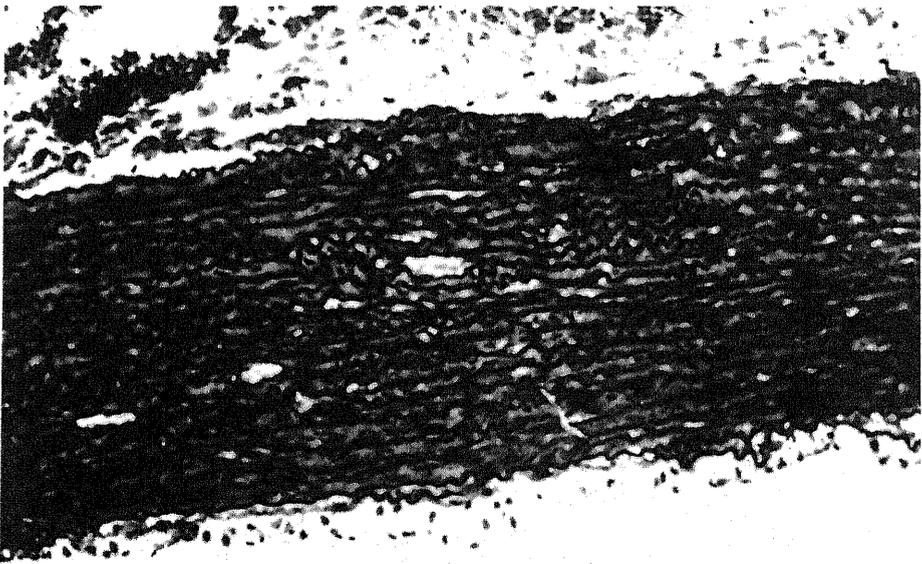


Fig. 4: Cayado aórtico (TD) con lesión inicial. Rotura de fibras elásticas y edema. Lote control. Grupo de cinco meses. (10x).



Fig. 5: Cayado aórtico (TD) con lesión avanzada. Pérdida endotelial. Infiltración y proliferación de células musculares lisas y mononucleares. Trombo mural (flecha). Lote control. Grupo de cinco meses. (100x).

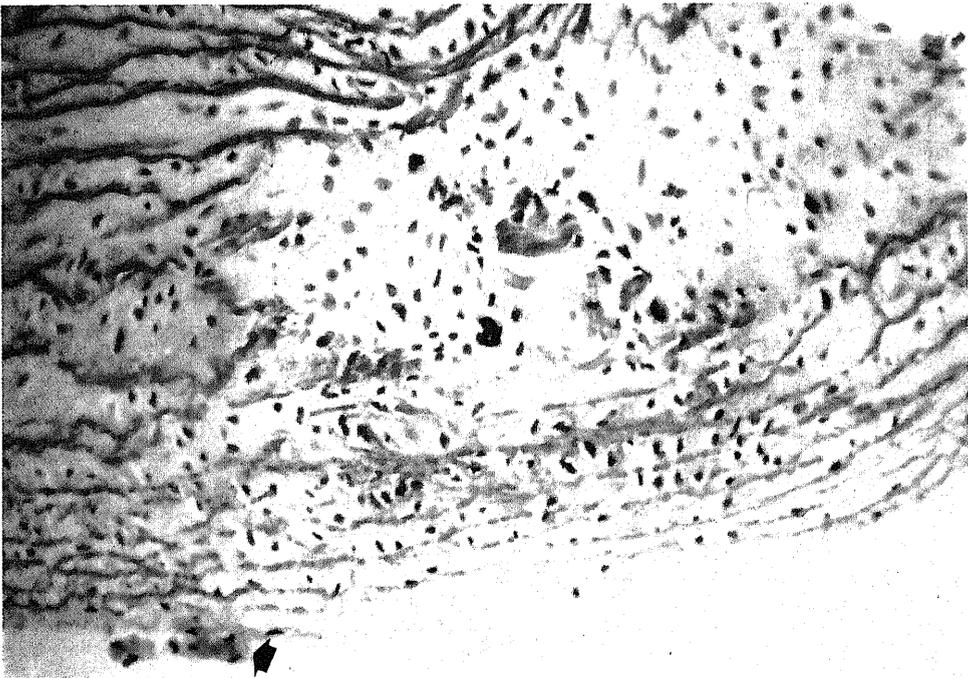


Fig. 6: Cayado aórtico (TM) con gran infiltración grasa intra y extracelular. Lote aterogénico. Grupo de cinco meses. Las flechas señalan la capa íntima. (100x).

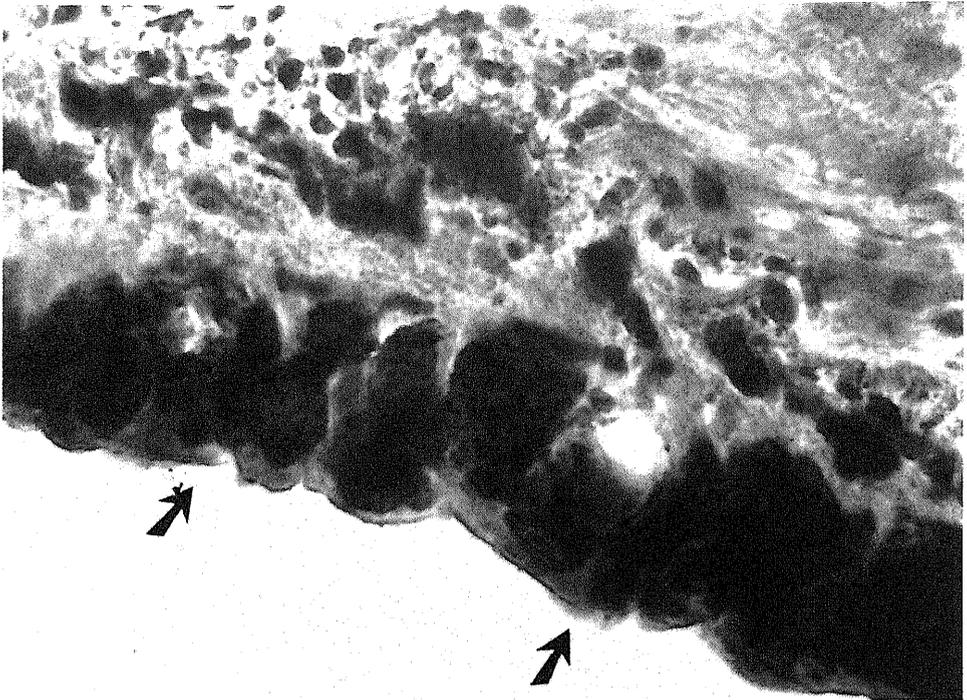
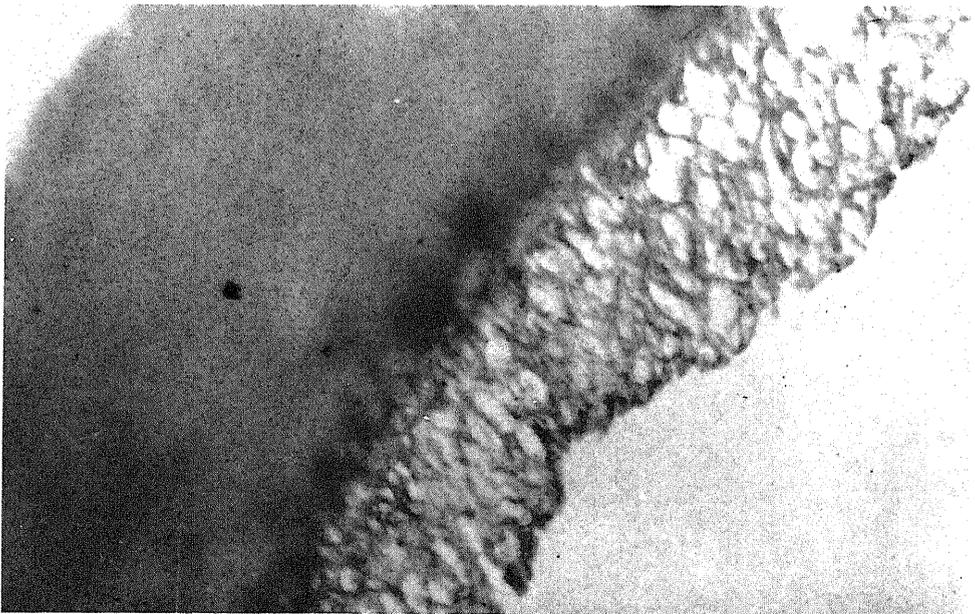


Fig. 7: Cayado aórtico (TM). Engrosamiento de la capa íntima por la presencia de células espumosas. Lote aterogénico. Grupo de cinco meses. (40x).



2. Grupo de conejos de 18 meses

2.1. Incidencia de lesiones ateroscleróticas

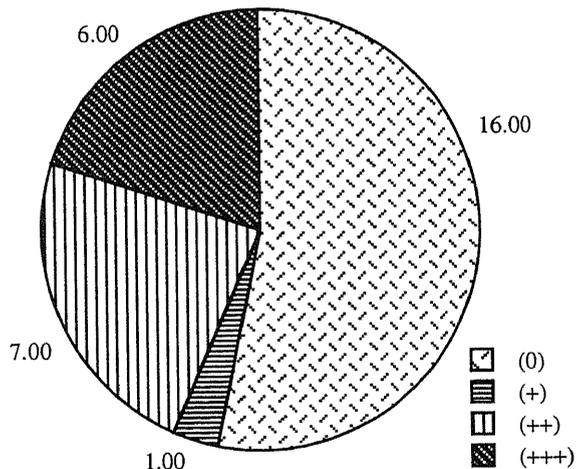
El estudio con microscopía óptica de cortes sucesivos y continuados de las diferentes porciones TP, TM y TD de cada uno de los segmentos en que se divide la arteria aorta, permite realizar una composición topográfica bastante aproximada de la extensión y grado de las lesiones de la pared vascular, localizándose la mayor incidencia en el tercio medio y distal del cayado aórtico.

La incidencia de lesiones ateroscleróticas en la capa íntima es de 46.6 por cien distribuyéndose de la siguiente forma: un 37 por cien en los tercios proximal y medio de cayado aórtico y un 55 por cien en su tercio distal, un 5 por cien en el tercio torácico proximal y un 2.5 por cien en la aorta abdominal. Las lesiones pertenecen fundamentalmente a los grados medio (++) y muy evolucionado (+++); algunas abarcan 2/3 del cayado aórtico y sólo en dos casos lo ocupan en su totalidad. Cuadro 2. Gráfica 3.

Cuadro 2: Grado de las lesiones ateroscleróticas. Grupo de 18 meses

Casos	Lesiones
1	+++
2	+++
3	+++
4	++
5	++
6	++
7	++
8	+++
9	++
10	+++
11	+++
12	++
13	++
14	+
15-30	0

Gráfica 3: Grado de las lesiones ateroscleróticas. Grupo de 18 meses



- (0) Grado 0. Ausencia de lesiones.
- (+) Grado I. Lesiones iniciales
- (++) Grado II. Lesiones de grado medio.
- (+++) Grado III. Lesiones muy evolucionadas.

2.2. Estructura histológica aórtica y de las lesiones ateroscleróticas

El examen microscópico de los diferentes fragmentos aórticos pertenecientes a los animales aparentemente normales de este grupo, refleja una histología sin alteraciones conservando perfectamente diferenciadas todas sus capas (Figs. 8 y 9).

En los animales con lesiones se observan cortes con despegamiento segmentario endotelial (Fig. 11); otros con intenso engrosamiento de la capa íntima con rotura de fibras elásticas y edema (Figs. 10 y 16), infiltración mononuclear (Fig. 12) y de células musculares lisas (Fig. 15) conservando el endotelio; otros con despegamiento endotelial y proliferación de células musculares lisas (Fig. 14) y otros llegando incluso al desprendimiento endotelial (Fig. 13) acompañándose de trombos murales (Fig. 20). Es frecuente la presencia de placas fibrosas (Figs. 17, 18 y 19) delimitadas por tejido normal en la capa íntima, con un centro carente de estructura que corresponde a la existencia de calcio y constituyendo una protusión hacia la luz del vaso. En esta capa existe un contenido en grasa muy difuso sin llegar a acumularse en las placas fibrosas.

Fig. 8: Cayado aórtico normal (TM). Grupo de 18 meses. (40x).

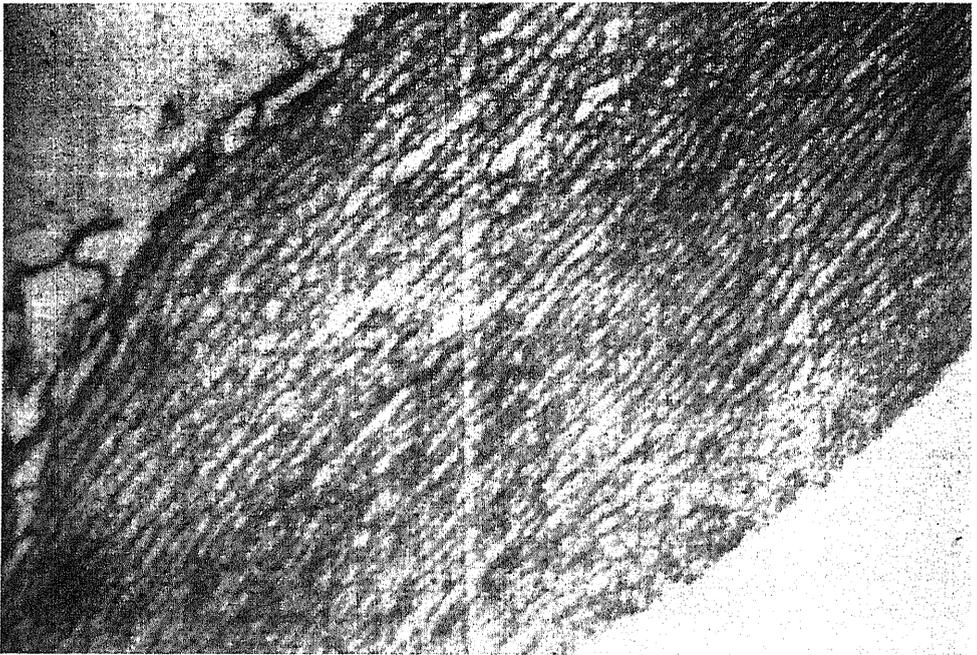


Fig. 9: Aorta torácica normal. Grupo de 18 meses. (10x).

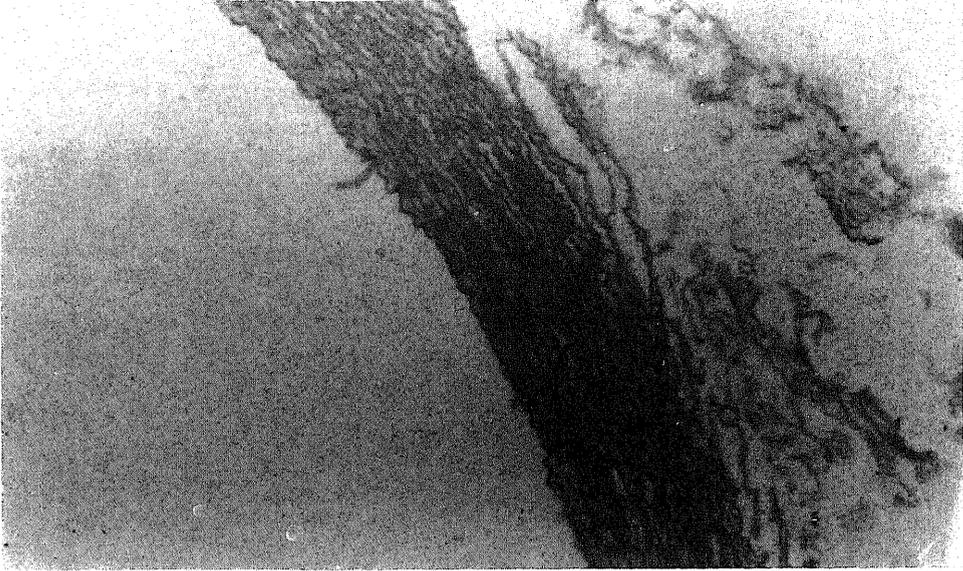


Fig. 10: Cayado aórtico (TM) con irregularidad en la capa íntima por rotura de fibras elásticas y edema. Grupo de 18 meses. (40x).

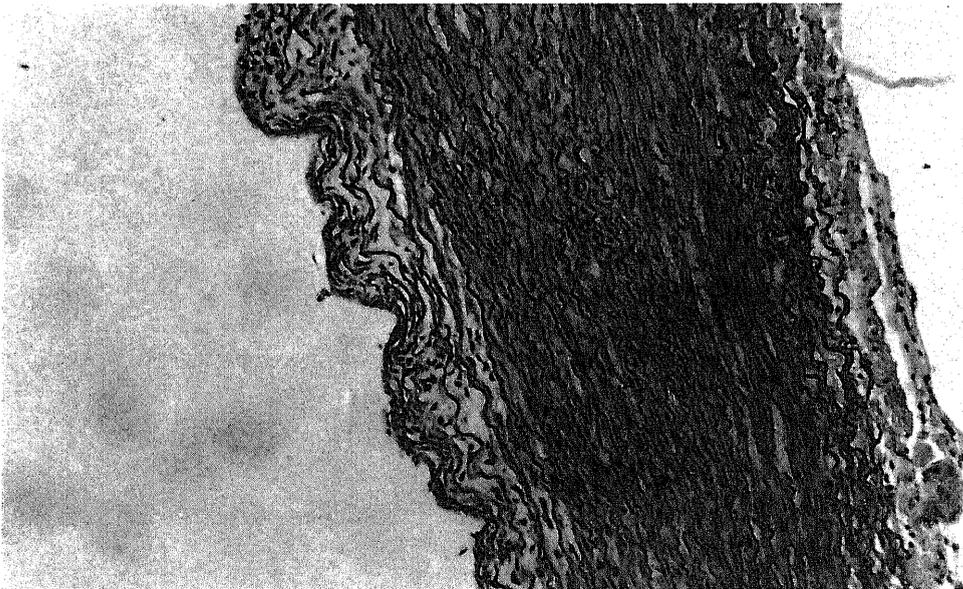


Fig. 11: Cayado aórtico (TP) con despegamiento segmentario endotelial. Las flechas indican la extensión de la lesión. Grupo de 18 meses. (40x).

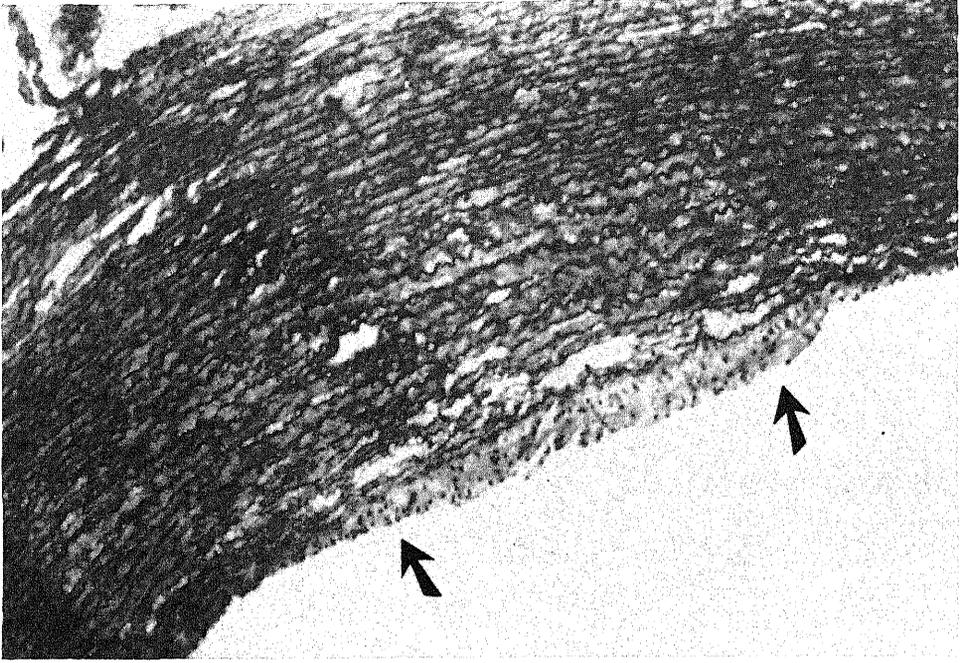


Fig. 12: Cayado aórtico (TM) con lesión inicial de despegamiento endotelial e infiltración de células mononucleadas. Grupo de 18 meses. (10x).

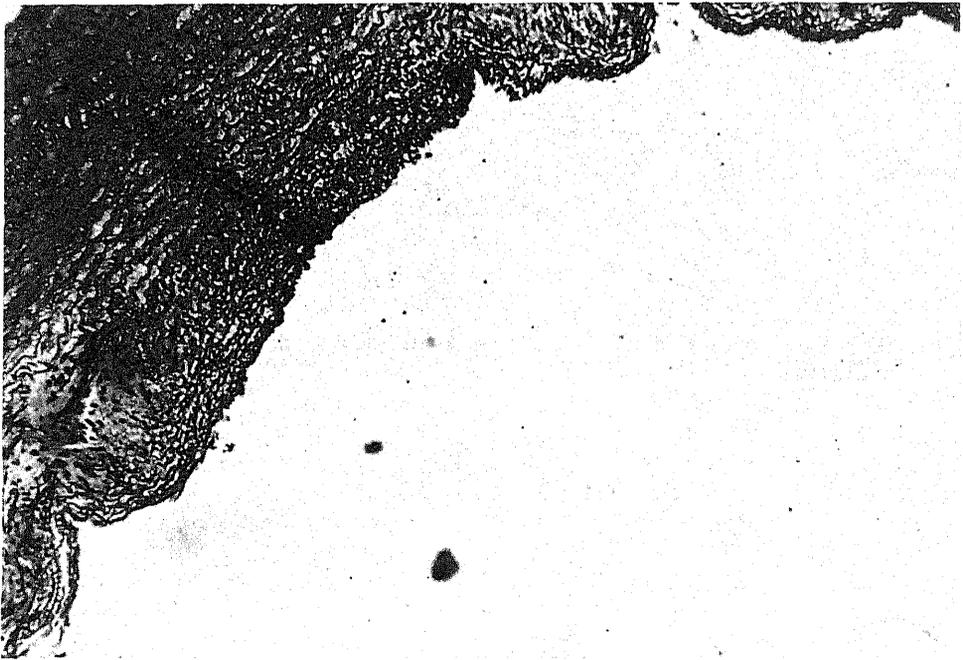


Fig. 13: Cayado aórtico (TM) con desprendimiento endotelial. Grupo de 18 meses. (40x).

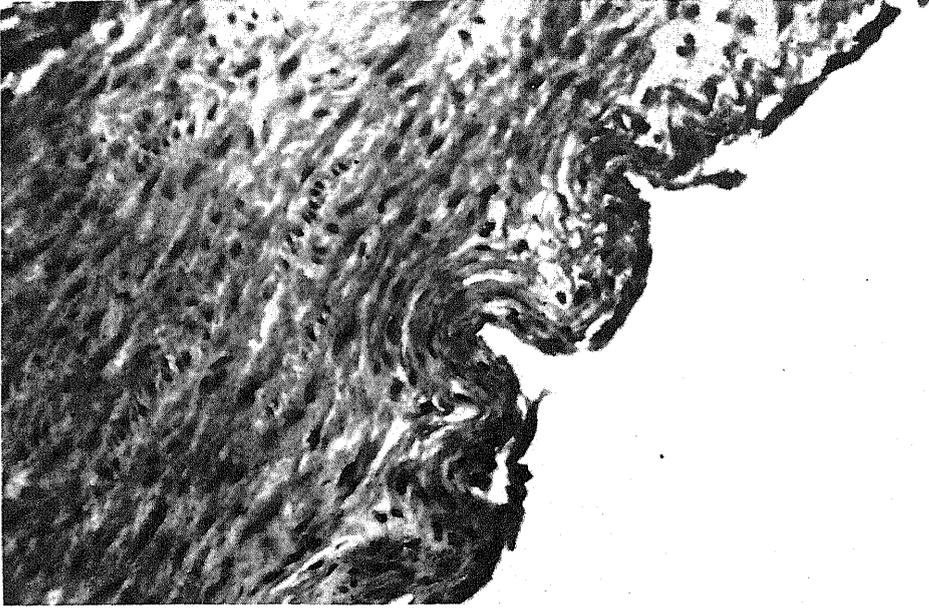


Fig. 14: Cayado aórtico (TM). Despegamiento endotelial. Infiltración y proliferación de células musculares lisas. Grupo de 18 meses. (100x).

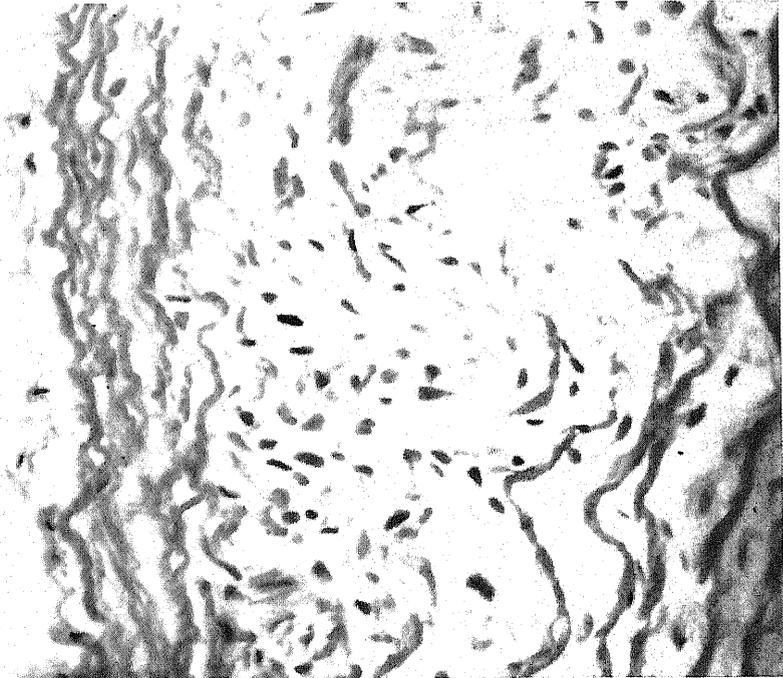


Fig. 15: Cayado aórtico (TP) con rotura de fibras elásticas e infiltración de células musculares lisas. Grupo de 18 meses. (40x).

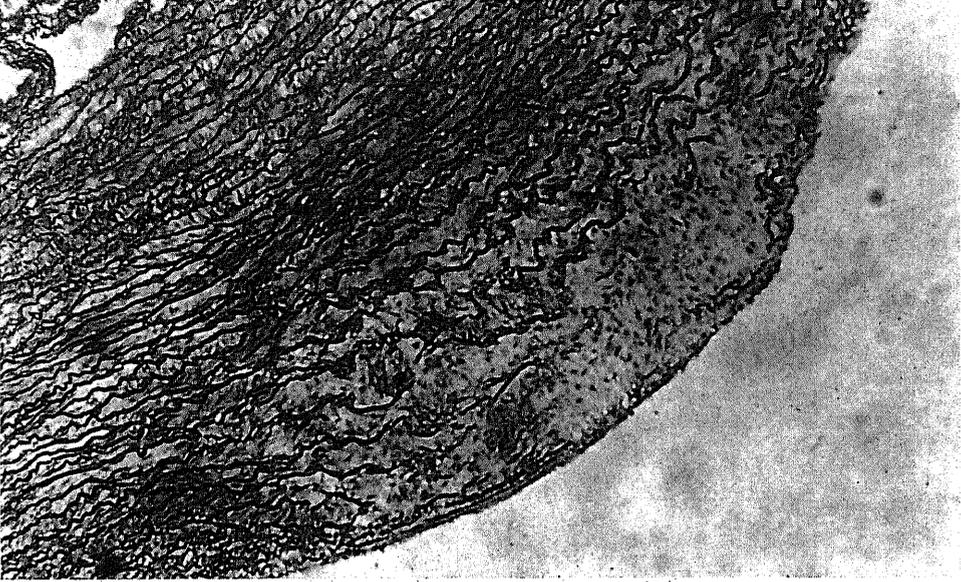


Fig. 16: Tinción de fibras elásticas en una lesión inicial. Grupo de 18 meses. (40x).

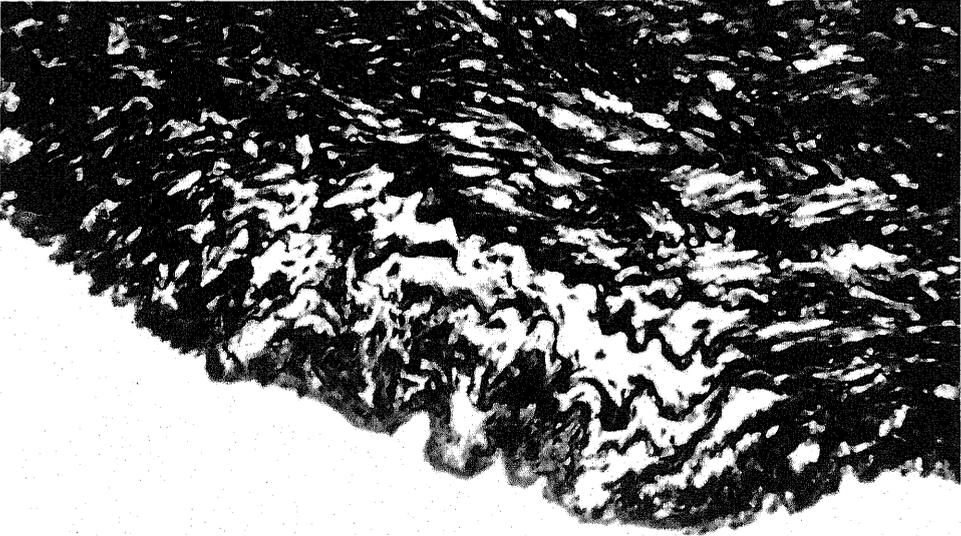


Fig. 17: Cayado aórtico (TD) con lesiones ateroscleróticas en distinto grado de evolución hasta la formación de placas. Grupo de 18 meses. (10x).

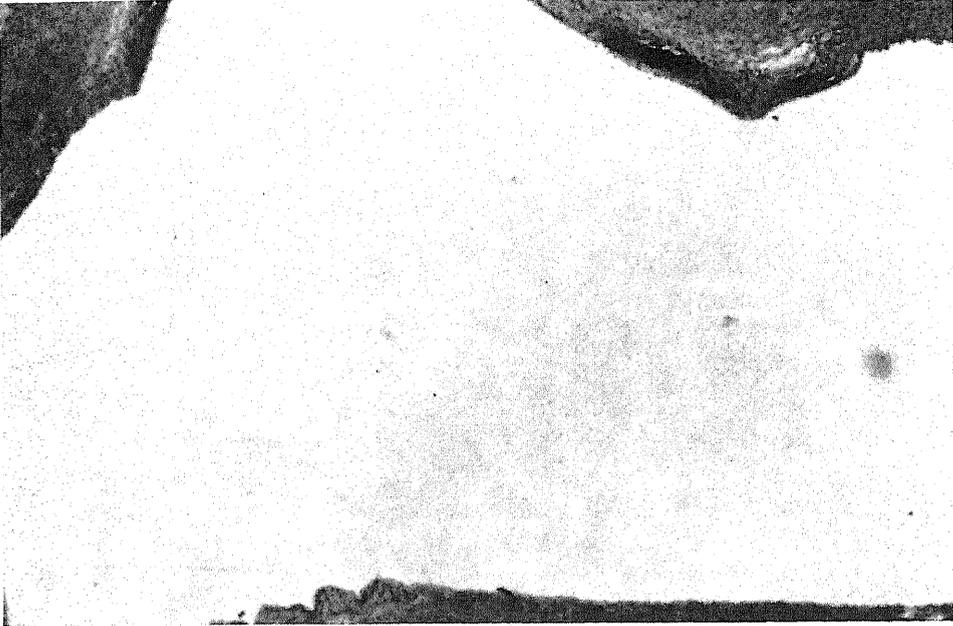


Fig. 18: Cayado aórtico (TM) con lesiones en distinto grado de evolución hasta la formación de placas. Grupo de 18 meses. (10x).



Fig. 19: Aorta torácica. Lesión avanzada con formación de placa aterosclerótica. Grupo de 18 meses. (10x).

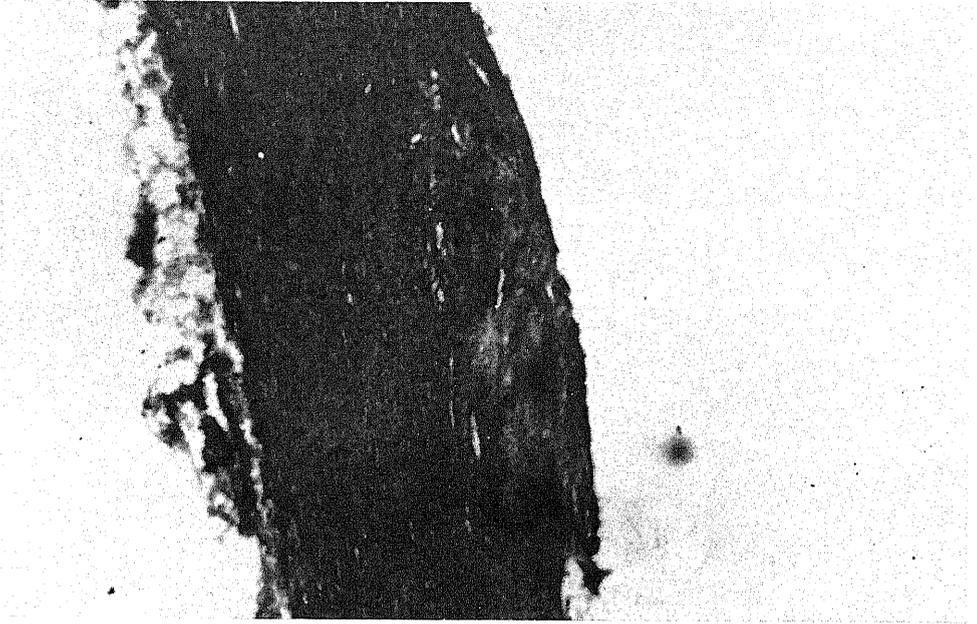
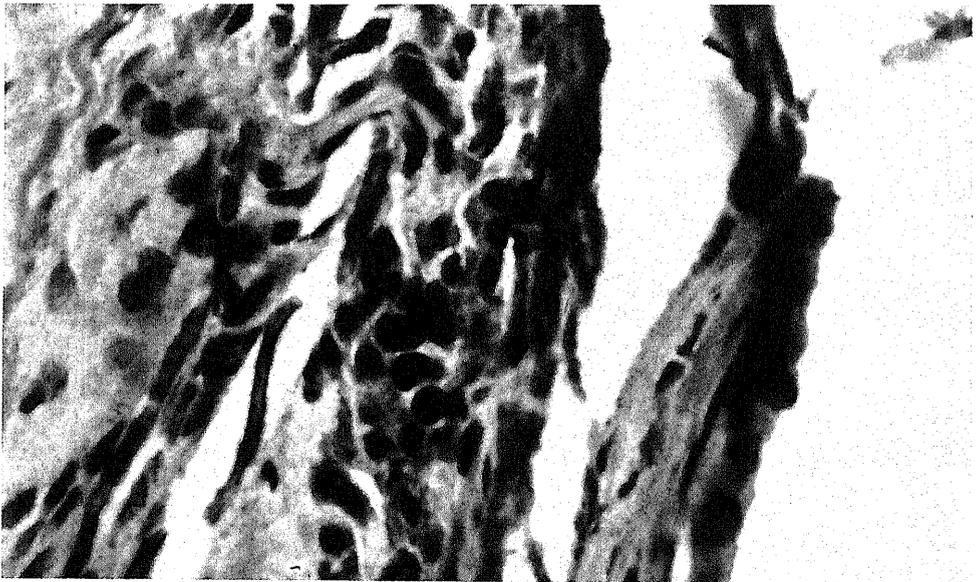


Fig. 20: Cayado aórtico (TM). Lesión aterosclerótica avanzada con presencia de trombo plaquetar mural, desprendimiento de la capa íntima, infiltración mononuclear y de células musculares lisas, rotura de fibras elásticas y edema. Grupo de 18 meses. (100x).



Valoración ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.) del cayado aórtico y de sus lesiones ateroscleróticas. Especial referencia al elemento plaquetar

1. Grupo de animales de 5 meses

El estudio se centra en las capas íntima, elástica y media del cayado aórtico, por ser éste el lugar de mayor incidencia de lesiones ateroscleróticas visualizadas con microscopía ordinaria. Para la localización de las lesiones se practican previamente cortes semifinos.

En el lote control se observa el endotelio conservado, uniforme, relajado (Fig. 25) y algunas veces contraído (Fig. 24). Por el contrario en los animales sometidos a dieta aterogénica el endotelio está bastante tumefacto, unas veces conservado y con abundante actividad pinóctica y otras denudado. Por debajo del endotelio se observa una gran infiltración lipídica con abundantes células espumosas que corresponden a histiocitos vacuolizados por lípidos (Fig. 21) en forma de inclusiones laminares representando figuras de mielina, coexistiendo con un intenso edema.

En el lote con dieta aterogénica los elementos miógenos, células musculares lisas alteradas, contienen dos clases de vacuolizaciones, unas de tipo lisosomal y otras más densas de aspecto estratificado con disposición mielínica (Fig. 22) que corresponden a inclusiones lipoproteicas. En las lesiones avanzadas aparecen gran cantidad de células mononucleadas con fuerte infiltración de células musculares lisas y éstas últimas se transforman en células espumosas miógenas con inclusiones citoplasmáticas de contenido granuloso y rodeadas de una membrana para finalmente perder la disposición de los miofilamentos y originar células repletas de vacuolas con distinta densidad electromicroscópica (Fig. 23).

Un aspecto de especial interés lo constituye el estudio del comportamiento plaquetar en la pared arterial de los diferentes grupos de experimentación. Existen semejanzas entre las formaciones microtrombóticas murales observadas en el lote control de cinco meses y en el grupo experimental de 18 meses, ya que son muy escasas y están constituidas por un reducido número de elementos plaquetares con formaciones seudopódicas de los que dos o tres se hallan adheridos a la zona denudada; se aprecian los componentes granulares de los elementos que conforman la agregación plaquetar y los microtrombos adquieren formas libres o pendulares entre otras en la luz del vaso (Fig. 27). Algunas veces se visualizan elementos plaquetares en la zona subendotelial concomitante a zonas endoteliales normales que presentan una forma redondeada u ovoidea sin formaciones seudopódicas. También, aunque con escasa frecuencia, se observan plaquetas en la zona elástica sin formaciones seudopódicas y con sus componentes granulares, lo que expresa su inactividad. Por último, rara vez se hallan elementos plaquetares en relación con la capa media.

Los elementos plaquetares adquieren una especial característica en los conejos con lesiones ateromatosas tanto del lote con dieta aterogénica como en los animales de 18 meses de experimentación.

En el lote de conejos con dieta aterogénica, son muy frecuentes tanto los trombos murales (Fig. 26) exclusivamente constituidos por plaquetas como los trombos mixtos (Fig. 29). Los trombos plaquetares están formados por un gran agregado celular y se adhieren a la zona subendotelial por cuatro o más elementos plaquetares y en ellos la mayoría de las plaquetas más cercanas a la pared vascular se hallan degranuladas y con una gran variedad de formaciones seudopódicas con las que se abren camino entre las plaquetas vecinas (Fig. 28). Las plaquetas más alejadas de la pared del vaso mantienen sus formaciones granulares perfectamente reconocibles. Es frecuente hallar redes de fibrina entre las plaquetas. En estos microtrombos no son reconocibles ni hematíes ni leucocitos. En la zona correspondiente a la lámina elástica se observa con cierta frecuencia algún acúmulo plaquetar en el que se imbrican elementos degranulados con otros granulados y en las zonas más cerca-

nas a la capa media son reconocibles elementos degranulados con forma de globo.

Los microtrombos mixtos se localizan en posición subendotelial alternando con zonas donde el endotelio se encuentra más o menos alterado y contienen en su interior quilomicrones, elementos plaquetares degranulados, hematíes, leucocitos y gránulos con estructura mitocondrial (Fig. 29).

Las características de los elementos plaquetares del grupo de experimentación de 18 meses se desarrollan en el apartado correspondiente a este grupo.

Fig. 21: M.E.T. Electro-micrografía. Elemento histiocitario de aspecto espumoso entre células musculares lisas. Lote aterogénico. Grupo de cinco meses. (7000x).

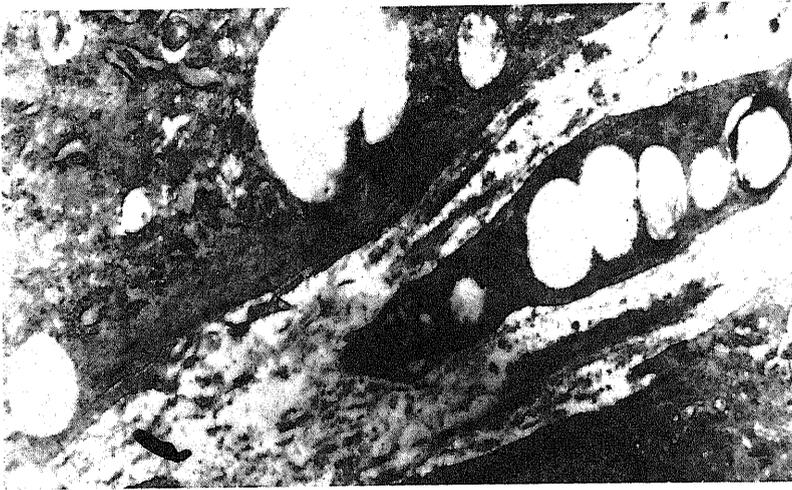


Fig. 22: M.E.T. Electro-micrografía. Células musculares alteradas con inclusiones lipoproteicas en disposición mielínica. Lote aterogénico. Grupo de cinco meses. (7000x).

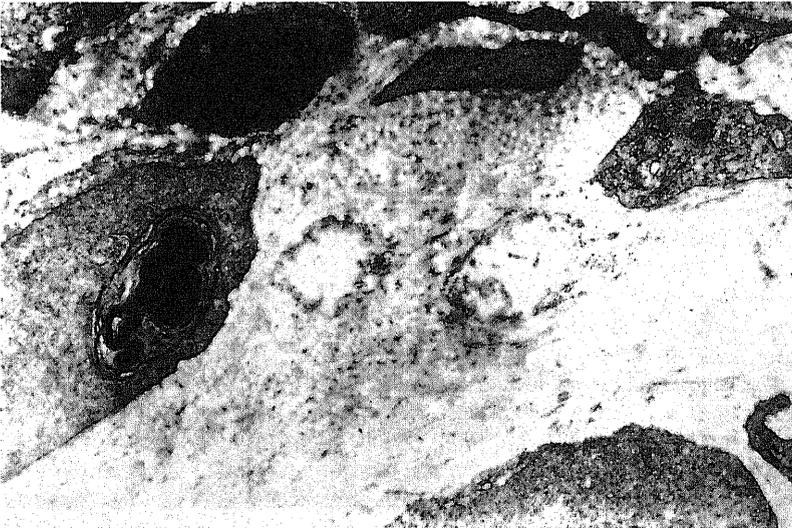


Fig. 23: M.E.T. Electro-micrografía. Células musculares lisas muy alteradas (células miógenas). Lote aterogénico. Grupo de cinco meses. (7000x).



Fig. 24: M.E.T. Electro-micrografía. Célula endotelial contraída (End). Lámina elástica (EL). Lote control sin lesiones. Grupo de cinco meses. (3000x).



Fig. 25: M.E.T. Electro-micrografía. Célula endotelial relajada. Capa muscular lisa. Lote control sin lesiones. Grupo de cinco meses. (3000x).

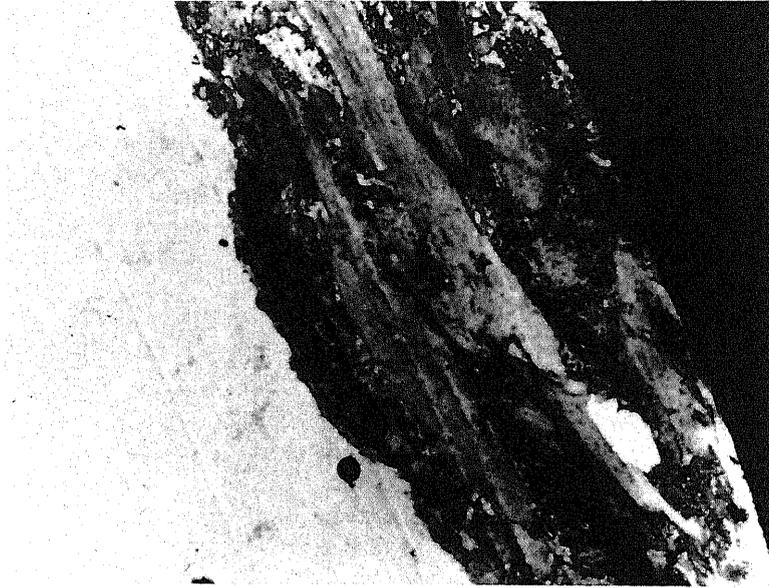


Fig. 26: M.E.T. Electro-micrografía. Trombo plaquetar mural. Lote aterogénico. Grupo de cinco meses. (11000x).

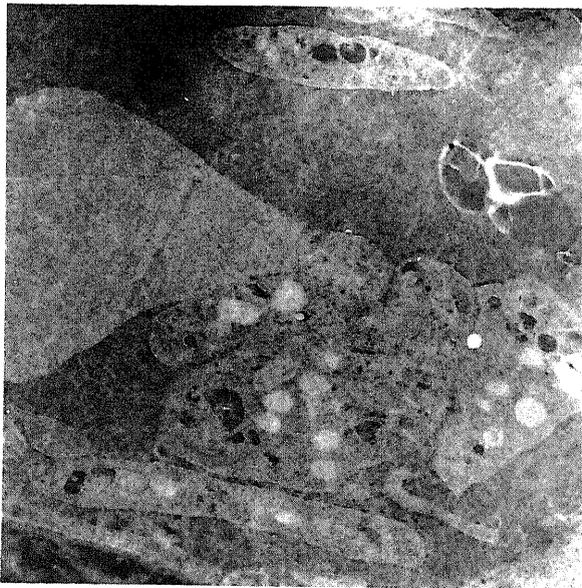


Fig. 27: M.E.T. Electro-micrografía. Trombo mural plaquetar con un resto de célula endotelial flotando en la luz del vaso. Hematíes. Lote control con lesiones. Grupo de cinco meses. (7000x).

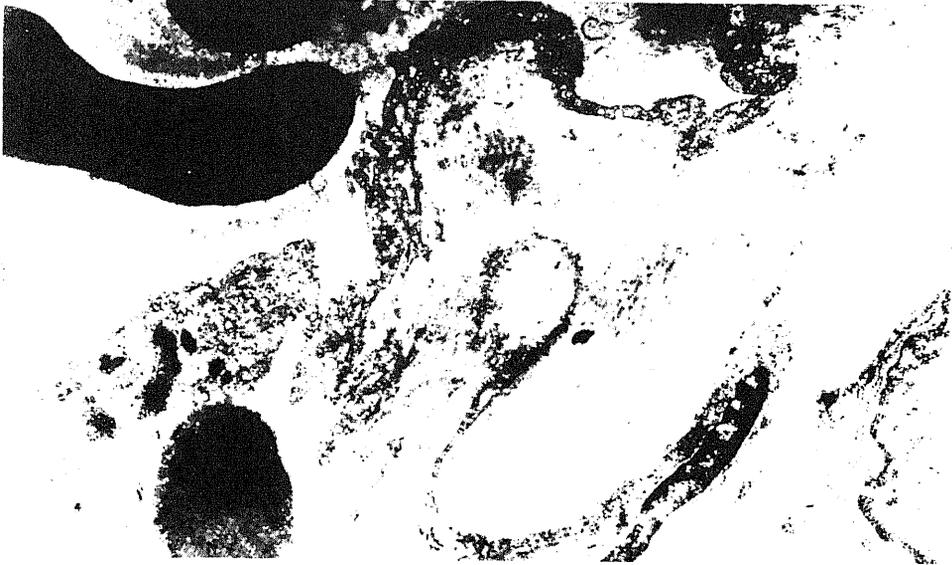


Fig. 28: M.E.T. Electro-micrografía. Trombo mural adherido a una zona desnuda subendotelial en el que se observan elementos plaquetares en diferente estado de evolución, formaciones pseudopódicas plaquetares que se infiltran entre las plaquetas vecinas y red de fibrina en la superficie del trombo. Lote aterogénico. Grupo de cinco meses. (7000x).

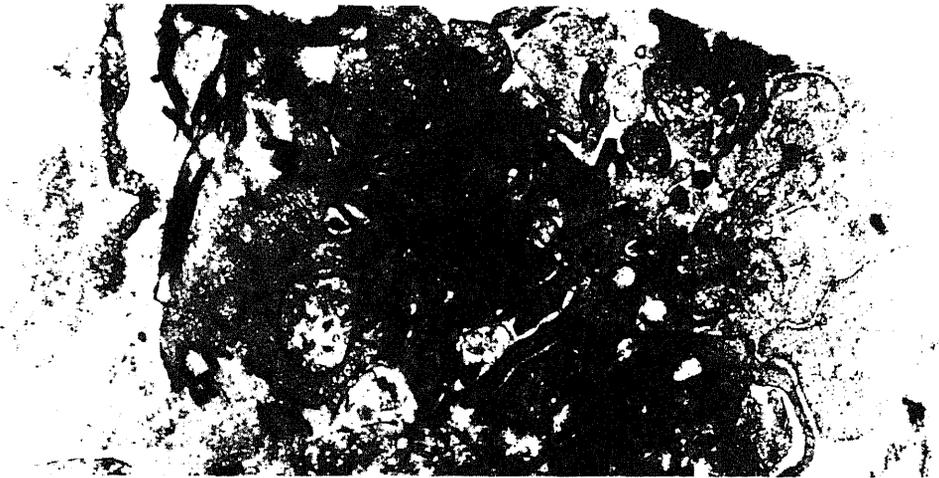
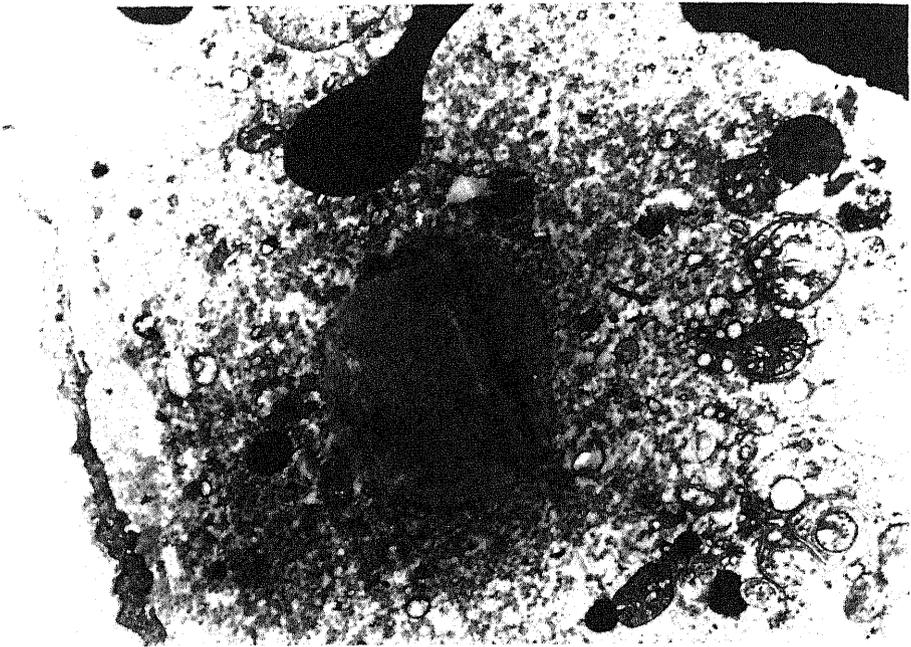


Fig. 29: M.E.T. Electro-micrografía. Trombo mixto en el que se visualiza un quilomicrón, mitocondrias y un hematíe. Se observa un endotelio con gran pinocitosis. Lote aterogénico. Grupo de cinco meses. (7000x).



2. Grupo de 18 meses

El estudio se centra en las capas íntima, elástica y media del cayado aórtico al igual que en el grupo de cinco meses, por ser el lugar de máxima incidencia de lesiones ateroscleróticas visualizadas con microscopía ordinaria y para la localización de las lesiones también se practican previamente cortes semifinos.

En las preparaciones sin lesiones histológicas, el estudio con microscopía electrónica muestra una línea endotelial semejante a la del grupo control de cinco meses, formada por elementos endoteliales relajados y contraídos (Fig. 30), y estos últimos facilitan la comunicación del subendotelio con la luz vaso (Fig. 30). En el espacio subendotelial aparecen elementos plaquetares en solitario de forma redondeada, con escasas granulaciones y sin que morfológicamente denoten actividad (Fig. 30). En las capas subendotelial y elástica interna se halla alguna célula muscular lisa siendo abundante su presencia en la capa media en disposición clásica y sin presentar alteraciones. En la zona elástica, constituida por haces fibrilares cortados transversal o longitudinalmente, se observan elementos plaquetares individualizados (con morfología semejante a las plaquetas encontradas en la zona subendotelial) o formando grupos (Fig. 31). En el inicio de la capa muscular se observa con carácter extraordinario algún elemento plaquetar cercano a células musculares lisas.

En las preparaciones procedentes de animales con lesiones incipientes, el endotelio también presenta elementos celulares contraídos (Fig. 32) y relajados de estructura normal o acompañados de un edema subendotelial que les provoca su despegamiento segmentario, no siendo infrecuente la observación de elementos plaquetares inmediatamente por debajo

de las células endoteliales y en el subendotelio. Cuando se profundiza hacia la capa media, a nivel de la capa elástica se visualiza algún grupo o microtrombo plaquetar formado por cuatro o más elementos celulares que mantienen su contenido granular. Al comienzo de la capa muscular se observa la disposición clásica de los elementos musculares lisos y se aprecia de manera inconstante algún elemento plaquetar cercano a ellos.

Fig. 30: M.E.T. Composición electro-micrográfica. Capa íntima en la que se observa célula endotelial contraída (End), lámina elástica interna (LEI) y elementos plaquetares aislados no activos (P). Grupo de 18 meses sin lesiones. (4000x).



Fig. 31: M.E.T. Electro-micrografía. Capa elástica con grupo de plaquetas con características morfológicas de ausencia de actividad (punta de flecha). Grupo de 18 meses sin lesiones. (7000x).

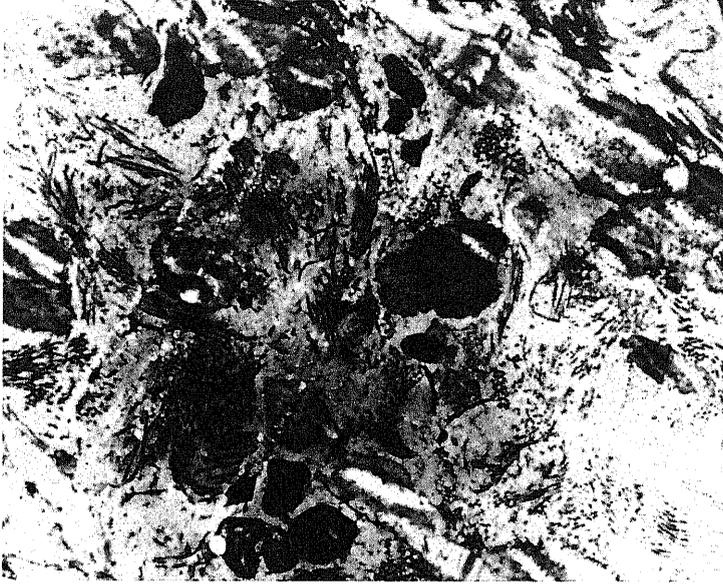


Fig. 32: M.E.T. Electro-micrografía. Célula endotelial contraída (End) ofreciendo zona de apertura que pone en contacto la luz del vaso con el subendotelio y la lámina elástica interna (LEI). Grupo de 18 meses con lesión inicial. (11000x)



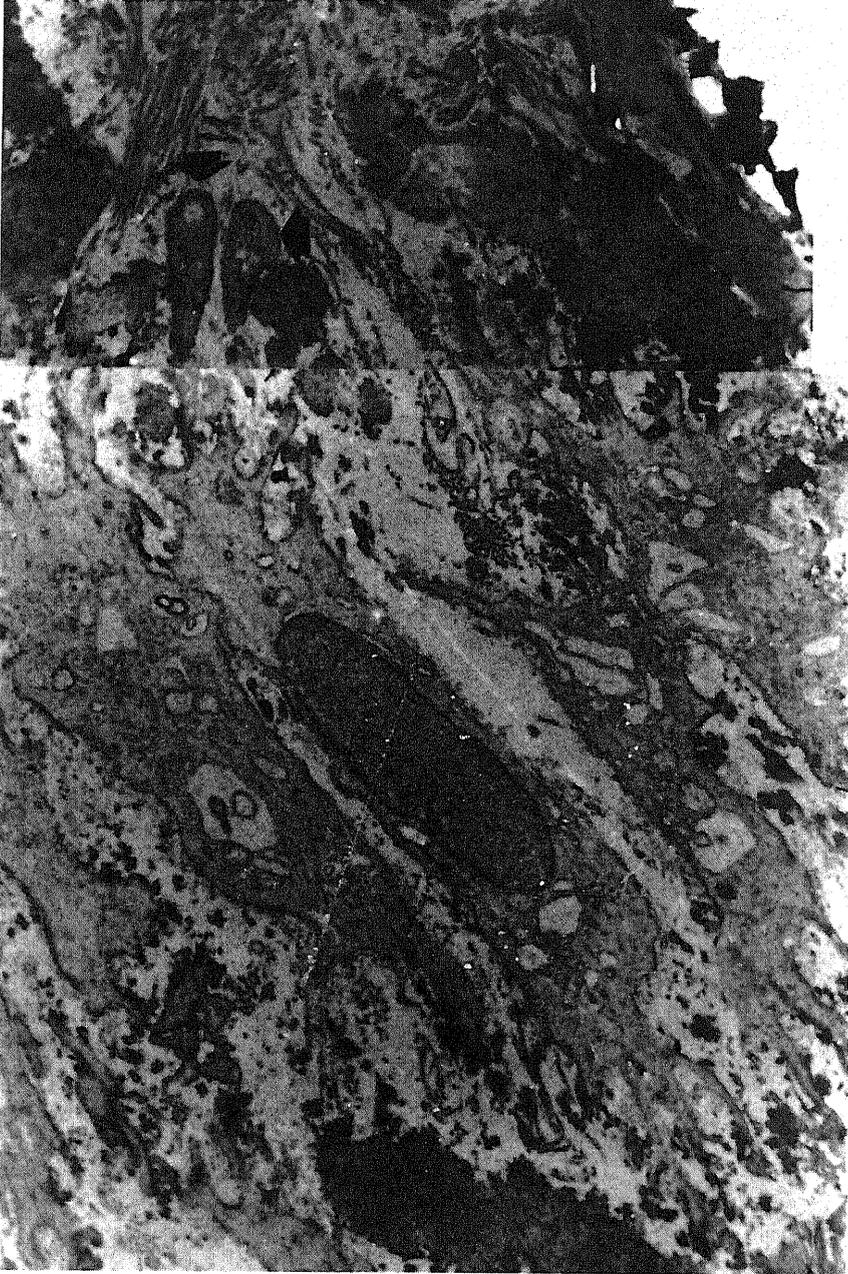
En las preparaciones que corresponden a lesiones avanzadas, el endotelio presenta células endoteliales relajadas o contraídas aparentemente normales con edema subendotelial, o zonas desnudas que contienen con frecuencia microtrombos murales, constituidos por elementos plaquetares donde los más alejados de la pared vascular conservan sus membranas y granulaciones. En la zona subendotelial se observa un manifiesto incremento de fibras de colágeno con células musculares lisas alteradas (Fig. 33) entre ellas, microtrombos plaquetares sin pérdida de su morfología y algún elemento plaquetar individualizado que conserva todas sus estructuras. En la capa elástica pueden encontrarse aglomerados plaquetares. En la capa muscular se observan elementos plaquetares individualizados que en algún momento contactan con las células musculares lisas mediante alguna prolongación protoplasmática (Fig. 34).

En las lesiones muy evolucionadas se observa la presencia de abundantes células musculares lisas morfológicamente alteradas y a veces incluso con pérdida de su estructura característica, acompañadas de edema y de restos celulares. El endotelio puede encontrarse sin alteraciones recubriendo la lesión.

Fig. 33: M.E.T. Electro-micrografía. Célula muscular alterada con inclusiones y edema. Grupo de 18 meses con lesión avanzada. (7000x).



Fig. 34: M.E.T. Composición electro-micrográfica. Capa muscular en la que se observan dos elementos plaquetares activos en contacto con una célula muscular lisa (puntas de flecha). Grupo de 18 meses con lesión avanzada (7000x).

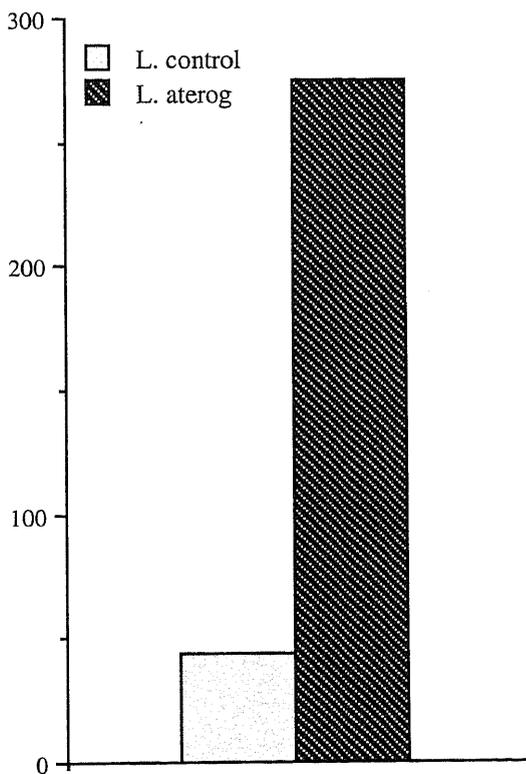


Valoración del colesterol en el grupo de experimentación de 5 meses

Los resultados obtenidos de la valoración del colesterol en el suero de los lotes control y con dieta aterogénica se resumen en el cuadro 3 y se representan en la gráfica 4. En el lote control la media de colesterol total en suero es de 43.667 +/- 16.5633 mg/100 ml, con un valor mínimo de 22 y uno máximo de 87. En el lote con dieta aterogénica la media de colesterol total es de 275.367 +/- 146.077 mg/100 ml con un valor mínimo de 105 y uno máximo de 570. El análisis estadístico del estudio de la comparación de las medias de ambos grupos nos muestra una $t = 8.633$ y una $p < 0.001$ (diferencia significativa).

Cuadro 3 y Gráfica 4: Colesterol total en suero

Casos	L. control	Casos	L. aterog.
1	25	1	157
2	31	2	238
3	63	3	430
4	42	4	268
5	38	5	211
6	30	6	105
7	67	7	105
8	63	8	161
9	87	9	137
10	39	10	215
11	37	11	570
12	22	12	153
13	53	13	480
14	28	14	150
15	25	15	500
16	31	16	317
17	31	17	149
18	37	18	231
19	26	19	164
20	58	20	456
21	38	21	500
22	26	22	250
23	37	23	278
24	70	24	181
25	57	25	268
26	56	26	522
27	39	27	288
28	63	28	497
29	53	29	137
30	38	30	143
\bar{x}	= 43.667	\bar{x}	= 275.367



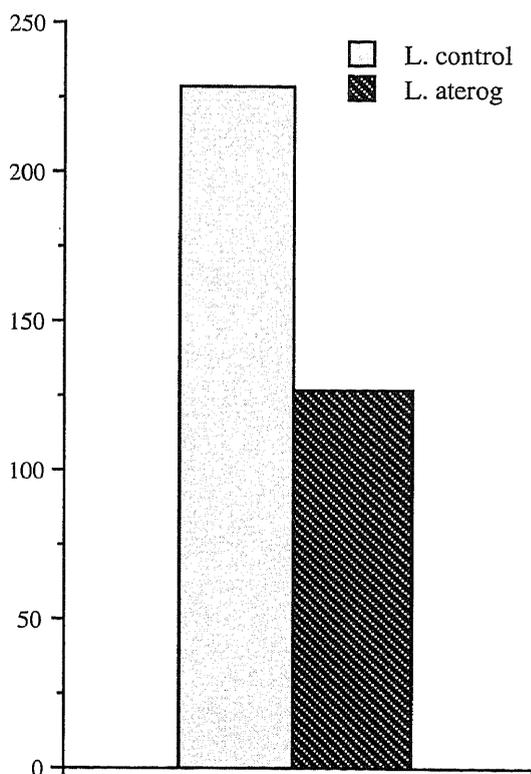
Determinación del 6-Oxo-PGF1a en cayado aórtico

1. Grupo de 5 meses

La determinación en el TP del cayado aórtico del metabolito de la prostaciclina 6-oxo-PGF1a, muestra una marcada disminución en el lote sometido a dieta aterogénica frente al lote control, como se observa en el cuadro 4 representado en la gráfica 5, obteniéndose un máximo de 211.26 pg/ml/mg/3 min. y un mínimo de 63.15 pg/ml/mg/3 min. con una media de 126.586+/-34.509. El lote control presenta un máximo de 338.46 pg/ml/mg/3 min. y un mínimo de 142.50 pg/ml/mg/3 min. con una media de 228.869+/-42.810. La diferencia entre ambos lotes es altamente significativa ($p < 0.001$). Los resultados corresponden a 24 animales por grupo.

Cuadro 4 y Gráfica 5: 6-Oxo-PGF1a en aorta

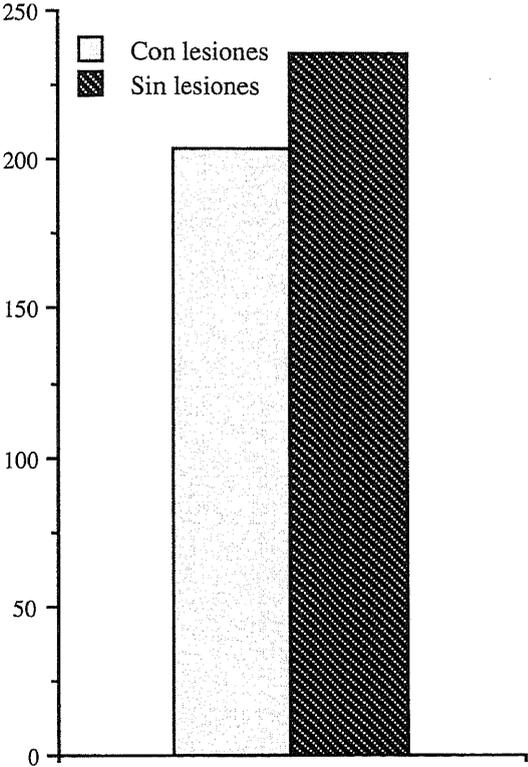
Casos	L. control	Casos	L. aterog.
1	206.25	1	116.41
2	246.42	2	190.90
3	192.30	3	146.93
4	338.46	4	142.50
5	319.67	5	130.50
6	194.10	6	113.44
7	219.40	7	96.17
8	223.88	8	125.80
9	258.62	9	211.26
10	216.66	10	190.67
11	257.40	11	147.27
12	210.74	12	77.30
13	271.81	13	63.15
14	240.00	14	98.36
15	182.35	15	138.46
16	240.93	16	126.60
17	209.00	17	130.15
18	187.50	18	127.40
19	216.41	19	95.00
20	190.90	20	110.60
21	246.93	21	115.00
22	142.50	22	97.60
23	230.00	23	120.90
24	250.62	24	125.70
\bar{x}	= 228.869	\bar{x}	= 126.586



Los resultados obtenidos al estudiar por separado la producción de 6-oxo-PGF1a en los animales sin lesiones (19 casos) y con lesiones (5 casos) del lote control, contenidos en el cuadro 5 y representados en la gráfica 6, muestran unas medias de 236.178+/-44.148 y 204.066+/-25.661 pg/ml/mg/3 min respectivamente que no expresan una diferencia valorable. En el mismo sentido los resultados hallados cuando se analiza la producción de 6-oxo-PGF1a diferenciando animales sin lesiones (14 casos) y con lesiones (10 casos) en el lote con dieta aterogénica, recogidos en el cuadro 6 y representados en la gráfica 7, muestran unas medias de 127.886+/-37.352 y de 124.767+/-31.966 pg/ml/mg/3 min respectivamente, no existiendo tampoco una diferencia significativa.

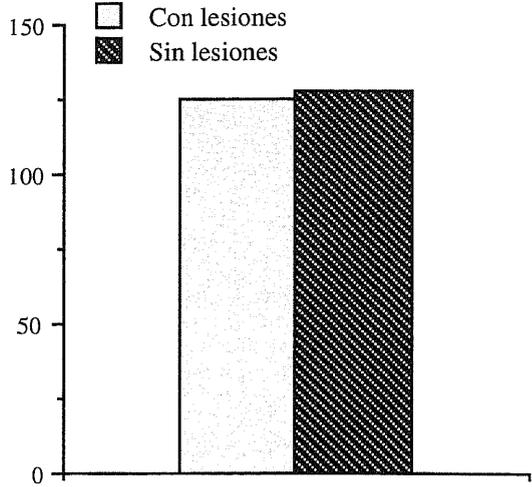
Cuadro 5 y Gráfica 6: 6-Oxo-PGF1a en aorta. Lote Control

Casos Con lesiones		Casos Sin lesiones	
1	206.25	1	246.25
2	197.30	2	338.46
3	182.35	3	319.67
4	246.93	4	194.10
5	187.50	5	219.40
		6	233.88
		7	258.62
		8	216.66
		9	257.40
		10	210.74
		11	271.81
		12	240.00
		13	240.93
		14	209.00
		15	216.41
		16	190.90
		17	142.50
		18	230.00
		19	250.62
$\bar{x} = 204.066$		$\bar{x} = 236.178$	



Cuadro 6 y Gráfica 7: 6-Oxo-PGF1a en aorta. Lote Aterog.

Casos Con lesiones		Casos Sin lesiones	
1	190.90	1	116.41
2	142.50	2	146.93
3	130.50	3	96.17
4	113.44	4	211.26
5	125.80	5	63.15
6	147.27	6	138.46
7	77.30	7	130.15
8	98.36	8	127.40
9	126.60	9	110.60
10	95.00	10	97.60
		11	120.90
		12	125.70
		13	190.67
		14	115.00
$\bar{x} = 124.767$		$\bar{x} = 127.886$	

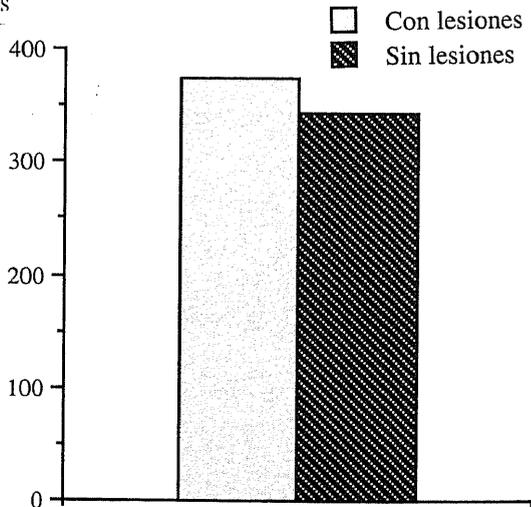


2. Grupo de 18 meses

La determinación del 6-oxo-PGF1a en el tercio proximal del cayado aórtico de 24 animales pertenecientes al grupo de experimentación de 18 meses, refleja un valor medio de 358.394+/-84.583 pg/ml/mg/3 min. con un valor máximo de 475.20 y uno mínimo de 184.50 (Cuadro 8). Cuando esta valoración se realiza diferenciándolos en animales con lesiones (12 casos) y sin lesiones (12 casos), los valores medios obtenidos son de 373.712+/-53.157 y 343.017+/-107.382 respectivamente, no encontrándose entre ellos diferencias significativas (t= 0.885). Cuadro 7. Gráfica 8.

Cuadro 7 y Gráfica 8: 6-Oxo-PGF1a en aorta. Grupo 18 meses.

Casos Con lesiones		Casos Sin lesiones	
1	425.40	1	380.10
2	381.05	2	344.15
3	368.75	3	459.25
4	446.25	4	470.60
5	411.20	5	258.80
6	294.30	6	475.20
7	463.20	7	456.10
8	363.10	8	342.20
9	335.20	9	250.50
10	317.60	10	187.00
11	328.50	11	184.50
12	350.00	12	307.80
$\bar{x} = 373.712$		$\bar{x} = 343.017$	

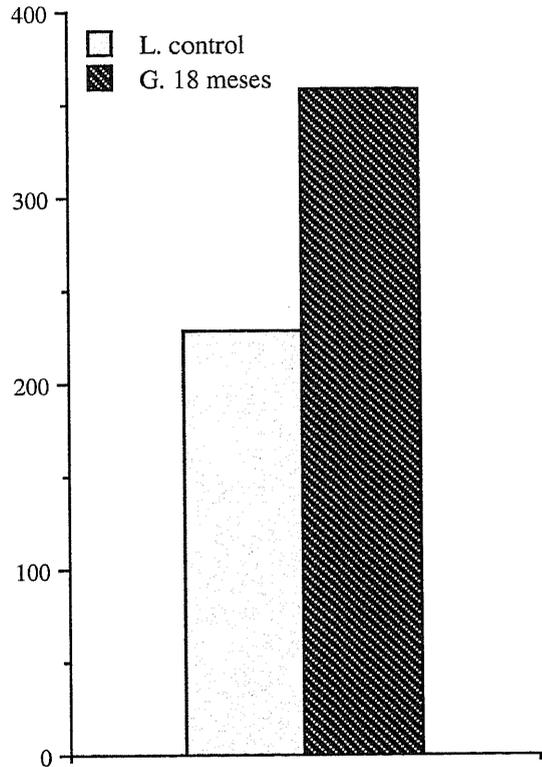


3. Comparación entre el Lote Control de 5 meses y el grupo de 18 meses

La comparación entre los resultados analíticos globales obtenidos en la determinación del 6-oxo-PGF1a entre el lote control de cinco meses y el grupo de 18 meses, nos muestra unos valores medios de 228.869+/-42.810 y 358.394+/-84.583 pg/ml/mg/3 min. respectivamente entre los que existe una marcada diferencia significativa ($p < 0.001$). Cuadro 8. Gráfica 9.

Cuadro 8 y Gráfica 9: 6-Oxo-PGF1a en aorta. Lote Control y Grupo 18 meses

Casos	5 meses	Casos	18 meses
1	206.25	1	425.40
2	246.42	2	381.05
3	192.30	3	368.75
4	338.46	4	446.25
5	319.67	5	411.20
6	194.10	6	294.30
7	219.40	7	463.20
8	223.88	8	363.10
9	258.62	9	335.20
10	216.66	10	317.60
11	257.40	11	328.50
12	210.74	12	350.00
13	271.81	13	380.10
14	240.00	14	344.15
15	182.35	15	459.25
16	240.93	16	470.60
17	209.00	17	258.80
18	187.50	18	475.20
19	216.41	19	456.10
20	190.90	20	342.20
21	246.93	21	250.50
22	142.50	22	187.00
23	230.00	23	184.50
24	250.62	24	307.80
\bar{x}	= 228.869	\bar{x}	= 358.394



Valoración de la actividad fibrinolítica en el tercio distal del cayado aórtico

1. Grupo de 5 meses

La actividad fibrinolítica se determina en el tercio distal del cayado aórtico.

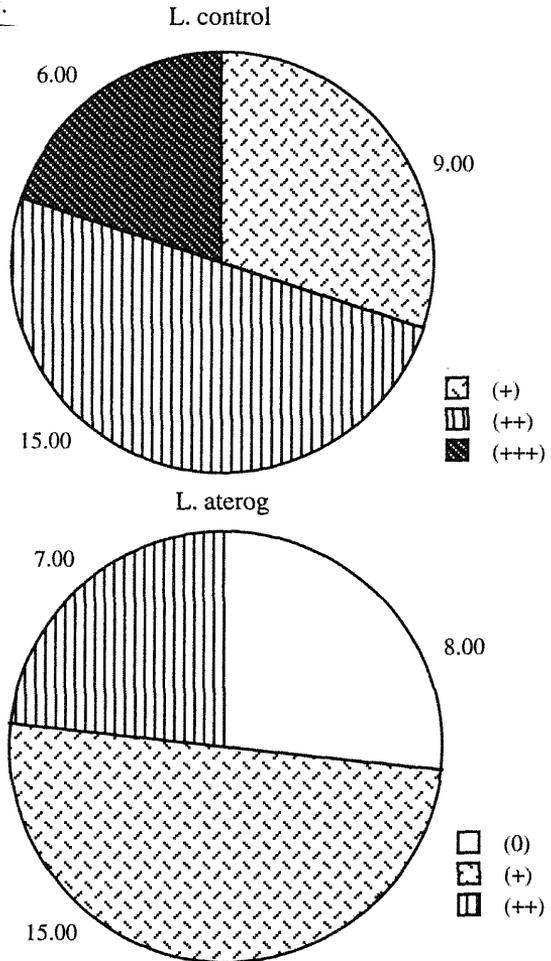
En el lote control se detecta en todos los casos una actividad fibrinolítica más o menos intensa (Cuadro 9 representado en la Gráfica 10): en nueve muestras se aprecia una intensidad de lisis moderada que se valora con (+), en 15 muestras la zona de lisis es de

una intensidad media que se valora con (++) y en las seis restantes la zona de lisis es intensa y se valora con (+++). (Fig. 36).

En el lote de animales sometidos a una dieta aterogénica, la actividad fibrinolítica del tercio distal del cayado aórtico se encuentra en general disminuida llegando en algunas muestras a ser nula: en ocho muestras no se detecta actividad fibrinolítica alguna y se valora como cero (0) (Fig. 35), en 15 la actividad fibrinolítica tiene una densidad moderada y se valora con (+) y en las siete restantes la actividad fibrinolítica es media y se valora con (++). Cuadro 9. Gráfica 10.

Cuadro 9 y Gráfica 10: Actividad fibrinolítica en cayado aórtico. Grupo de 5 meses.

Casos	L. control	Casos	L. aterog.
1	++	1	++
2	++	2	0
3	+	3	+
4	+	4	++
5	+++	5	0
6	++	6	+
7	+	7	0
8	++	8	+
9	+	9	+
10	++	10	+
11	++	11	++
12	+++	12	++
13	++	13	0
14	++	14	+
15	+	15	++
16	+	16	+
17	++	17	0
18	++	18	+
19	+	19	+
20	++	20	+
21	+++	21	+
22	++	22	++
23	++	23	+
24	+++	24	+
25	+	25	0
26	++	26	+
27	+++	27	++
28	+	28	0
29	++	29	+
30	+++	30	0



(0) No se detecta actividad fibrinolítica.
 (+) Actividad fibrinolítica moderada.
 (++) Actividad fibrinolítica media.
 (+++) Actividad fibrinolítica intensa.

Fig. 35: Cayado aórtico (TD). Ausencia de actividad fibrinolítica (0). Lote aterogénico. Grupo de cinco meses.

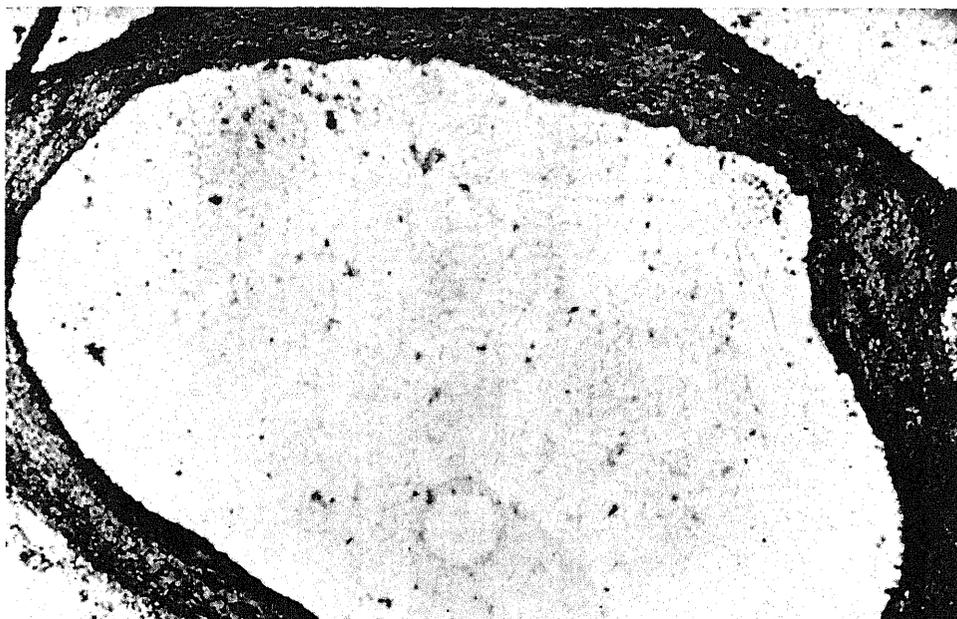
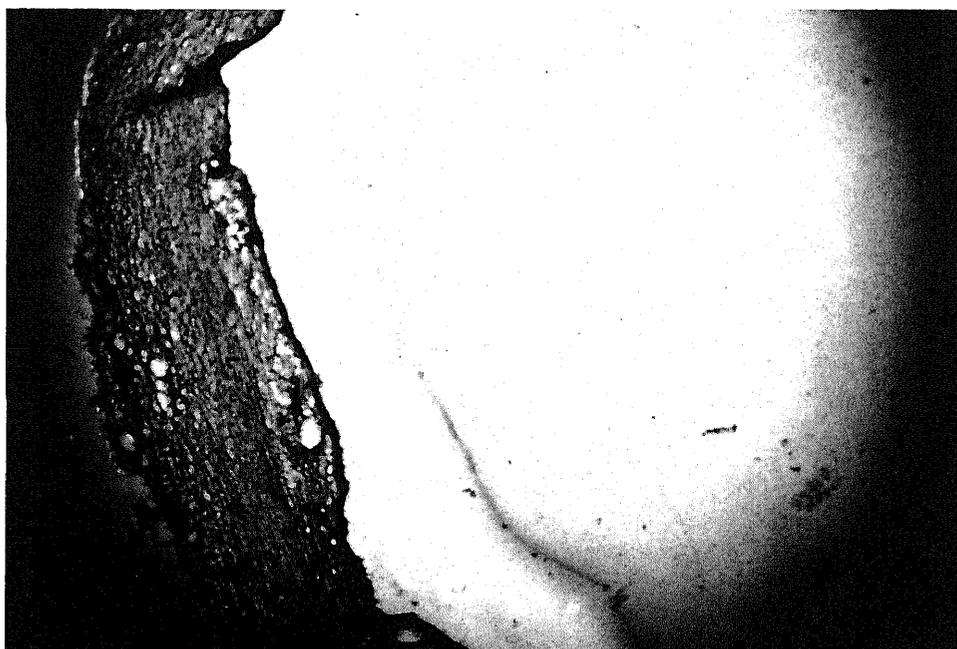


Fig. 36: Cayado aórtico (TD). Zona de lisis por actividad fibrinolítica intensa (+++). Lote control. Grupo de cinco meses.



2. Grupo de 18 meses

La actividad fibrinolítica determinada en el tercio distal del cayado aórtico del grupo de animales de 18 meses es manifiesta y en ningún caso se pudo constatar su ausencia: en cinco casos la actividad fibrinolítica es moderada y se valora con (+), en nueve casos su intensidad es media y se valora con (++) (Fig. 37) y en el resto la actividad fibrinolítica es intensa y se valora con (+++) (Fig. 38). Cuadro 10. Gráfica 11.

Cuadro 10 y Gráfica 11: Actividad fibrinolítica en cayado aórtico. Grupo de 18 meses.

Casos G. 18 meses

1	+++
2	+
3	+++
4	+++
5	+++
6	+++
7	++
8	++
9	++
10	+++
11	++
12	+
13	++
14	+++
15	+++
16	+++
17	+++
18	+++
19	+
20	++
21	+
22	++
23	+++
24	++
25	++
26	+++
27	+++
28	+
29	+++
30	+++

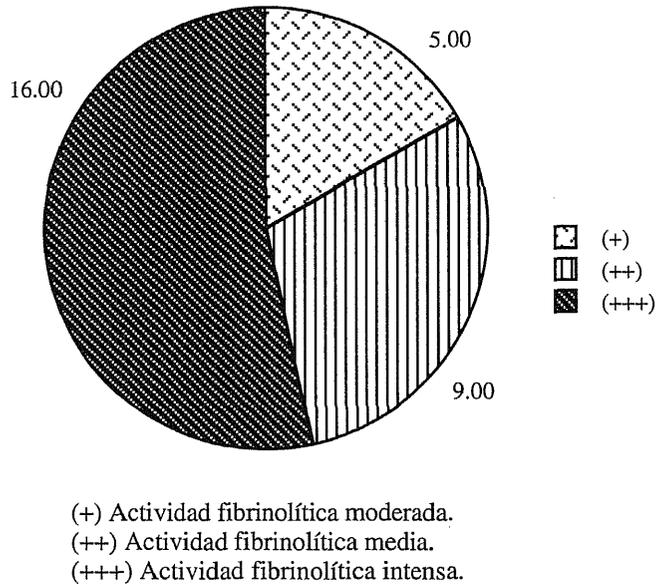


Fig. 37: Cayado aórtico (TD). Zona de lisis por actividad fibrinolítica media (++). Grupo de 18 meses sin lesiones.

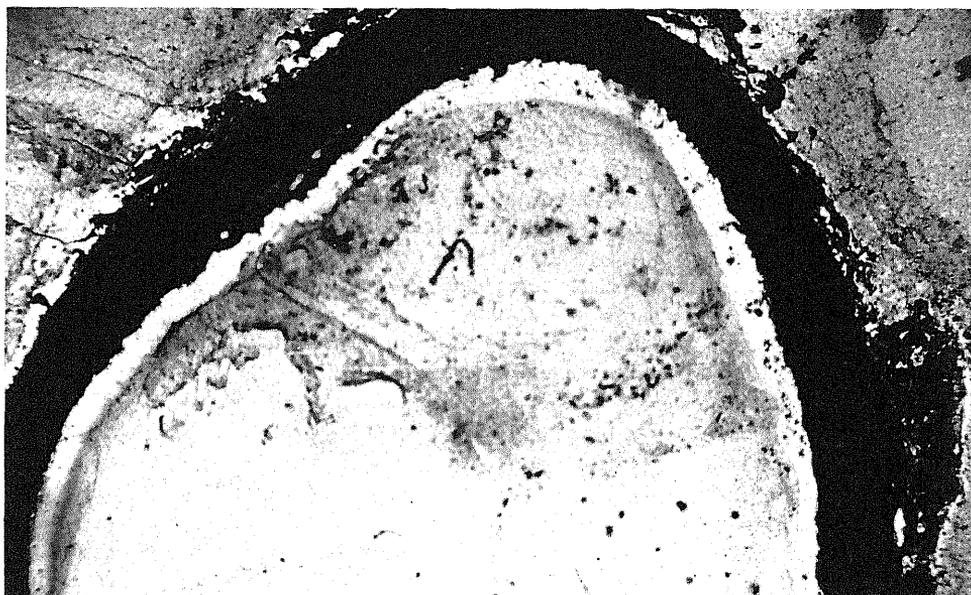
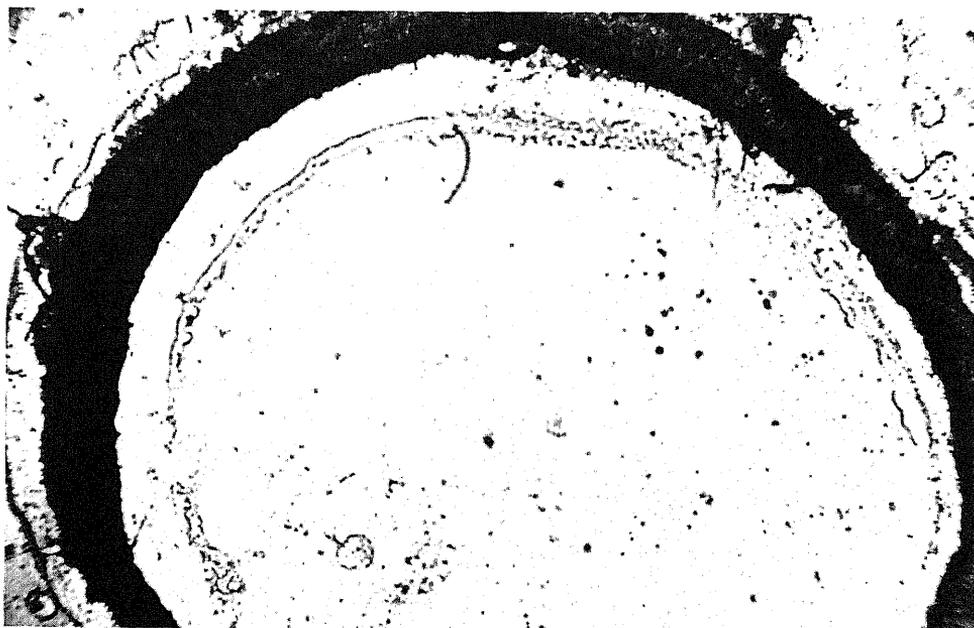


Fig. 38: Cayado aórtico (TD). Zona de lisis por actividad fibrinolítica intensa (+++). Grupo de 18 meses sin lesiones.



Correlación entre la actividad fibrinolítica y la liberación de 6-Oxo-PGF1a

1. Grupo de 5 meses

En el cuadro 11 se refleja la actividad fibrinolítica y la producción de 6-oxo-PGF1a correspondiente a 19 casos del lote control sin lesiones cuyos valores se representan en la gráfica 12; el cuadro 12, representado en la gráfica 13, contiene los valores de las mismas variables referidos a cinco casos del lote control con lesiones. Se observa en líneas generales el predominio de una actividad fibrinolítica en la pared vascular de intensidad media (++) y moderada (+) en los animales sin lesiones y media (++) e intensa (+++) en los animales con lesiones, no existiendo diferencias significativas en la producción del metabolito 6-oxo-PGF1a entre los valores medios de ambos lotes. Los animales con lesiones muestran un paralelismo entre el aumento del grado de la lesión y la disminución de la liberación del metabolito de la prostaciclina que no aparece en los animales sin lesiones; no obstante estos resultados no se han valorado estadísticamente debido al reducido número de elementos que constituyen esta muestra.

Los cuadros 13 y 14 muestran la correlación entre actividad fibrinolítica y producción de 6-oxo-PGF1a referida al lote con dieta aterogénica, constituido por 14 casos sin lesiones ateroescleróticas y 10 casos con lesiones, y sus valores se representan en las gráficas 14 y 15 respectivamente. No se observan diferencias en la intensidad de la actividad fibrinolítica entre los animales sin y con lesiones, siendo predominantemente moderada (+) en ambos casos y no existen tampoco diferencias significativas en su producción media del 6-oxo-PGF1a. En todos los casos de este lote se observa que al incrementar el grado de la lesión disminuye la producción del metabolito de la prostaciclina y tampoco en este caso se han valorado estadísticamente estos resultados por el reducido número de elementos que forman la muestra.

*Cuadro 11 y Gráfica 12: Correlación actividad fibrinolítica / 6-Oxo-PGF1a.
Lote Control. Sin lesiones.*

Casos	Act. fibrinol. (+) (++) (+++)	6-Oxo-PGF1a (pg/ml/mg/3min)
1	+	246.25
2	+	338.46
3	+	194.10
4	+	233.88
5	+	210.74
6	+	240.93
7	+	142.50

$$\bar{x} = 229.551$$

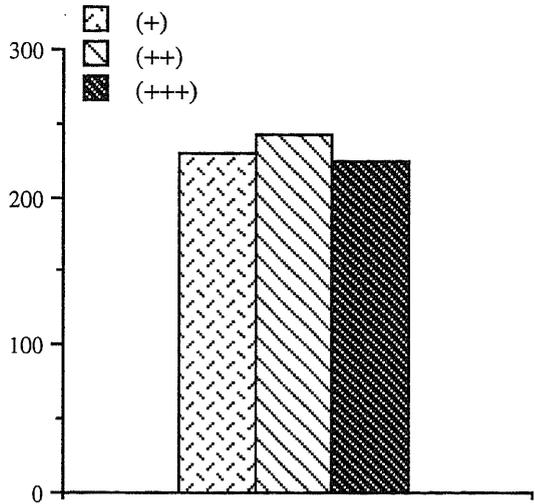
Casos Act. fibrinol. 6-Oxo-PGF1a
(+) (++) (+++) (pg/ml/mg/3min)

1	++	319.67
2	++	219.40
3	++	258.62
4	++	216.66
5	++	271.81
6	++	240.00
7	++	209.00
8	++	216.41
9	++	230.00
10	++	250.62

$\bar{x} = 243.219$

1	+++	230.00
2	+++	250.62

$\bar{x} = 224.150$



Cuadro 12 y Gráfica 13: Correlación actividad fibrinolítica / 6-Oxo-PGF1a.
Lote Control. Con lesiones.

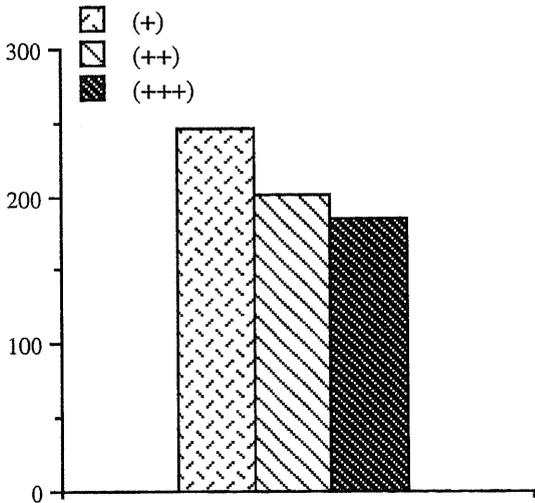
Casos Act. fibrinol. 6-Oxo-PGF1a
(+) (++) (+++) (pg/ml/mg/3min)

1	+	246.93
1	++	206.25
2	++	197.30

$\bar{x} = 201.775$

1	+++	182.35
2	+++	187.50

$\bar{x} = 184.925$



Cuadro 13 y Gráfica 14: Correlación actividad fibrinolítica / 6-Oxo-PGF1a.
Lote Aterog. Sin lesiones.

Casos Act. fibrinol. 6-Oxo-PGF1a
(+) (++) (+++) (pg/ml/mg/3min)

1	0	127.40
2	0	97.60
3	0	190.67

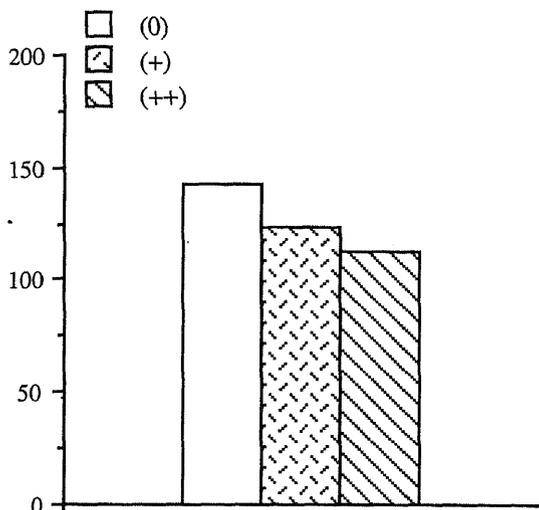
$\bar{x} = 138.557$

1	+	116.41
2	+	146.93
3	+	211.26
4	+	63.15
5	+	138.46
6	+	110.60
7	+	115.00

$\bar{x} = 128.830$

1	++	96.17
2	++	130.15
3	++	120.90
4	++	125.70

$\bar{x} = 118.230$



Cuadro 14 y Gráfica 15: Correlación actividad fibrinolítica / 6-Oxo-PGF1a.
Lote Aterog. Con lesiones.

Casos Act. fibrinol. 6-Oxo-PGF1a
(+) (++) (+++) (pg/ml/mg/3min)

1	0	190.90
2	0	95.00

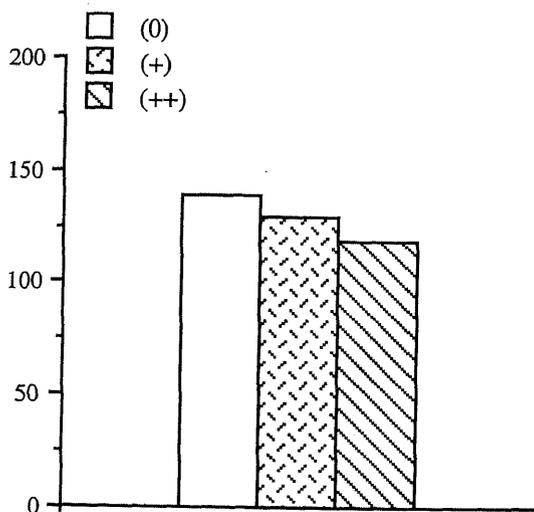
$\bar{x} = 142.950$

1	+	142.50
2	+	130.50
3	+	113.44
4	+	125.80
5	+	98.36
6	+	126.60

$\bar{x} = 122.867$

1	++	147.27
2	++	77.30

$\bar{x} = 112.285$

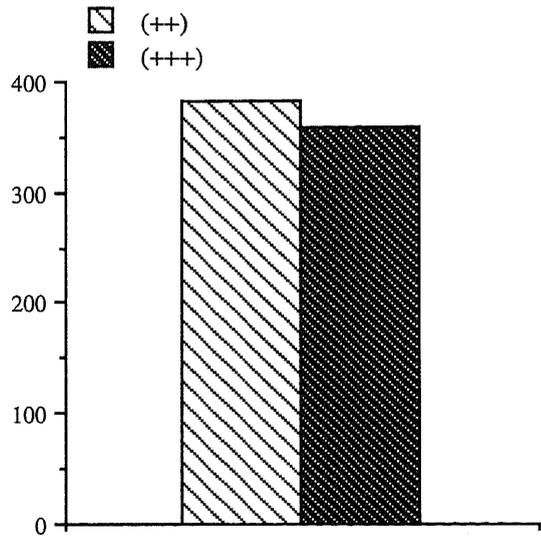


2. Grupo de 18 meses

En los cuadros 15 y 16 se refleja la correspondencia entre la actividad fibrinolítica y la liberación de 6-oxo-PGF1a en los animales sin (12 casos) y con lesiones (12 casos) histológicas y sus valores se representan en las gráficas 16 y 17 respectivamente. Se observa que la actividad fibrinolítica es muy semejante predominando la de gran intensidad (+++), sin existir diferencias significativas entre sus valores medios de producción de 6-oxo-PGF1a. En los animales sin lesiones se aprecia que al aumentar la intensidad de la actividad fibrinolítica disminuye la liberación del metabolito de la prostaciclina, mientras que en los animales con lesiones sucede lo contrario. No se ha podido estudiar la significación estadística de esta observación debido al escaso número de elementos que constituyen ambos subgrupos.

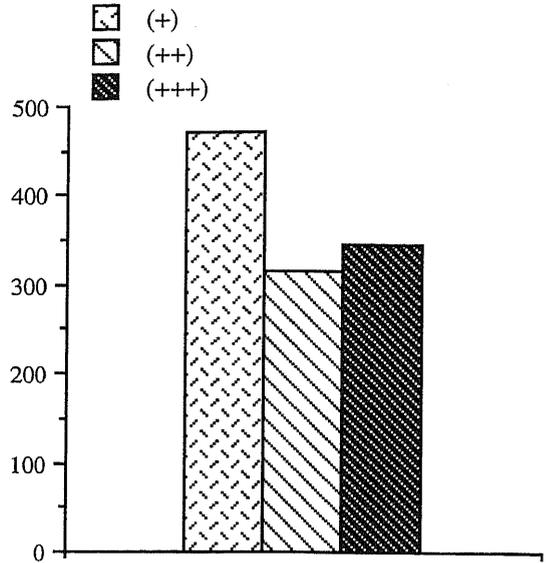
Cuadro 15 y Gráfica 16: Correlación actividad fibrinolítica / 6-Oxo-PGF1a. Grupo 18 meses. Sin lesiones.

Casos	Act. fibrinol. (+) (++) (+++)	6-Oxo-PGF1a (pg/ml/mg/3min)
1	++	368.75
2	++	446.25
3	++	463.20
4	++	250.50
		$\bar{x} = 382.175$
1	+++	425.40
2	+++	381.05
3	+++	411.20
4	+++	294.30
5	+++	363.10
6	+++	317.60
7	+++	328.50
8	+++	350.00
		$\bar{x} = 358.894$



*Cuadro 16 y Gráfica 17: Correlación actividad fibrinolítica / 6-Oxo-PGF1a.
Grupo 18 meses. Con lesiones.*

Casos	Act. fibrinol. (+) (++) (+++)	6-Oxo-PGF1a (pg/ml/mg/3min)
1	+	470.60
1	++	258.80
2	++	475.20
3	++	342.20
4	++	187.00
5	++	307.80
		$\bar{x} = 314.200$
1	+++	380.10
2	+++	344.15
3	+++	459.25
4	+++	456.10
5	+++	250.50
6	+++	184.50
		$\bar{x} = 345.767$



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Análisis de la incidencia y características de las lesiones ateroscleróticas en el cayado aórtico del grupo de conejos de 5 meses de experimentación

La composición topográfica de las arterias aórticas extraídas para este estudio se lleva a cabo mediante la valoración con microscopía óptica de cortes sucesivos de los diferentes segmentos en los que se dividen y permite conocer con bastante exactitud la incidencia y características de las lesiones ateroscleróticas que contienen, ya que con esta metodología se realiza un barrido de toda la arteria.

Se observa una incidencia de aparición de lesiones de un 16.6 por cien en el lote control y de un 50 por cien en el lote con dieta aterogénica y a pesar de esta diferencia porcentual el estudio anatomopatológico refleja en ambos lotes el mismo grado de desarrollo, lesiones avanzadas (++) y muy evolucionadas (+++), al margen de la gran infiltración grasa intra y extracelular que se aprecia en el lote sometido a dieta aterogénica como consecuencia del aumento del colesterol sanguíneo. En el lote control la tinción de grasas muestra su difuminación por las diferentes capas de la pared vascular, sin que en ningún momento se detecten depósitos significativos. Los valores del colesterol en sangre se elevan significativamente en todos los animales sometidos a sobrecarga del mismo en la dieta durante tres meses, en comparación con los valores obtenidos en el lote control transcurrido el mismo periodo de tiempo.

Las características anatomopatológicas de las lesiones son muy diferentes en ambos lotes de conejos. En el lote control las lesiones se concentran en cayado aórtico sin encontrarse en aorta torácica ni abdominal y su estructura corresponde en su totalidad al tipo fibroelástico, que conserva en general el endotelio y mantiene la superficie endotelial uniforme, sin hallarse lesiones del tipo de estrías grasas. En los animales que recibieron una dieta aterogénica las lesiones ocupan una gran extensión en el cayado aórtico, donde se localizan principalmente y en menor cuantía en aorta torácica, existiendo una gran superficie infiltrada por grasa; es muy frecuente el desprendimiento endotelial dejando al descubierto el espacio subendotelial, característica muy importante que suele ir seguida del depósito de plaquetas y formación de trombos murales, imagen difícil de observar en el lote sin suplemento de colesterol.

El estudio de las preparaciones aórticas de ambos lotes refleja la existencia de marcadas diferencias, siendo uno de los aspectos más significativos el referente a la célula endotelial. En el lote control se conserva el endotelio vascular, aunque en algunas lesiones existe un claro despegamiento sin pérdida del mismo o incluso desnudación como consecuencia del edema subendotelial. El lote con suplemento de colesterol se caracteriza por la existencia de una alteración endotelial en la que puede encontrarse desde una gran tumefacción celular con manifiesta pinocitosis y edema que lo separa del subendotelio, hasta la pérdida endotelial segmentaria o generalizada que deja al descubierto las estructuras subendotelial-

les. En estas preparaciones suelen observarse agregados plaquetares en el subendotelio o incluso en la zona de la lámina elástica interna, así como trombos murales adheridos al subendotelio y perfectamente definidos que muestran los elementos plaquetares en distintos estadios de actividad.

Existen otras diferencias a considerara entre ambos lotes de animales que se ponen de manifiesto mediante el estudio ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión. En los animales sometidos al suplemento dietético de colesterol, las células musculares lisas halladas en las diferentes capas de la pared vascular muestran abundantes inclusiones grasas, que llegan a producirles alteraciones estructurales transformándolas en células miógenas y su presencia puede significar la existencia de lesiones ateroscleróticas irreversibles; acompañando a estas células se encuentran con mucha frecuencia histiocitos cargados de grasa con la clásica imagen de células espumosas. Estas características no se observan en el lote control, donde el interés se centra en el hallazgo de células endoteliales en fase de contracción o de relajamiento, situación que a nuestro entender refleja la presencia de un funcionalismo activo, actividad no frecuente en el endotelio vascular del lote con dieta aterogénica.

Análisis de la incidencia y características de las lesiones ateroscleróticas en el cayado aórtico del grupo de conejos de 18 meses de experimentación

En el grupo de experimentación de 18 meses se sigue la misma metodología para el estudio de las aortas extraídas que en el grupo de cinco meses y se observa con microscopía óptica una incidencia de lesiones ateroscleróticas de un 46.6 por cien con preferente localización en el cayado aórtico y disminución progresiva de su frecuencia de aparición conforme el estudio se aproxima al segmento aórtico distal. La comparación de esta incidencia con la observada en el lote de animales con dieta aterogénica nos muestra valores muy próximos, 46.6 y 50 por cien respectivamente, aunque el tiempo de experimentación es muy diferente, 18 y cinco meses respectivamente. Esta semejanza en las incidencias hace pensar que la administración de un complemento de colesterol en una dieta normal durante tres meses desencadena lesiones en la misma cuantía que la aparecida espontáneamente tras la administración de una dieta normal durante 18 meses.

El exámen con microscopía ordinaria de las aortas aparentemente normales que corresponden al 53.4 por cien de los animales, muestra la presencia de una histología vascular sin alteraciones que en nada se diferencia de la correspondiente al lote control sin lesiones del grupo de cinco meses. El resto de animales, 46.6 por cien, presentan lesiones evaluadas en un caso como iniciales (+), en siete casos como avanzadas (++) y en seis casos como muy evolucionadas (+++).

El estudio con microscopía óptica informa igualmente de aspectos anatomopatológicos muy variados de las lesiones de la pared vascular como lo son la existencia de despegamientos endoteliales sin denudación, engrosamiento de la capa íntima con rotura de fibras elásticas, denudación endotelial con exposición de espacios subendoteliales conteniendo algunas veces trombos murales e incluso formaciones de placas con proyección hacia la luz del vaso.

La valoración con M.E.T. de los cortes aórticos pertenecientes a los animales sin lesiones ateroscleróticas de este grupo no muestra diferencias con respecto al lote control de cinco meses, observándose una línea de células endoteliales relajadas y sin solución de continuidad o contraídas y facilitando verdaderas comunicaciones entre el lumen y las es-

estructuras subendoteliales o incluso más profundas pertenecientes a la capa elástica, alguna célula muscular lisa en las capas subendotelial y elástica y abundantes en la capa media en disposición clásica y sin presentar alteraciones. En las preparaciones con lesiones incipientes que corresponden al grado I (+), las células endoteliales pueden aparecer sin alteraciones como en el caso anterior, o con despegamiento del subendotelio segmentario. Las lesiones de grado II (++) se acompañan unas veces de células endoteliales aparentemente normales relajadas o contraídas, dejando estas últimas al descubierto zonas subendoteliales con edema que se manifiesta por la existencia de espacios carentes de estructuras histológicas, y otras veces presentan denudación endotelial y formación de trombos murales plaquetares adosados a las estructuras subendoteliales que quedan al descubierto, en cuya composición se pueden observar plaquetas en distintos estadios de actividad y siendo menos frecuentes que en el lote con dieta aterogénica. En estas lesiones aparece un incremento de células musculares lisas en las zonas subendotelial y elástica que no muestran grandes alteraciones estructurales, a diferencia de lo que ocurre en las lesiones con dieta aterogénica. En las lesiones de grado III se observa una manifiesta presencia de células musculares lisas con grandes alteraciones morfológicas y estructurales perdiendo en ocasiones sus características; su presencia no se limita a la capa media visualizándose también en gran número en las zonas subendotelial y elástica y se acompañan de grandes espacios sin estructuras histológicas que corresponden a edemas. El endotelio se puede hallar sin alteraciones recubriendo la lesión.

Especial atención requiere en este grupo de experimentación la existencia de elementos plaquetares en las diferentes capas de la pared aórtica, que contrasta con su escasa observación en los lotes control y con dieta aterogénica del grupo de cinco meses.

La presencia y morfología plaquetar difiere según se trate de preparaciones sin lesiones, con lesiones moderadas, avanzadas o muy evolucionadas. En las preparaciones sin lesiones la M.E.T. muestra elementos plaquetares en escasa cantidad con morfología redondeada, reducida granulación, poca actividad y localización preferente en el subendotelio y en menor cuantía en la lámina elástica interna y capa muscular. En las preparaciones con lesiones la presencia plaquetar es más manifiesta apareciendo con bastante regularidad en las zonas subendotelial y elástica; en la lámina elástica se pueden observar algunos acúmulos plaquetares, formados por tres o más elementos y sin pérdida de sus componentes, que constituyen nidos plaquetares; al inicio de la capa media puede aparecer alguna plaqueta cercana a las células musculares. Cuando las lesiones son más avanzadas los elementos plaquetares son más abundantes en todas las capas de la pared vascular; en el subendotelio y en la lámina elástica se observan tanto microtrombos plaquetares como algunos elementos celulares individualizados con sus granulaciones y escasa actividad; a nivel del inicio de la capa media se aprecian elementos plaquetares con formaciones pseudopódicas, lo que denota actividad, en contacto con prolongaciones protoplasmáticas de las células musculares lisas y a esta zona en la que el elemento celular plaquetar contacta con la célula muscular lisa la denominamos zona de contacto plaquetar.

Análisis de la valoración del colesterol en el grupo de experimentación de conejos de 5 meses

El estudio se lleva a cabo en los 30 animales de cada uno de los lotes que constituyen este grupo de ensayo y no se realiza en los 30 conejos del grupo de experimentación de 18 meses ya que se pretende valorar la influencia de la administración de una dieta rica en colesterol en los niveles séricos del mismo, para lo cual se determina el colesterol en el lote

alimentado con dieta aterogénica y se compara con los valores obtenidos en el lote control del mismo periodo de ensayo.

La determinación del colesterol en el suero de los lotes control y con dieta aterogénica muestra una diferencia muy significativa entre sus valores medios, debido a un marcado incremento en los animales alimentados con dieta aterogénica.

Análisis de la determinación del 6-Oxo-PGF1a en el grupo de conejos de 5 meses

El estudio se desarrolla en 24 animales por lote ya que en los seis restantes no pudo realizarse la prueba.

Los valores de este metabolito de la PGI₂ obtenidos de los anillos de cayado aórtico, son francamente diferentes según se trató del lote control o con dieta aterogénica. Cuando se comparan los resultados globales de ambos lotes se obtiene una diferencia altamente significativa debido a una marcada disminución de la producción del metabolito en el lote sometido a dieta aterogénica.

Al analizar dentro de cada lote la producción de 6-oxo-PGF1a en función de la presencia o no de lesiones aórticas se observa que su producción es muy similar, no existiendo diferencias significativas entre ambas situaciones en ninguno de los lotes de estudio.

Análisis de la determinación del 6-Oxo-PGF1a en el grupo de conejos de 18 meses

El estudio se lleva a cabo en 24 animales de este grupo ya que en los seis restantes no se pudo determinar el metabolito.

La valoración del 6-oxo-PGF1a en los anillos de cayado aórtico del grupo de 18 meses, muestra una producción muy similar entre los animales con lesión y los que no la presentan.

Análisis comparativo de la producción de 6-Oxo-PGF1a entre el Lote Control de 5 meses y el grupo de 18 meses

La comparación entre los resultados analíticos globales obtenidos en el lote control de cinco meses y en el grupo de 18 meses de experimentación presenta una diferencia significativa en la producción del metabolito siendo mayor en el grupo de 18 meses.

Análisis del estudio de la actividad fibrinolítica del cayado aórtico en el grupo de 5 meses y comparación con la producción del metabolito 6-Oxo-PGF1a

La actividad fibrinolítica se determina en el tercio distal del cayado aórtico de todos los conejos constituyentes de este grupo, encontrándose diferencias entre el lote control y el de dieta aterogénica.

En general en el lote control hay una respuesta de actividad fibrinolítica en todas las muestras que una vez valorada abarca desde moderada a intensa. Por el contrario en el lote de conejos sometidos a una dieta aterogénica se halla una marcada disminución en la acti-

vidad fibrinolítica, observándose su ausencia en algunas muestras, siendo moderada en gran parte de ellas y en el resto la actividad fibrinolítica no llega a alcanzar la intensidad máxima del lote control.

Al comparar la actividad fibrinolítica con la producción de 6-oxo-PGF1a en los animales con y sin lesiones del lote control, se observa el predominio de una actividad fibrinolítica media (++) e intensa (+++) en los primeros y media (++) y moderada (+) en los segundos, no existiendo diferencias significativas entre la producción media del metabolito en ambos lotes. En los animales con lesiones, al aumentar la intensidad de la actividad fibrinolítica disminuye la producción del 6-oxo-PGF1a, situación que no muestran los animales sin lesiones y que no puede ser valorada estadísticamente por el reducido número de casos que la experimentan.

La misma comparación en el lote con dieta aterogénica muestra la ausencia de diferencias en la intensidad de la actividad fibrinolítica entre los animales con y sin lesiones, siendo predominantemente moderada (+) en ambos casos; no existen tampoco diferencias significativas entre su producción de 6-oxo-PGF1a y en todos los casos al aumentar la intensidad fibrinolítica disminuye el valor medio del metabolito de la prostaciclina, no siendo valorable estadísticamente esta situación por el reducido número de animales a comparar.

Análisis del estudio de la actividad fibrinolítica del cayado aórtico en el grupo de 18 meses y comparación con la producción del metabolito 6-Oxo-PGF1a

La determinación de la actividad fibrinolítica se realiza también en las muestras de todo el grupo de estudio. E general, la actividad fibrinolítica encontrada puede interpretarse como elevada ya que en gran parte de las muestras, más de la mitad, se valora como intensa (+++) y en el resto como media (++) y moderada (+) y no se constata en ningún caso su ausencia.

El valor medio obtenido del metabolito de la prostaciclina es muy superior al del lote control del grupo de experimentación de cinco meses.

Al comparar la actividad fibrinolítica con la producción de 6-oxo-PGF1a entre los animales con y sin lesiones, se observa una actividad fibrinolítica muy semejante con predominio de gran intensidad (+++), sin existir diferencias significativas entre sus valores medios de producción de 6-oxo-PGF1a. En los animales con lesiones aumenta el valor medio del metabolito de la prostaciclina al aumentar la intensidad de la actividad fibrinolítica y en los animales sin lesiones no se produce esta situación que por otro lado no resulta valorable estadísticamente por el escaso número de elementos que constituyen ambos subgrupos.

DISCUSIÓN

Aunque en algún momento se plantearon dudas acerca de la validez de la extrapolación al ser humano de los resultados obtenidos del estudio de la aterosclerosis experimental y espontánea utilizando el conejo como animal de ensayo, en la actualidad un gran número de investigadores ha llegado a la conclusión de que las lesiones observadas en estos animales se asemejan a las humanas.

El conejo fue el primer modelo animal experimental en el que se indujo la aterosclerosis con dieta grasa, ANITSCHKOW (2), IGNATOWSKI (114) y desde estos ensayos que corresponden a principio de siglo se viene utilizando hasta la actualidad para su estudio, KROON et al. (128), CANOVAS (27).

La administración de una dieta rica en colesterol en el conejo lleva consigo un marcado incremento de su concentración plasmática y en nuestro ensayo alcanza un valor máximo de 570 mg. por cien ml en este lote frente al valor máximo del 87 mg. por cien ml del lote control. Los diferentes investigadores obtienen prácticamente los mismos incrementos aunque sus valores dependen en cada ensayo de la forma en que se suministra el colesterol dietético, sólo o en combinación con otras grasas. Paralelamente a este incremento en sangre hay en general un excesivo acúmulo de colesterol en diferentes órganos, CONSTANTINIDES (48), CLARKSON et al. (40), y en particular en el interior de la capa íntima de las arterias, produciendo lesiones que predominan en cayado aórtico y aorta torácica, VERBEUREN et al. (237), contrastando con la localización más frecuente en el hombre y en algún animal que es la aorta abdominal, DUFF y MCMILLAN (67).

En nuestro ensayo con el grupo de conejos de cinco meses que durante los tres últimos fueron sometidos a una dieta rica en colesterol, se observa en general en todos los animales un marcado grado de infiltración grasa en la pared vascular de aorta, puesta de manifiesto con la técnica de Sudán III, infiltración que ha sido descrita por todos los estudiosos en cuyos modelos experimentales se incorpora el colesterol como suplemento de una dieta normal. No se ha tenido en cuenta el acúmulo de colesterol en los diferentes órganos por no ser objeto de estudio de este trabajo.

En relación con la experimentación con dieta rica en colesterol y en línea con los diferentes investigadores podemos señalar que se encuentran relevantes diferencias macroscópicas, microscópicas y ultraestructurales entre este modelo de ensayo experimental y el de evolución espontánea de lesiones ateroscleróticas (grupo de 18 meses), STEHBENS (220 y 222). En este sentido podemos adelantar que según opinión de algunos patólogos existen dos situaciones distintas: 1) infiltración y depósitos grasos y 2) aterosclerosis. Tras la administración de una dieta rica en colesterol se produce una infiltración grasa en la capa íntima con depósitos extracelulares de lípidos que no reflejaría una enfermedad aterosclerótica y sólo cuando existiera una lesión complicada acompañándola sería exacto referirse a esta patología, STEHBENS (221).

Nuestra discusión se va a basar en la interpretación de los cambios morfológicos de los diferentes componentes de la pared vascular en los dos modelos de ensayo, grupos de cinco y 18 meses, adelantando que las alteraciones observadas en sus lesiones presentan elementos concomitantes con la enfermedad aterosclerótica.

Tras la administración experimental de una dieta rica en colesterol, la grasa penetra y traspasa la capa de células endoteliales por pinocitosis como ha sido puesto de manifiesto por diferentes autores, BUCK (24), PARKER (177), POOLE y FLOREY (181). Las alteraciones histológicas que conlleva la infiltración grasa se asemejan a las lesiones estrías grasas en las que los lípidos se localizan en el interior de los macrófagos adquiriendo la clásica estructura de célula espumosa; además se encuentran lípidos en los espacios extracelulares en mayor o menor cantidad en función del tiempo y régimen de administración del colesterol, CLAIR (39), VERBEUREN et al. (237), JACOB (117), GENDRE (91), RODMAN et al. (186), KRUTH (129), FALCONE et al. (76), ESCOLAR et al. (73), PARSONS y SUBJECK (178). En las preparaciones de los animales con dieta aterogénica de nuestro estudio, son muy frecuentes las imágenes de células espumosas en toda la capa íntima y los depósitos de grasa extracelular que delimitan la lámina elástica sin sobrepasarla.

En el lote control no se observa infiltración grasa pero sí una difuminación de la misma poco intensa por las diferentes capas de la pared vascular, incluyendo las zonas con lesiones ateroscleróticas. Las lesiones corresponden al tipo fibroelástico y se caracterizan por rotura de fibras elásticas, infiltración mononuclear y de células musculares lisas y las lesiones más evolucionadas por contener algún depósito cálcico. Tanto en el modelo experimental con dieta rica en colesterol y lesiones manifiestas como en el lote control con lesiones, existe una gran proliferación de la capa íntima que es independiente de la infiltración grasa, hecho ya indicado por algunos investigadores, CLOWES et al. (44), CLOWES et al. (45), KARNOVSKY et al. (122), MOVAT et al. (160).

Una imagen histológica semejante a la del lote control la observamos en el grupo de animales sacrificados a los 18 meses de vida, ya que en sus preparaciones aórticas no se aprecia infiltración grasa ni células con las características de las espumosas y sí la presencia de grasa muy difuminada por la pared vascular incluidas las lesiones ateroscleróticas. Estos animales han sido alimentados durante todo el tiempo de experimentación con un régimen normal a base de pienso granulado comercial sin aporte de un suplemento de colesterol.

El estudio de las lesiones ateroscleróticas con microscopía óptica se ha centrado principalmente en la capa íntima de la arteria aorta, aunque sin olvidar las capas más profundas, elástica y muscular lisa.

En el lote de conejos de cinco meses sometidos a una dieta rica en colesterol, observamos una incidencia de lesiones de un 50 por cien a diferencia de la encontrada en el lote control de un 16.6 por cien, aunque en ambos casos pertenecen a los grados medio (++) y muy evolucionado (+++).

En las lesiones de las preparaciones del grupo con dieta aterogénica, se observa con M.E.T. la existencia de profundas alteraciones morfológicas en la capa endotelial. Existe una tumefacción con gran actividad pinocitaria, mecanismo de transporte de la grasa que facilita su infiltración en la pared vascular, PARKER (177), POOLE y FLOREY (181), LÓPEZ-CAMPOS et al. (139); también aparece un gran edema que despega el endotelio de la zona subendotelial llegando a denudarlo, visualizándose con gran frecuencia en las zonas denudadas trombos murales mixtos formados por quilomicrones y plaquetas, y esta

denudación endotelial reflejaría la injuria vascular provocada por la grasa corroborando la hipótesis de ROSS (189), ROSS y GLOMSET (193) y los hallazgos de DUGUID (69).

En la zona subendotelial se observan células espumosas que son histiocitos con vacuolas lipídicas conteniendo inclusiones laminares que forman figuras mielínicas; también se encuentran abundantes células musculares lisas con profundas alteraciones estructurales perdiendo a veces su morfología debido a la gran infiltración lipídica que contienen y que les confiere el aspecto de células miógenas, células específicas de la lesión aterosclerótica según el criterio de MORE et al. (159); en las lesiones muy evolucionadas e irreversibles aparecen abundantes fibras elásticas fragmentadas por la acción de las células musculares lisas muy alteradas, criterio ya señalado por LÓPEZ-CAMPOS et al. (139). Las características que observamos en las lesiones ateroscleróticas, son concordantes con las descritas por otros estudiosos cuando emplean procedimientos semejantes y utilizan el conejo como animal de experimentación, RODMAN et al. (186), LÓPEZ-CAMPOS et al. (139), o la rata, CLOWES et al. (44), CLOWES et al. (45), DAVIES et al. (59), GOODE et al. (97).

Requiere especial atención la presencia de microtrombos murales plaquetares tanto a nivel de las zonas denudadas del endotelio de la pared arterial como incluso adheridos a las propias células endoteliales, fenómeno este último muy interesante por ir en contra de una de las propiedades biológicas de la célula endotelial, su tromborresistencia. En las lesiones de evolución espontánea la escasa frecuencia de aparición de trombos murales contrasta con la abundante presencia de elementos plaquetares en el interior de las estructuras de la pared vascular, situación esta última poco frecuente en los lotes control y con dieta aterogénica del grupo de cinco meses.

Desde hace muchas décadas se acepta que el microtrombo mural es una estructura muy importante en la progresión de la lesión aterosclerótica, aunque en contra de este criterio algunos autores opinan que representa la lesión inicial de la aterosclerosis, HAUST (109), HAUST (110), CHANDLER y POPE (34).

En nuestro modelo experimental con dieta rica en colesterol es muy frecuente la presencia de microtrombos murales, adheridos tanto a zonas endoteliales denudadas y con lesiones más o menos avanzadas como a las propias células endoteliales y esta última situación nos hace pensar que las células endoteliales se encuentran funcionalmente alteradas. Los microtrombos murales han sido observados en lesiones de diferente grado de evolución de arterias humanas (aorta, coronarias, renales y testiculares), en todas las edades incluyendo a jóvenes y también en experimentación animal, HAUST (109), GEISSNER et al. (90), LÓPEZ CAMPOS et al. (139), VESSELINOVITCH et al. (239).

En nuestras preparaciones hemos observado microtrombos murales de diferente tamaño y composición adheridos a las estructuras subendoteliales por un número de seis a ocho plaquetas, con degranulación de las más cercanas a la pared y conservación de las subunidades granulares en las más alejadas. Las plaquetas que constituyen el agregado proyectan pseudópodos que se introducen entre los elementos celulares vecinos. Reforzando estos microtrombos es frecuente encontrar redes de fibrina. También hemos visualizado microtrombos murales mixtos conteniendo hematíes, leucocitos, gotas de grasa e incluso gránulos que por sus características morfológicas corresponden a mitocondrias.

La hipótesis de la injuria vascular de ROSS (189) implica la existencia de una pérdida o denudación del endotelio o de una disfunción de la propia célula endotelial y considera que estas situaciones favorecen la atracción vascular del elemento plaquetar por un mecanismo probablemente debido a un principio termodinámico, BOYCE et al. (19), y la subsiguiente agregación de nuevas plaquetas hasta constituir el trombo mural, imagen histológica observada con frecuencia en otros modelos experimentales y conocida desde antaño,

DUGUID (68). El trombo mural tiene como característica la degranulación plaquetar y se produce en primer término en los elementos en contacto o más cercanos al subendotelio. Este fenómeno de liberación granular del trombo mural constituye la verdadera esencia de la interacción plaqueta-pared vascular, ya que entre otras sustancias liberadas en encuentra el factor de desarrollo (PDGF), LİNDE et al. (137), WITTE et al. (251), que con su acción quimiotáctica atrae a las células musculares lisas y más tarde estimula su proliferación formando la lesión aterosclerosa, ROSS et al. (191).

Nuestro modelo experimental de 18 meses muestra una alta incidencia de lesiones ateroscleróticas espontáneas (46.6 por cien) concordante con la observada por otros autores en las mismas circunstancias de ensayo, SCEBAT et al. (195), GROSGOGEAT y LENE-GRE (100). Estas lesiones estudiadas con microscopía óptica se caracterizan por un engrosamiento de la capa íntima, reacción fibromuscular, rotura de fibras elásticas, ausencia de infiltración grasa y grado de evolución variable. En general podemos decir que las lesiones pertenecen a los grados medio (++) y muy evolucionado (+++), hecho también indicado por diferentes autores, SCEBAT et al. (195), SHARK et al. (197), GAMAN et al. (87). La existencia en este grupo de ensayo de una alta incidencia de lesiones en diferente estadio de evolución, facilita el estudio de su estructura y del comportamiento plaquetar en la génesis aterosclerosa.

La valoración de las alteraciones del endotelio vascular con microscopía ordinaria sólo permite apreciar denudaciones endoteliales y microtrombos murales en algunas lesiones evolucionadas, debido a su bajo poder de resolución.

La microscopía electrónica de transmisión muestra en las preparaciones con y sin lesiones microscópicas de este grupo de ensayo, la presencia de células endoteliales unas veces en fase de relajamiento, ocupando una gran extensión y con el núcleo alargado, y otras veces contraídas, ocupando muy poco espacio y con el núcleo redondeado, dejando estas últimas verdaderas comunicaciones entre el subendotelio y la luz del vaso.

Es bien conocido que el endotelio vascular es la principal barrera de que dispone el organismo para evitar las situaciones patológicas de trombosis y aterosclerosis, entidades que producen una gran morbi-mortalidad; de ahí que esta barrera en condiciones fisiológicas sea infranqueable por los elementos celulares y permita el paso sólo a ciertas sustancias necesarias para los fenómenos fisiológicos que en cada momento se requieren, THORGEISSON y ROBERTSON (229). En ciertas condiciones como las derivadas de cambios de pH, osmolaridad, temperatura o en situaciones de anoxia, se producen aperturas de las uniones interendoteliales que ponen en contacto el espacio subendotelial con la luz del vaso, CONSTANTINIDES y ROBINSON (49), y probablemente estas aperturas son favorecidas por el factor relajante (EDRF) producido por la propia célula endotelial, MONCADA et al. (157), que además aporta una acción antiagregante importante en la relación plaqueta-pared vascular, AZUMA et al. (9).

En las preparaciones de los animales de 18 meses con lesiones ateroscleróticas, sea cual fuere su grado de evolución, se observan con frecuencia endotelios contraídos poniendo en contacto de manera manifiesta la luz del vaso con los espacios subendoteliales. Esta situación facilitará probablemente la penetración de elementos celulares plasmáticos, hecho ya observado por algunos autores, FAGGIOTO et al. (75), GERRITY (93). La existencia de esta puerta de entrada podría explicar la presencia de elementos plaquetares individualizados inmediatamente por debajo de las propias células endoteliales, en el subendotelio e incluso en capas más profundas. La presencia de antígenos plaquetares en el interior de la pared vascular se interpreta como un hecho muy importante en la formación y desarrollo de las lesiones avanzadas, ya que su presencia es manifiesta en las placas fibrosas y no se detecta en las lesiones estrictas grasas, WOLF y CARSTAIRS (253).

Es posible que el endotelio vascular contraído no sea la única puerta de entrada de los elementos plaquetares a las estructuras de la pared vascular porque hay evidencia de que a través de los vasa-vasorum, puestos de manifiesto por SONG et al. (216), además de llegar elementos nutritivos a la pared vascular se facilita la penetración de las células sanguíneas que intervendrían en la génesis ateromatosa. A este respecto DÍAZ-FLORES et al. (63 y 64) demuestran que a partir de los pericitos de los vasa-vasorum hay una proliferación mio-intimal con neoformaciones vasculares en las zonas lesionadas de la arteria, conteniendo agregados plaquetares. En esta misma línea VILLAVERDE (240), utilizando técnicas de lesiones progresivas, observa en la exploración del subendotelio y de estratos más profundos la presencia de agregados plaquetares y plaquetas aisladas entre las mallas de fibras elásticas y las células musculares lisas.

Una característica de las plaquetas individualizadas que se visualizan en el subendotelio y lámina elástica de la pared arterial, es su forma redondeada u oval sin prolongaciones protoplasmáticas y con granulaciones diseminadas en su interior, aspecto que sugiere una falta de actividad funcional. No obstante, la capacidad trombogénica de estas capas vasculares no favorece la inactividad de los elementos plaquetares que contienen ni su capacidad de migrar hacia el interior de la pared vascular desde la luz del vaso sino la situación contraria, su actividad y agregación. Una explicación biológica de esta característica observada podría encontrarse en la presencia de prostaciclina en el medio plaquetar, derivada tanto de la propia célula endotelial como de las células musculares lisas, que con su acción antiagregante produciría la situación idónea para que las plaquetas migraran inactivadas a través de las diferentes estructuras histológicas de la pared vascular y se activaran en el momento en que la síntesis de prostaciclina disminuyera. De ahí que en los cultivos de células musculares lisas procedentes de lesiones ateroscleróticas, la síntesis de prostaciclina se encuentre disminuida, LARRUE et al. (130).

Al observar los elementos plaquetares presentes en la pared vascular, encontramos bastantes diferencias entre las preparaciones de los animales con lesiones avanzadas y las que contienen lesiones incipientes, no siendo tan marcadas las diferencias entre estas últimas preparaciones y las procedentes de animales sin lesiones.

En el estudio de las preparaciones sin lesiones microscópicas, no se observan en la zona subendotelial muchos elementos plaquetares, contrastando con la zona elástica en la que el número de plaquetas aumenta considerablemente e incluso se pueden visualizar varios elementos no agregados formando lo que denominamos un nido plaquetar. Estos nidos son frecuentes en los límites de la lámina elástica con la capa media o muscular, pudiéndose observar alguna plaqueta en contacto con las células musculares lisas.

En los casos con lesiones iniciales, la presencia plaquetar es más manifiesta de tal manera que se observan elementos aislados entre los haces de fibras elásticas, siendo más frecuentes en el espacio subendotelial, así como nidos y agregados plaquetares. En el inicio de la capa muscular se encuentran con facilidad plaquetas estando alguna de ellas en contacto con las células musculares lisas.

En las lesiones avanzadas, los elementos plaquetares son muy abundantes en el espacio subendotelial así como los nidos y agregados plaquetares en la lámina elástica, encontrándose también agregados en la capa muscular junto con elementos plaquetares individualizados en contacto con las células musculares lisas.

Nuestra interpretación de la disposición plaquetar observada en las distintas capas de la pared vascular se expone a continuación.

Tras el paso de las plaquetas al subendotelio vascular a través de los espacios interendoteliales, favorecido tanto por las transitorias y repetidas contracciones y relajaciones de

las células endoteliales como por la presencia de Prostaciclina (que se encuentra aumentada incluso en los primeros estadios de la lesión aterosclerótica), las plaquetas se sitúan en la zona subendotelial. A partir de esta ubicación, se produce una migración plaquetar a través de los diferentes estratos constituyentes de la pared arterial, favorecida tanto por el efecto quimiotáctico derivado de múltiples factores mitogénicos existentes en los espacios intersticiales, DAVIES (58), WALKER et al. (242), como por la acción de la prostaciclina, LARRUE et al. (130). Esta migración plaquetar se lleva a cabo por igual mecanismo cuando la puerta de entrada de los elementos plaquetares a la pared vascular se localiza en los vasa-vasorum.

De esta forma, las plaquetas llegan hasta la zona de la capa elástica relacionada con el inicio de la capa muscular lisa, lugar donde se observan con cierta frecuencia nidos plaquetares. A esta zona de ubicación de las plaquetas la denominamos zona de contacto plaquetar y de ella parten las plaquetas tanto por su acción quimiotáctica como por la de las propias células musculares lisas, para contactar con estas últimas células (contacto plaqueta-célula muscular lisa) y comenzar su migración hacia la capa íntima. Esta interpretación nos sugiere que la penetración, migración y contacto plaquetar constituyen otro mecanismo en la génesis aterosclerosa espontánea.

En los últimos 15 años se ha estudiado con gran interés la producción en la pared vascular de una prostaglandina inestable conocida como prostaciclina (PGI₂), con acción vasodilatadora y gran actividad antiagregante plaquetar, MONCADA et al. (155).

La prostaciclina se considera en la actualidad como una sustancia clave en el inicio de la trombosis y aterosclerosis. Además de su actividad antitrombótica (antiagregante plaquetar), diferentes trabajos informan acerca de su producción en las lesiones ateroscleróticas. Después del descubrimiento de su formación en la aorta de conejo, MONCADA et al. (153), se ha demostrado que diferentes arterias de otros animales la generan también, SINZINGER et al. (205).

Son bien conocidas las diferencias existentes entre distintas especies en su susceptibilidad a padecer aterosclerosis. También se ha estudiado la diferente producción de PGI₂ en sus arterias, tratando de establecer relación entre este hecho y su diferente predisposición al desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. La liberación de PGI₂ varía según se trate del hombre o de los animales, de tal forma que en el humano su liberación es mayor en las venas que en las arterias, en la oveja y el cobaya es similar en ambos tipos de vasos y en el conejo y la rata sucede lo contrario al hombre detectándose mayor actividad en las arterias, hecho mucho más marcado en la rata, SINZINGER et al. (205), sin encontrarse diferencias entre sus segmentos aórticos, torácico y abdominal, NAVARRO Y VILLAVERDE (163), NAVARRO et al. (164), siendo más resistente que el conejo a padecer aterosclerosis, TSCHOPP y BAUMGARTNER (235). De estos resultados se deduce que una gran producción arterial de PGI₂ se asocia a una menor susceptibilidad de padecer la enfermedad aterosclerótica y viceversa.

La producción de PGI₂ tanto en el hombre como en la rata o el conejo tiene lugar no sólo en la célula endotelial sino también en la capa íntima y en las células musculares lisas, aunque desciende al alejarse del endotelio, MONCADA et al. (156), LARRUE et al. (130).

Por su efecto antiagregante se ha considerado a la prostaciclina como uno de los mecanismos fisiológicos que intervienen en la regulación de la interacción de las plaquetas con la pared arterial, GRYGLEWSKI et al. (102), y en la fisiopatología de la trombosis y aterosclerosis, MONCADA et al. (154), GRYGLEWSKI et al. (103).

En nuestro trabajo experimental se ha estudiado la liberación de la prostaciclina en forma de su metabolito 6-oxo-PGF1a, tanto en el modelo de cinco meses como en el grupo de animales con una supervivencia de 18 meses, mediante su cuantificación por RIA en el sobrenadante de incubación de un anillo del tercio proximal del cayado aórtico, técnica fiable y de uso muy frecuente en ensayos experimentales. Además, estos modelos nos ofrecen la posibilidad de obtener la incidencia de lesiones y por tanto de estudiar la correlación existente entre la liberación de PGI2 y la enfermedad aterosclerótica, ya que se ha invocado que dicho proceso se debe a un déficit de PGI2, MONCADA et al. (156), GRYGLEWSKI et al. (102).

MONCADA et al.(154) y GRYGLEWSKI et al. (102) fueron los primeros en señalar la importancia de la prostaciclina en la génesis ateromatosa. Posteriormente D'ANGELO et al. (56) observan una menor producción de PGI2 en el tejido vascular aterosclerótico humano; SINZINGER et al. (206) hallan en diferentes tipos de lesiones ateroscleróticas una significativa disminución en la producción de prostaciclina, interpretando que este hecho podría ser la principal causa en la iniciación y progresión de la aterosclerosis, SINZINGER et al. (208); finalmente GRYGLEWSKI y SZCZEKLIDK (103) definen la aterosclerosis como una deficiencia de PGI2.

En el grupo de 5 meses la determinación de 6-oxo-PGF1a ofrece resultados diferentes según se trate del lote control o con dieta rica en colesterol. En el lote con dieta aterogénica observamos una marcada disminución en la liberación del metabolito con respecto al lote control, siendo esta disminución altamente significativa. El estudio de su liberación dentro de cada lote muestra que no hay diferencias entre los animales con y sin lesiones ateroscleróticas. Estos resultados nos hacen sospechar la existencia de una íntima relación entre la infiltración grasa y la liberación o síntesis de la prostaciclina, concordando estos resultados con los hallados por otros investigadores, ELDOR et al. (70), que tras la administración de una dieta rica en colesterol observan una disminución de la producción de PGI2 en consonancia con la hipercolesterolemia, sugiriendo que el efecto inhibitorio de la hipercolesterolemia sobre la producción de PGI2 es muy rápido afectando tanto a las células musculares lisas como a las células endoteliales.

La disminución de la producción de PGI2 tras la administración de una dieta rica en colesterol está estrechamente ligada al proceso bioquímico que se produce como consecuencia de la hiperlipemia, BRETCHER y RAFF (21), GOLSTEIN et al. (96), GOLSTEIN y BROWN (95). La hiperlipemia produce una alteración en la célula endotelial con un descenso en la producción de la PGI2, HENRIKSEN et al. (111), NORDOY et al. (172) ROSS y HARKER (192), que se recupera con la normalización del colesterol plasmático y de la función endotelial, ELDOR et al. (70).

El análisis bioquímico de la aorta de conejo alterada tras la administración de una dieta rica en colesterol muestra acúmulos de colesterol libre y en su forma esterificada, mientras que en el caso de una aorta no alterada aparece exclusivamente en su forma libre. Este hecho nos hace pensar que la PGI2 interviene de forma directa en el metabolismo lipídico de la pared vascular, lo que se demuestra tras la alteración endotelial en conejos normocolesterolémicos con un cateter, donde se produce un incremento significativo de colesterol esterificado en la zona reendotelizada, FALCONE et al. (76). Además, la producción de PGI2 se inhibe específicamente tras el acúmulo en la célula endotelial de los ácidos grasos linoleico y oleico en sus formas libre y esterificada, SPECTOR et al. (218).

Resultados diferentes encontramos en el grupo de conejos de 18 meses de experimentación al valorar su producción de PGI2, ya que en este grupo observamos un marcado incremento en la liberación de PGI2 que es altamente significativo cuando se compara con la PGI2 del lote control de cinco meses. Al estudiar dentro de este grupo la

liberación de PGI₂ en los animales con y sin lesiones no se obtiene una diferencia significativa aunque existe un ligero incremento en los primeros.

En algunas condiciones experimentales, incluyendo modelos con dieta aterogénica, diferentes investigadores han obtenido valores normales e incluso incrementos en la producción de PGI₂, ya que las lesiones ateroscleróticas no siempre se asocian a una reducción de la misma. GRYGLEWSKI et al. (102) observan, tras cinco meses de administración a conejos de una dieta aterogénica, un incremento de PGI₂ interpretándolo como un fenómeno de rebote; TREMOLI et al. (234) observan con el mismo modelo un marcado incremento; DONATI et al. (66) encuentran en ratas el mismo incremento en las lesiones iniciales; estos mismos resultados en ratas son hallados por NAVARRO y VILLAVERDE (162); LASIERRA et al. (131) hallan valores normales de PGI₂ en lesiones ateromatosas de gran extensión y SINZINGER et al. (206) observan también incrementos de prostaciclina y lo interpretan como una reacción compensatoria al daño de la pared vascular con el fin de retrasar la evolución de las lesiones. A pesar de estas interpretaciones y resultados, el incremento de producción de PGI₂ en las lesiones aterosclerosas introduce un interrogante en el papel de esta sustancia en la génesis aterosclerosa y lo más probable es que este incremento se encuentre íntimamente relacionado con la hiperplasia celular que se produce en las zonas alteradas, BADIMON et al. (10), ya que la capacidad de generarse PGI₂ en las zonas hiperplásicas está ligada a las células musculares lisas activas, SINZINGER et al. (206), que aparecen en los primeros estadios de las lesiones experimentales y humanas, FEIGL et al. (77).

Por lo expuesto y haciendo un síntesis del papel que desarrolla la Prostaciclina podemos pensar que: 1) en la patogenia de la aterosclerosis su producción está en íntima conexión con el metabolismo de las grasas, 2) tiene un papel primordial en la relación plaqueta-pared vascular y 3) probablemente interviene en el interior de la pared vascular participando en el mecanismo de relación de las plaquetas con las células musculares lisas.

La imbricación del mecanismo fibrinolítico en la génesis aterosclerótica parte de los criterios de ASTRUP (5), que defiende la hipótesis trombogénica de DUGUID (68) sustentada en la teoría de ROKITANSKY (187). Esta teoría se basa en la continua formación y disolución de pequeñas cantidades de fibrina a nivel de la pared vascular de manera que un descenso de la actividad fibrinolítica provocaría su depósito y la iniciación de las primeras etapas del desarrollo de la lesión aterosclerótica.

La relación entre aterosclerosis y mecanismo fibrinolítico sigue siendo en la actualidad motivo de duda a pesar de que los componentes del sistema fibrinolítico tienen su origen en la pared vascular, lecho específico del asentamiento del proceso, o se hallan en las lesiones aterosclerosas.

Desde el trabajo de TODD (231) sobre la localización del activador tisular del plasminógeno utilizando la técnica autográfica, modificación histológica de la placa de fibrina, se determinó su origen en las células endoteliales vasculares de venas y capilares, TODD (232), WARREN (243). No obstante, hay que resaltar que con cierta frecuencia se ha observado una aparente ausencia del activador tisular en la pared vascular arterial achacable a la presencia de un inhibidor procedente de las células musculares lisas, NOORDHOECK (169), NOORDHOECK y BRAKMAN (171), NOORDHOECK (170). La actividad fibrinolítica de la pared vascular se ha estudiado en variadas situaciones clínicas por la técnica de PANDOLFI et al. (176) y similares LASIERRA et al. (132), que son modificaciones de la técnica de TODD.

En nuestro modelo experimental de cinco meses observamos marcadas diferencias en la actividad fibrinolítica de la pared vascular. El lote control presenta una actividad fibrinolítica

tica valorada como media y a veces intensa sin observarse en ningún caso su ausencia. Por el contrario, en el lote con dieta aterogénica se aprecia una marcada disminución de su intensidad llegando en algunas muestras a ser nula. La ausencia de actividad fibrinolítica encontrada en el lote con dieta aterogénica contrasta de alguna manera con el hallazgo de SMITH y ASHALL (212), que observan en lesiones estrías grasas y en placas ateroscleróticas una elevada presencia de productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno con alta tasa de PDF, lo que hace pensar en la existencia de una hiperfibrinólisis desmesurada.

El incremento del activador tisular del plasminógeno en la capa íntima y en las lesiones ateroscleróticas de la pared arterial humana, hace pensar en un posible papel protector de este mecanismo frente a la iniciación y progresión de la aterosclerosis, ya que la disminución de la actividad fibrinolítica favorece el depósito de fibrina en la pared vascular pudiendo alterar la célula endotelial e iniciar el proceso, KADISH (119), GARDLUND et al. (88).

La relación hipofibrinólisis-aterosclerosis fue dada a conocer inicialmente por ASTRUP (6), al incorporar como factor de riesgo de la enfermedad aterosclerosa el defecto de actividad fibrinolítica, existiendo experiencia clínica que lo demuestra como a continuación se expone. D'ANGELO et al. (56) no observan actividad fibrinolítica en piezas procedentes de endoarterectomía; la diabetes y obesidad, enfermedades aterogénicas por excelencia, se acompañan de disminución en la actividad fibrinolítica debido a un incremento del inhibidor del activador tisular (PAI) y de triglicéridos, HAMSTEN et al. (106), NILSSON et al. (165), NILSSON y JOHNSON (166), JUHAN-VAGUE et al. (118), AUWERS et al. (8); las dietas ricas en lípidos producen altos niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad causando inhibición de la fibrinólisis, BANG y CLIFFTON (13), CLIFFTON y BUSCHELL (43); el tratamiento de la hiperlipemia en el hombre conduce a un aumento en la actividad fibrinolítica, ELKELES et al. (71), SIMPSON et al. (204), como consecuencia de la disminución del PAI y de los triglicéridos que se hallan en íntima correlación, HAMSTEN et al. (106), NILSSON et al. (165). Estos trabajos sugieren que la inhibición de la actividad fibrinolítica se debe al incremento del inhibidor del activador tisular, SUNDELL et al. (227) y según esta sugerencia, la marcada disminución de la actividad fibrinolítica observada en el lote de conejos con dieta aterogénica estaría relacionada con el incremento del inhibidor PAI.

Ha sido puesta de manifiesto por OGSTON (173) la existencia de una correlación negativa entre actividad fibrinolítica e hiperlipemia. En esta línea de trabajo, PADRO et al. (175) observan en hiperlipemias experimentales en ratas un incremento de actividad fibrinolítica en plasma con aumento del activador tisular en su pared arterial aórtica. Una explicación posible de las diferencias existentes con nuestros resultados podría encontrarse en el animal de experimentación empleado, pues es sabido que las ratas presentan un potencial fibrinolítico arterial muy intenso, SMOKOVITIS y BINDER (213), SMOKOVITIS et al. (215). No obstante PADRO et al. (175) encuentran actividad fibrinolítica en la pared vascular alterada de las ratas ateroscleróticas aunque menos marcada que la observada en plasma.

En el orden experimental se ha estudiado con cierto interés la influencia de los inhibidores de la fibrinólisis en la ateromatosis. A este respecto KATO (123) observa tras la administración del ácido épsilon-aminocaproico (EACA) por vía oral, un aumento de acúmulos de células espumosas en la arteria pulmonar de conejos sometidos a una dieta rica en colesterol sin cambios patológicos en aorta. Así mismo KATO et al. (124) observan un incremento del edema en la capa subendotelial de la arteria aorta y en la lámina elástica interna de la arteria pulmonar, tras la administración del ácido tranexámico (AMCHA) a conejos sometidos a dieta con y sin colesterol. Por el contrario, FRITSTH et

al. (82) no encuentran variación en la pared vascular de animales sometidos a una dieta con colesterol tras la administración de AMCHA.

Un comportamiento diferente de la actividad fibrinolítica se observa en el grupo de conejos de 18 meses de experimentación, ya que los resultados muestran un marcado incremento de la misma sin que en ningún caso se constate su ausencia, no encontrándose diferencias entre los animales con y sin lesiones.

Es uno de los últimos estudios llevados a cabo en esta línea, SMOKOVITIS et al. (215) han observado que la actividad fibrinolítica derivada del activador tisular del plasminógeno se incrementa gradualmente desde unacapa íntima normal de aorta hasta la aparición de la placa fibrosa (donde mayor actividad fibrinolítica se desarrolla), comportándose contrariamente al inhibidor de la plasmina. Estos mismos autores opinan que este incremento puede ser debido parcialmente al descenso del PAI detectado sobre todo en las placas fibrosas en relación al de la capa íntima normal. No obstante, pensamos que en el aumento de actividad del activador tisular del plasminógeno pueden participar algunos otros mecanismos íntimamente relacionados con el endotelio vascular.

Como anteriormente hemos señalado, en este modelo de experimentación de 18 meses observamos un marcado incremento en la liberación de prostaciclina achacable a la hiperplasia, hecho demostrado entre otros investigadores por BADIMON et al. (10), y un marcado incremento en la actividad fibrinolítica. Este incremento en la síntesis y liberación de la PGI₂ podría ser un factor activante del activador tisular in situ, traducándose en un aumento de la zona de lisis de la microplaca de fibrina empleada para este estudio. Ha sido demostrado por GOROG y KAVACS (98) con la técnica de perfusión y el aparato hemostatómetro un efecto trombolítico de la PGI₂ de tal manera que 0,5 ng/ml de prostaciclina tienen un efecto comparable a 50 U/ml de estreptoquinasa.

En resumen, el aumento e imbricación de los mecanismos de PGI₂ y fibrinólisis en el grupo de conejos de 18 meses, que representa desde el punto de vista biológico una edad avanzada, podría interpretarse como un sistema multiplicador de defensa contra los fenómenos trombóticos que complican las lesiones ateroscleróticas tan frecuentes a estas edades.

CONCLUSIONES

1.- El régimen alimenticio a base de una dieta rica en colesterol lleva consigo importantes alteraciones estructurales y bioquímicas en la pared vascular. La hipercolesterolemia produce en el conejo lesiones en la capa íntima de su pared vascular concordantes con las lesiones ateroscleróticas del humano.

2.- En el modelo experimental con dieta aterogénica la frecuencia de aparición de microtrombos murales plaquetares y mixtos es mayor que en los modelos sin dieta aterogénica; por el contrario son muy poco frecuentes los elementos plaquetares aislados en el interior de las estructuras de la pared vascular.

3.- La dieta aterogénica produce una marcada disminución de la liberación de la PGI₂, determinada como 6-oxo-PGF_{1a}.

4.- *La dieta aterogénica produce una marcada disminución de la actividad fibrinolítica de la pared vascular, medida por la zona de lisis observada en microplaca de fibrina.*

5.- La disminución de la liberación de la PGI₂, determinada en forma de 6-oxo-PGF_{1a}, y de la actividad fibrinolítica no es dependiente de la lesión de la pared vascular.

6.- La presencia de células endoteliales contraídas permite el contacto de la luz del vaso con estructuras subendoteliales y de la lámina elástica, facilitando el paso de elementos plaquetares al interior de la pared vascular.

7.- Los elementos plaquetares que se observan en las estructuras subendoteliales y en la lámina elástica de la pared vascular no muestran actividad funcional.

8.- Los elementos plaquetares se ponen en contacto a nivel de la capa media con las células musculares por medio de prolongaciones pseudopódicas, lo que se interpreta como un nuevo mecanismo de acción de las plaquetas en la génesis aterosclerosa.

9.- En el grupo de 18 meses, la incidencia de lesiones ateroscleróticas es la misma que en el lote de 5 meses con dieta aterogénica.

10.- En el grupo de 18 meses se observa un marcado incremento en la liberación de la PGI₂, determinada como 6-oxo-PGF_{1a}.

11.- En el grupo de 18 meses se halla un marcado incremento en la actividad fibrinolítica, medida por la zona de lisis obtenida en microplaca de fibrina.

12.- En el grupo de 18 meses se encuentra la mayor intensidad de actividad fibrinolítica, al igual que la mayor liberación del metabolito de la prostaciclina.

13.- En el grupo de 18 meses con lesiones existe un paralelismo entre el aumento de la intensidad fibrinolítica y el de la liberación del metabolito de la prostaciclina, lo que se interpreta como un mecanismo multiplicador de defensa in situ contra la formación del trombo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- ADAMS, C.W.M and BAYLISS, O.B. - Permeability of inner and outer layers of rat and rabbit aortic wall. Two new microscopic tests with trypan blue. *Atherosclerosis*. 26: 419, 1973.
- 2.- ANITCHKOW, N.N. - A history of experimentation on arterial atherosclerosis in animals. In: Blumenthal HT, Ed. *Cowdry's arteriosclerosis: a survey of the problem*, 2d. Springfield, IL, Charles C Thomas pag 21, 1967.
- 3.- ANITCHKON, N and CHALATOW, S.S. - Über experimenteller cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zbl. Allg. Path.* 24: 1, 1913.
- 4.- ANTONIADES, H.N. - Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF II and separation of their reduced subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7314, 1981.
- 5.- ASTRUP, T. - The biological significance of fibrinolysis. *Lancet* 2:565, 1956.
- 6.- ASTRUP, T and PERMIN, P.M. - Fibrinolysis in the animal organism. *Nature* 159: 681, 1952.
- 7.- ASTRUP, T., ALBRECHTSEN, O.K., CLAESSEN, M and RASMUSSEN, J. - Tromboplastin and fibrinolytic activity of the human aorta. *Circulation Res*, 7: 969, 1959.
- 8.- AUWERS, J., BOUILLON, R., COLLEN, D. and GEBOERS, J. - Tissue-type plasminogen activator inhibitor in diabetes mellitus. *Arteriosclerosis*, 8: 68, 1988.
- 9.- AZUMA, H., ISHIKAWA, M and SEKIZAKI, S. - Endothelium dependent inhibition of platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol*, 88: 411, 1986.
- 10.- BADIMON, L., BADIMON, J.J., GALVEZ, A. and FUSTER, V. - Aortic wall hyperplasia and prostacyclin production. *Tromb. Haemost.* 54: 1, 1985.
- 11.- BAILEY, C.H. - Observations on cholesterol-fed guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 13: 60, 1915.
- 12.- BALK, S.D. - Calcium as a regulator of the proliferation of normal but not transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. *Proc. Natl. Sci. USA* 68: 271, 1971.
- 13.- BANG, N.U. and CLIFFTON, E.E. - The effect of alimentary hyperlipemia on thrombolysis in vivo. *Thromb. Diath. Haemorrh*, 4: 149, 1960.
- 14.- BARNES, M.J. and MACINTYRE, D.E. - Platelet-reactivity of isolated constituent of the blood vessel wall. *Haemostasis* 8: 158, 1979.
- 15.- BEETENS, J.R., COENE, M-C., VERHEYEN, A., ZONNEKEYN, L and HERMAN, A.G.- Biphasic response of intimal prostacyclin production during the development of experimental atherosclerosis. *Prostaglandins* 32: 319, 1986.
- 16.- BEVILACQUA, M.P., POBES, J.S., COTRAN, R.S. and GIMBRONE, M.A. - Interleukin 1 (IL-1) acts upon vascular endothelium to stimulate procoagulant activity and leukocyte adhesion. *J. Cell. Biochem, Supp* 9A: 148, Abs. 1985.

- 17.- BORDIA, A., VERMA, S.K., VYAS, A.K., KHABYA, B.L., RATHORE, A.S., BHU, N and BEDI, H.K. - Effect of essential oil of onion and garlic on experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 26: 379, 1977.
- 18.- BOUNAMEAUX, Y. - L'accolement des plaquettes fibres sous-endothéliales. *Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris)*. 153: 866, 1959.
- 19.- BOYCE, J.F., WONG, P.C., SCHURCH, S and ROACH, M.R. - Rabbit arterial endothelium and subendothelium. A change in interfacial free energy that may promote initial platelet adhesion. *Circulation Research*. 53: 372, 1983.
- 20.- BRAGDON, J.H., ZELLER, J.H. and STEVENSON, J.W. - Swine and experimental atherosclerosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95: 282, 1957.
- 21.- BRETCHER, M.V. and RAFF, M.C. - Mammalian plasma membranes. *Nature* 258: 43, 1975.
- 22.- BROWSE, N.L., GRAY, L., JARRETT, P.E.M. and MORLAND, M. - Blood and vein-wall fibrinolytic activity in health and vascular disease. *Brit. Med J.* 1: 478, 1977.
- 23.- BUCHANAN, M.R., DEJANA, E., CAZENAVE, J.P., MUSTARD, J.F. and HIRSH, J. - Uncontrolled PGI-2 production by whole vessel wall segments due to thrombin generation in vivo and its prevention by heparin. *Throm. Res.* 16: 551, 1979.
- 24.- BUCK, R.C. - The fine structure of the aortic endothelial lesions in experimental cholesterol atherosclerosis of rabbits. *Amer. J. Pathol.* 34: 897, 1958.
- 25.- BUNTING, S., MONCADA, S. and VANE, J.R. - Antithrombotic properties of vascular endothelium. *Lancet*. 2: 1075, 1977.
- 26.- BURCH, G.E. - Viruses and arteriosclerosis. *Amer. Heart. J.* 7: 407, 1973.
- 27.- CANOVAS, M. - Significado de las apolipoproteinas en la aterosclerosis experimental. Tesis Doctoral. Barcelona. 1986.
- 28.- CARSTAIRS, K.C. - The identification of platelet and platelet antigens in histological sections. *J. Pathol. Bacteriol.* 90: 225, 1965.
- 29.- CHAIT, A., ROS, R., ALBERS, J. and BIERMAN, E.I. - Platelet-derived growth factor stimulates activity of low density lipoprotein receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4084, 1980.
- 30.- CHAKRABARTI, R. FEARNLY, GR., HOCKING, E.D., DELITHEOS, A., CLARKE, G.M. - Fibrinolytic activity related to age in survivors of myocardial infarction. *Lancet*. 1: 573, 1966.
- 31.- CHAKRABARTI, R., HOCKING, E.D., FEARLEY, G.R., MANN, R.D., ATTWELL, T.N. and JACKON, N. - Fibrinolytic activity and coronary artery disease. *Lancet* 1: 987, 1968.
- 32.- CHAMBERS, R and ZWEIFACH, B.W. - Capillary endothelial cement in relation to permeability. *J. Cell. Comp. Physiol.* 15: 255, 1940.
- 33.- CHAMBERS, R and ZWEIFACH, B.W. - Intercellular cement and capillary permeability. *Physiol. Rev.* 27: 436, 1947.
- 34.- CHANDLER, A.B. and POPE, J.T. - Arterial thrombosis in atherogenesis. A survey of the frequency of incorporation of thrombi into atherosclerotic plaques. In *Blood and Arterial Wall in Atherogenesis and Arterial Thrombosis*. J.G.A.J. Hautvast., R.J.J. Hermus and F. Van der Haar Eds. E.J. Brill. Leiden, The Netherlands. 1975.
- 35.- CHERNOFF, A., LEVINE, R.F. and GOODMAN, D.S. - A growth promoting activity derived from guinea pig megakaryocytes. *J. Clin Invest.* 65: 926, 1980.
- 36.- CHMIELEWSKA, J., RANBY, M and WIMAN, B. - Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasma. *Thromb Res.* 31: 427, 1983.
- 37.- CHRIST-HAZELHOF, E. and NUGTEREN, D.H. - Prostacyclin is not a circulating hormone. *Prostaglandins*. 22: 739, 1981.
- 38.- CHRISTENSEN, R.L. and MACLEOD, C.M. - A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation and reaction with inhibitors. *J. General Physiology*. 28: 559, 1945.

- 39.- CLAIR, St. R.W. - Atherosclerosis regression in animal models: Current concepts of cellular and biochemical mechanisms. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 26: 109, 1983.
- 40.- CLARKSON, T.B., LEHNER, N.D.M. and BULLOCK, B.C. - Specialized research applications. I Atherosclerosis research, in Weisbroth SH, Plattre and Klaus AI (Eds.). *The biology of the laboratory rabbit*. N.Y. Acad. Press, pg. 155, 1974.
- 41.- CLARKSON, T.B., HAMM, T.E., BULLOCK, B.C. and LEHNER, N.D.M. - Atherosclerosis in old world monkeys (Review). *Primates Med*. 9: 66, 1976.
- 42.- CLARKSON, T.B., LEHNER, N.D.M., BULLOCK, B.C., LOFLAND, H. and WAGNER, W.D. - Atherosclerosis in new world monkeys (Review). *Primates. Med*. 9: 90, 1976.
- 43.- CLIFFTON, E.E. and BUSCHELL, A.R. - Inhibition of fibrinolysis by hyperlipemia. *Thromb. Diath. Haemorrh*, 5: 463, 1961.
- 44.- CLOWES, A.W., RYAN, G.B., BRESLOW, J.L. and KARNOVSKY, M.J. - Absence of enhanced intimal thickening in the response of the carotid arterial wall to endothelial injury in hypercholesterinemic rats. *Lab. Invest*. 35: 6, 1976.
- 45.- CLOWES, A.W., BRESLOW, J.L. and KARNOVSKI, M.J. - Regression of myointimal thickening following carotid endothelial injury and spontaneous development of aortic foam cell lesion in long term hypercholesterolemic rats. *Lab. Invest*. 36 (1): 73, 1977.
- 46.- COCHRAN, B.H. REFFEL, A.C. and STILES, C.D. - Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell*. 33: 939, 1983.
- 47.- COLLEN, D and JUHAN-VAGUE, I. - Fibrinolysis and atherosclerosis. *Seminars in thrombosis and Haemostasis*. 14: 180, 1988.
- 48.- CONSTANTINIDES, P. - Experimental atherosclerosis in the rabbit, in Roberts J.C. Jr. Straus R. (Eds.). *Comparative atherosclerosis*. N.Y. Harper and Row, pg. 155, 1974.
- 49.- CONSTANTINIDES, P. and ROBINSON, M. - Ultrastructural injury of arterial endothelium. I Effects of pH, osmolarity, anoxia and temperature. *Arch. Pathol*. 88: 99, 1969.
- 50.- COPLEY, A.L. - Capillary permeability versus fragility and the significance of fibrin as a physiologic cement of the blood vessel wall. *Bibliotheca Anatomica*. 4: 3, 1964.
- 51.- COPLEY, A.L. - Capillary permeability, capillary incontinence, compaction stasis and basement membrane breakdown. *Biblioteca Anatomica*. 7: 148, 1965.
- 52.- COPLEY, A.L. - Fibrinogen, platelet and a new theory of atherogenesis. *Thromb. Res*. 14: 249, 1979.
- 53.- COPLEY, A.L. and TSULUCA, V. - The antibradykinin action of fibrinolysin and other studies on capillary permeability employing different mediators and synthetic bradykinin. *Biochem Pharmacol*. 10: 67, 1962.
- 54.- CLOPLEY, A.L., HANIG, J.P., LUCHINI, B.W. and ALLEN, R.L.Jr. - On the capillary permeability enhancing activity of isolated fibrinopeptides and their role in the physiology of the blood capillary wall. *Bibliotheca Anatomica*. 9: 475, 1967.
- 55.- DALLDORF, F.G., PATE, D.H. and LANGDELL, R.D. - Pulmonary capillary thrombosis in experimental pneumococcal septicemia. *Arch. Pathol*. 85: 149, 1968.
- 56.- D'ANGELO, V., VILLA, S., MYSLIWIEC, M., DONATI, M.B. and De GAETANO, G. - Defective fibrinolytic and prostacyclin-like activity in human atheromatous plaques. *Thrombos. and Haemostas*. 39: 535, 1978.
- 57.- DAUBER, D.V. and KATZ, L.N. - Experimental cholesterol atheromatosis in an omnivorous animal, the chick. *Arch. Pathol*. 34: 937, 1942.
- 58.- DAVIES, P.F. - Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation*. 55: 5, 1986.
- 59.- DAVIES, P.F., REIDY, M.A., GOODE, T.B. and BOWYER, D.E. - Scanning electron microscopy in the evaluation of endothelial integrity of the fatty lesion in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 25: 125, 1976.

- 60.- DEJANA, E., CAZENAVE, J.P., GROVES, H.M., KINLOUGHG-RATHBONE, R.L., RICHARSON, M., PACKHM, M.A. and MUSTARD, J.F. - The effect of aspirin inhibition of PGI₂ production on platelet adherence to normal and damage rabbit aorta. *Thromb. Res.* 17: 453, 1980.
- 61.- DEMBINSKA-KIEC, A., GRYCLEWSKA, T., ZMUDA, A and GRYGLEWSKI, R.J. - The generation of prostacyclin by arteries and by coronary vascular bed is reduced in experimental atherosclerosis in rabbits. *Prostaglandin.* 14: 1025, 1977.
- 62.- DEMUTH, F. and Von RIESEN, I. - Eiweisstoffwechsel normaler and Bosartiger Gewebe in vitro. *Biochemisches Zeitschrift.* 203: 22, 1928.
- 63.- DIAZ-FLORES, L. and DOMINGUEZ, C. - Relation between arterial intimal thickening and the vasa vasorum. *Virchows Arch (Pathol. Anat.).* 406: 165, 1985.
- 64.- DIAZ-FLORES, L., GUTIERREZ, R., VALLADARES, R. and VARELA, H. - Atherosclerosis. Lesiones básicas en la pared arterial (histogénesis). *Symposium Satélite de Arteriosclerosis. III Congreso de la S.E.T.H. Palma de Mallorca. Libro de Resúmenes.* 1987.
- 65.- DICORLETO, P.E. and de la MOTTE, C.A. - Characterization of the adhesion of the human monocytic cell line U-937 to cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 75: 1153, 1985.
- 66.- DONATI, M.B., REYERS, I. and RONCAGLIONI, M.C. - Effect of sex, age, diet and hormonal treatment on experimental arterial thrombosis in rats. *Eur. Atheroscler. Group Meeting. Capri* 1978.
- 67.- DUFF, G.L. and MCMILLAN, G.C. - Pathology of atherosclerosis. *Am. J. Med.* 11: 92, 1951.
- 68.- DUGUID, J.B. - Thrombosis as a factor in the pathogenesis of aortic atherosclerosis. *J. Pathol. Bact.* 60: 57, 1948.
- 69.- DUGUID, J.B. - Pathogenesis of arteriosclerosis. *Lancet.* 2: 925, 1949.
- 70.- ELDOR, A., FALCONE, D.J., HAJJAR, D.P., MINICK, R. and WEKSLER, B.B. - Diet induced hypercholesterolemia inhibits the recovery of prostacyclin production by injury rabbit aorta. *Ame. J. Pathol.* 107: 186, 1982.
- 71.- ELKELES, R.S., CHAKRABARTI, R., VICKERS, M., STIRLING, Y. and MEADE, T.V. - Effect of treatment of hyperlipidemia on haemostatic variables. *Br. Med. J.* 281: 973, 1980.
- 72.- ERICKSON, L.A., GINSBERG, M.H. and LOSKUTOFF, D.J. - Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelet. *J. Clin. Invest.* 74: 1465, 1984.
- 73.- ESCOLAR, G., VILLAVERDE, C.A., BASTIDA, E., NAVARRO, C. and ALMIRALL, L. - Participación de las plaquetas en la inducción y evolución de la arteriosclerosis. *Sangre* 28: 243, 1983.
- 74.- ESSIEN, E.M., CAZENAVE, J.P., MOORE, S. and MUSTARD, J.F. - Effect of heparin and thrombin on platelet adherence to the surface of rabbit aorta. *Thromb. Res.* 13: 69, 1978.
- 75.- FAGGIOTO, A., ROSS, R. and HARKER, L. - Studies in hypercholesterolemia in the normal primates. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arterosclerosis.* 4: 323, 1984.
- 76.- FALCONE, D.J., HAJJAR, D.P. and MINICK, C.R. - Enhancement of cholesterol and cholesteryl ester accumulation in reendothelialized aorta. *Am. J. Pathol.* 99: 81, 1980.
- 77.- FEIGL, W., SINZINGER, H., WARNER, O. and LEITHNER, CH. - Quantitative morphological investigations on smooth muscle cells in vascular surgical specimens and their clinical importance. *Experientia.* 31: 1352, 1975.
- 78.- FISCHER, A. - Mechanism of the proteolytic activity of malignant cells. *157: 442, 1946.*

- 79.- FRENCH, J.E. - Atherosclerosis in relation to the structure and function of the arterial intima, with special reference to the endothelium. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 5: 253, 1966.
- 80.- FRIEDMAN, M. and BYERS, S.O. - Observations concerning the evolution of atherosclerosis in the rabbit after cessation of cholesterol feeding. *Amer. J. Pathol.* 43: 349, 1963.
- 81.- FRIEDMAN, R.J., STEMERMAN, M.B., WENS, B., MOORE, S., GAULDIE, J., GENT, M., TIELL, M.L. and SPAET, T.H. - The effect of thrombocytopenia on experimental arteriosclerotic lesion formation in rabbit. *J. Clin. Invest.* 60: 1191, 1977.
- 82.- FRITSTH, H., CZYGAN, P., KOMMERELL, B. and BARTH, P. - Effect of e-aminocaproic acid and b-aminopropionitrile of the nutritional atheromatosis of the rabbit. *J. Atheroscler. Res.* 8: 811, 1968.
- 83.- FRY, D.L. - Certain chemorheological considerations regarding the blood vascular interface with particular reference to coronary artery disease. *Circulation Supplement 4 to volumes 39 and 40:* 38, 1969.
- 84.- FURCHGOTT, R.F. and ZAWADZKI, J.V. - The obligatory role of endothelium cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholina. *Nature, Lond.* 288: 373, 1980.
- 85.- FUSTER, V., BOWIE, E.J.V. and LEWIS, J.C. - The von Willebrand pig as a model for atherosclerosis research. *Thrombos and Haemos*, 38: 55, 1977.
- 86.- GAJDUSEK, C., DICORLETO, P., ROSS, R. and SCHWARTZ, S. - An endothelial cell-derived growth factor. *J. Cell. Biol.* 85: 467, 1980.
- 87.- GAMAN, E., FEIGENBAUM, A.S. and SHARK, E.A. - Spontaneous aortic lesions in rabbit. III. Incidence and genetic factors. *J. Atheroscler. Res.* 7: 131, 1967.
- 88.- GARDLUND, B., KOWALSKA-LOTH, B., GRONDAHL, N.L. and BLOMBACK, B. - Plasmic degradation products of human fibrinogen. *Throm. Res.* 1: 371, 1972.
- 89.- GAYNOR, E., BOUVIER, C.A. and SPAET, T.H. - Vascular lesions: possible pathogenetic basis of the generalized Shwartzman reaction. *Science.* 170: 986, 1970.
- 90.- GEISSINGER, H.D., MUSTARD, J.F. and ROWSELL, H.C. - The occurrence of microthrombi on the aortic endothelium of swine. *Can. Med. Ass. j.* 87: 405, 1962.
- 91.- GENDRE, P. - L'athérome cholestérique expérimental chez le lapin: observations sur le régime atherogène. *Société de Biologie de Bordeaux. Séance du 21 Décembre p.* 412, 1967.
- 92.- GERRITY, R.G., NAITO, H.K., RICARDSON, M. and SCHWARTZ, C.J. - Dietary induced atherogenesis in swine; morphology of the intima in prelesion stages. *Am. J. Pathol.* 95: 775, 1979.
- 93.- GERRITY, R.G. - The role of the monocytes in atherogenesis. Transition of blood born monocytes into foan cells in fatty lesions. *Amer. J. Pathol.* 103: 181, 1981.
- 94.- GLENN, K.C. and ROSS, R. - Human monocyte-derived growth factor(s) for mesenchimal cells: activation of secretion by endotoxin and concanavalin A (Con A). *Cell* 25: 603, 1981.
- 95.- GOLSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. - The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 897, 1977.
- 96.- GOLSTEIN, J.L., BASU, S.K. and BROWN, M.S. - Receptor mediated endocytosis of low density lipoproteins in cultured cells. *Methods Enzymol.* 98: 241, 1983.
- 97.- GOODE, T., DAVIES, P.F., REIDY, M.A. and BOWYER, D.E. - Aortic endothelial cell morphology observed in situ by scanning electron microscopy during atherogenesis in the rabbit. *Atherosclerosis.* 27, 235, 1977.
- 98.- GOROG, P. and KOVACS, I.B. - Prostacyclin is a more potent stimulator of thrombolysis than inhibitor of haemostasis. *Haemostasis.* 16: 337, 1986.
- 99.- GOSPODAROWICZ, D., BIALECKI, H. and GREENBURG, G. - Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 253: 3736, 1978.

- 100.- GROSGOGEAT, Y. et LENEGRÉ, J. - Les lésions aortiques spontanées du lapin, p. 248
In: Le rôle de la paroi artérielle dans l'athérogenèse, Paris, 1968, C.N.R.S.
- 101.- GROTENDORST, G.R., SEPPA, H., KLEINMAN, H.K. and MARTIN, G.R. - Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3669, 1981.
- 102.- GRYGLEWSKI, R.J., DEMBINSKA-KIEC., ZMUDA, A. and GRYGLEWSKA, T. - Prostacyclin and thromboxane A-2 biosynthesis capacities of heart, arteries and platelets at various stages of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 31: 385, 1978.
- 103.- GRYGLEWSKI, R. and SZCZEKLIK, A. - Prostaglandins and atherosclerosis. *Acta Therapeutica (Supp) Belgica.* 6: 37, 1980.
- 104.- HABENICH, A.J.R., GLOMSET, J.A., KING, W.C., NIST, C., MITCHELL, C.D. and ROSS, R. - Early changes in phosphatidylinositol and arachidonic acid metabolism in quiescent Swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 256: 12329, 1981.
- 105.- HAJJAR, D.P. and WEKSLER, B.B. - Metabolic activity of cholesteryl esters in aortic smooth muscle cells is altered by prostaglandins I₂ and E₂. *J. Lipid Res.* 24: 1176, 1983.
- 106.- HAMSTEN, A., WIMAN, B., DEFAIRE and BLOMBACK, M. - Increased plasma level of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 313: 1557, 1985.
- 107.- HARKER, A.L., ROSS, R. and GLOMSET, A. - The role of endothelial cell injury and platelet response in atherogenesis. *Thrombosis and Haemostas.* 39: 312, 1978.
- 108.- HARKER, L.A., SLICHTER, S.J., SCOTT, C.R. and ROSS, R. - Homocystinemia: vascular injury and arterial thrombosis, *New England J. Med.* 291: 537, 1974.
- 109.- HAUST, M.D. - The morphogenesis and fate of potential and early atherosclerotic lesions in man. *Human. Pathol.* 2: 1, 1971.
- 110.- HAUST, M.D. - The natural history of atherosclerotic lesions. In *Vascular injury and atherosclerosis.* S. Moore, Ed. Marcel Dekker. N.Y. 1981.
- 111.- HENRIKSEN, T., EVENSEN, S. A. and CARLANDER, B.A - Injury to human endothelial cells in culture induced by low density lipoproteins. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 39: 361, 1979.
- 112.- HOAK, J.C. - Platelets and Atherosclerosis. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* 14: 202, 1988.
- 113.- HUGUES, J. - Accolement des plaquettes au collagène. *Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris)*, 154: 866, 1960.
- 114.- IGNATOWSKI, A.I. - Influence of animal food on the organism of rabbits. *S-Peterb. Izviest Imp Voenno-Med. Adad.* 16: 154, 1908.
- 115.- IMAI, H., WERTHESSEN, N.T., TAYLOR, B. and LEE, K.T. - Lofland conference. Angiotoxicity and atherosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 100: 565, 1976.
- 116.- JAIN, R.C. and KONAR, S. - Effect of garlic oil in experimental cholesterol atherosclerosis. *Atherosclerosis* 29: 125, 1978.
- 117.- JACOB, A. - Athérosclérose expérimentale du lapin et régime athérogène. *Ann. Pharmaceut. Françaises.* 26: 131, 1968.
- 118.- JUHAN-VAGUE, I., VALADIER, J., ALESSI, M.C., AILLAUD, M.F., ANSALDI, J., PHILIP-JOET, C., SERRADIMIGNI, A. and COLLEN, D. - Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemostas.* 7: 67, 1987.
- 119.- KADISH, J.L. - Fibrin and atherogenesis. A hypothesis.- *Atherosclerosis* 33: 409, 1979.

- 120.- KANNEL, W.B., CASTELLI, W.P. and MEEKS, S.L. - Fibrinogen and cardio-vascular disease. 34th. Annu. Scienc Session of the American College Cardiology. Anaheim, CA, March 1985.
- 121.- KAPLAN, K.L., BROEKMAN, N.S., CHERNOFF, A., LESZNIK, G.R. and GOODMAN, D.S. - Studies of the release from human platelet of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cells. *Circul. Res.* 42: 402, 1978.
- 122.- KARNOVSKY, M.J., FISHMAN, J.A., RYAN, G.B., CLOWES, A.W., GUYTON, J.R. and ROSENBERG, R.D. - Experimental model for atherosclerosis. *Atheroma and Thrombosis*. V.V. Kakar (Edit.) London pag. 50. 1983.
- 123.- KATO, N. - Effects of epsilon aminocaproic acid on experimental atherosclerosis in rabbits. *Fukuoka Acata Med.* 58: 612, 1967.
- 124.- KATO, N., MORITMATSU, M., TANAKA, K. and HORIE, A. - Effects of trans-4-aminomethylcyclohexane carboxylic acid as an antifibrinolytic agent on arterial wall and experimental atherosclerosis lesions in rabbits. *Thromb. Diathes. haemorrh.* 24: 85, 1970.
- 125.- KNIKER, W.T. and COCHRANE, C.G. - The localization of circulating immune complexes in experimental serum sickness. The role of vasoactive amines and hydrodynamic forces. *J. Exper. Med.* 127: 119, 1968.
- 126.- KOHLER, N. and LIPTON, A. - Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp. Cell. Res.* 87: 297, 1974.
- 127.- KOTTKE, H. and SUBBIAH, J. - Pathogenesis of atherosclerosis. *Mayo. Clinic. Proc.* 53: 235, 1978.
- 128.- KROON, P.A., THOMPSON, G.M. and CHAO, Y.S. - Very low density lipoproteins in cholesterol-fed rabbits are hepatic origin. *Atherosclerosis*. 56: 323, 1985.
- 129.- KRUTH, H.S. - Filipin-positive, oil red O-negative particles in atherosclerotic lesions induced by cholesterol feeding. *Laboratory Investigation*. 50: 87, 1983.
- 130.- LARRUE, J., RIGAUD, M., DARET, D., DEMOND, J., DURAND, J. and BRICAUD, H. - Prostacyclin production by cultured smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aorta. *Nature*. 285: 480, 1980.
- 131.- LASIERRA, J., FERNÁNDEZ, A., VILADÉS, E. y VELÁZQUEZ, E. - Lesión ateromatosa experimental y liberación de PGI-2-like en distintos esquemas antiagregantes. XXIV Reunión de la Asociación Española de Hematología. Noviembre 1981. Zaragoza.
- 132.- LASIERRA, J., DíEZ, M.M., FERNÁNDEZ, A., VILADÉS, E., GIL, M., y VELÁZQUEZ, E. - Influencia de la ticlopidina y del acetil salicilato de lisina en la actividad fibrinolítica de la pared arterial en la ateromatosis experimental. *Arch. Farmacol y Toxicol.* 10: 161, 1986.
- 133.- LASIERRA, J., AZA, M.J., COLLADO. P.S., J., GONZÁLEZ, J. and ESTELLER, A. - Inhibition of fibrinolysis by cellular glutathione depletion in the rabbit. *Thromb Res.* 53: 347, 1989.
- 134.- LePOW, I.H., DIAS DA SILVA, W and PATRICK, R.A. - Biologically active cleavage products of components of complement. In: *Movat H.Z.(Ed.), Cellular and Humoral Mechanism in Anaphylaxis and Allergy*. Karger, New York, p. 237, 1969.
- 135.- LEVIN, E.G. and LOSKUTOFF, D.J. - Comparative studies of the fibrinolytic activity of cultured vascular cells. *Thromb. Res.* 15: 869, 1979.
- 136.- LIEBOVICH, S.J. and ROSS, R. - A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. *Am. J. Pathol.* 84: 501, 1976.
- 137.- LINDE, B.L., CHERNOFF, A. and KAPLAN, K.L. - Release of platelet derived growth factor from human platelets by arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 4107, 1979.
- 138.- LOBSTEIN citado por Stossel en *Wie entsteht Arteriosklerosis. Med. Klin*, 75: 10, 1946.

- 139.- LÓPEZ-CAMPOS, J.L., PIÑERO, J., LASIERRA, J., NAVAS, P., MORENO, J. y COBO, R. - Modificaciones de los mucopolisacáridos y alteraciones ultraestructurales en la ateromatosis experimental. *Rev. Clin. Esp.* 1: 15, 1982.
- 140.- LOSKUTOFF, D.J. - The fibrinolytic system of cultured endothelial cells: deciphering the balance between plasminogen activation and inhibition. *Progress in Fibrinolysis VII.* Davison, J., Donati, M.B. and Coccheri, S. (Edts.) Churchill Livingstone p. 15, 1985.
- 141.- LOSKUTOFF, D.J. and EDGINGTON, T.S. - Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 3903, 1977.
- 142.- LUFT, J.H. - Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed. Proc.* 25: 1173, 1966.
- 143.- LUGNIER, C., SCHOEFFTER, P., LE BEC, A., STROUTHOU, E. and STOCELET, J.C. - Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human bovine and rat aorta. *Biochem. Pharmacol.* 35: 1743, 1986.
- 144.- MARCHAND, D.F. - *Veber Arteriosklerose Verhand 21 Kongress Inn. Med.* 1904.
- 145.- MARTIN, T.R., ALTMAN, L.C., ALBERT, R.K. and HENDERSON, W.R. - Leukotriene B₄ production by human alveolar macrophage; a potential mechanism for amplifying inflammation in the lung. *Am. Rev. Respir.* 129: 106, 1984.
- 146.- MCGILL, H.C.Jr. - Comparison of experimentally induced animal atherosclerosis with spontaneous human atherosclerosis in: Roberts J.C.Jr. Staruss R., Cooper M.S. (Eds.): *Comparative atherosclerosis.* New York Evoston and London, Harper and Row Publidhers 1965 pp. 354.
- 147.- MCGILL, H.C.Jr. - The geographic pathology of atherosclerosis. Baltimore: Willians and Wilkins, pg. 1, 1968.
- 148.- MCGILL, H.C.Jr., MOTT, G.E. and BRAMBLETT, C.A. - Experimental atherosclerosis in the baboon (Review). *Primates Med.* 9: 41, 1976.
- 149.- MCGILL, H.C.Jr. - The pathogenesis of atherosclerosis. *Clinical. Chemistry* 33: B33, 1988.
- 150.- MCMANUS, J. and MOWRY, R. - *Técnica histológica.* Atica, S.A. Madrid 1968.
- 151.- MEADE, T.W., STRLING, Y., THOMPSON, S.G., VICKERS, M.V., WOOLF, L., AJDUKIEWICZ, A.B., STEWART, G., DAVIDSON, J.F., WALKER, I.D., DOUGLAS, A.S., RICHARDSON, I.M., WEIR, R.D., AROMAA, A., IMPRIVAARA, O., MAATELE, J. and HLADOVEC, J. - An international and interregional comparison of haemostatic variables in the study of ischemic heart disease. *Int. J. Epidemiol.* 15: 331, 1986.
- 152.- MONCADA, S. and HIGGS, E.A. - Archidonate metabolims in blood and the vessel wall. *Clin. Haematol.* 15: 273, 1986.
- 153.- MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTIN, S. and VANE, J.R. - An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 263: 663, 1976.
- 154.- MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R.J., BUNTING, S. and VANE, J.R. - A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. *Prostaglandin* 105: 715, 1976.
- 155.- MONCADA, S., HIGGS, E.A. and VANE, J.R. - Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (Prostaglandin X) a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet.* 1: 18, 1977.
- 156.- MONCADA, S., HERMAN, A.G., HIGGS, E.A. and VANE, J.R. - Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI-2) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res.* 11: 323, 1977.
- 157.- MONCADA, S., PALMER, R.M.J. and HIGGS, E.A. - Prostacyclin and endothelium-derived laxing factor: biological interactions and significance. *Thromb and Haemostas.*

Edited by Verstraete, M., Vermylen, J., Lijnen, H.R. and Arnout, J. Leuven, p. 597, 1987.

- 158.- MOORE, S., FRIEDMAN, R.J., SINGAL, P., GAULDIE, J., BLAJCHMAN, M.A. and ROBERTS, R.S. - Inhibition of injury induced thromboatherosclerotic lesions by anti-platelet serum in rabbits. *Thrombos. and Haemostas.* 35: 70, 1976.
- 159.- MORE, R., MOVAT, H.A. and UST, M.D. - Role of mural fibrin thrombi of the aorta in genesis of atherosclerosis plaques. *Arch. Path.* 63: 612, 1957.
- 160.- MOVAT, H.Z., HAUST, M.D. and MORE, R.H. - The morphological element of the early lesions of atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 35: 93, 1969.
- 161.- MUSTARD, J.F. and MURPHY, E.A. - Effect of smoking on blood coagulation and platelet survival in man. *British Medical J.* 1: 846, 1963.
- 162.- NAVARRO, C. y VILLAVERDE, C.A. - Balance prostaciclina-tromboxano en la arteriosclerosis experimental. VIII Reunión Nacional de la Asociación Española de Farmacólogos. Jaca, Abs. 90, 1984.
- 163.- NAVARRO, C. and VILLAVERDE, C.A. - PGI2 and TXA2 activity in experimental rat atherosclerosis. 7th, Inter. Symp. Atheroscl. Melbourne Abstr. 40, 1985.
- 164.- NAVARRO, C. SANTOLAYA, C., HERNÁNDEZ, R. y VILLAVERDE, C.A. - Microtrombosis y balance TXA2-PGI2 en ratas ateroscleróticas. II Reunión Nacional Sociedad Española de Tromb. y Hemost. Tarragona. *Biol. Clin. Hematol.* 103, 1986.
- 165.- NILSON, I.M., LJUNGNER, H. and TENGBORN, L. - Two different mechanisms in patients venous thrombosis and defective fibrinolysis low concentration of plasminogen activator or increased concentration of plasminogen activator inhibitor. *Br. Med. J.* 290: 1453, 1985.
- 166.- NILSSON, T.K. and JOHNSON, O. - The extrinsic fibrinolytic system in survivors of myocardial infarction. *Thromb. Res.* 48: 621, 1987.
- 167.- NOLF, P. - Contribution a l'étude de la coagulation du sang. La fibrinolyse. *Arch. Int. Physiol.* 6: 306, 1908.
- 168.- NOORDHOECK, V. - Distribution and variation of fibrinolytic activity in the walls of human arteries and veins. *Haemostasis.* 5: 355, 1976.
- 169.- NOORDHOECK, V. - Localization and distribution of fibrinolysis inhibition in the wall of human arteries and veins. *Thromb. Res.* 10: 121, 1977.
- 170.- NOORDHOECK, V.- Relation between activation and inhibition of fibrinolysis in the walls of human arteries and veins. *Thromb. Haemostasis.* 38: 407, 1977.
- 171.- NOORDHOECK, V. and BRAKMAN, P. - Inhibition of fibrinolysis by the human vascular wall related to the presence of smooth muscle cells. *Haemostasis* 3: 118, 1974.
- 172.- NORDOY, A., SVENSSON, B., WIEBE, D. and HOAK, J.C. - Lipoproteins and the inhibitory effect of human endothelial cells on platelet function. *Circ. Res.* 43: 527, 1978.
- 173.- OGSTON, D. - The physiology of hemostasis. Croom Helm, London, 1983.
- 174.- ONOYAMA, K. and TANAKA, K. - Fibrinolytic activity of the arterial wall. *Thromb. Diath. haemorrh.* 21: 1, 1969.
- 175.- PADRO, T., VILLAVERDE, C.A. and CÁNOVAS, M. - Hyperlipemia, fibrinolysis and arteriosclerosis. *Thromb. Res.* 49: 519, 1988.
- 176.- PANDOLFI, M., BJERNSTAD, A. and NILSSON, I.M. - Technical remarks on the microscopical demonstration of tissue plasminogen activator. *Thromb. Diath. haemorrh.* 27: 88, 1972.
- 177.- PARKER, F. - An electron microscopic study of experimental atherosclerosis. *Amer. J. Pathol.* 36: 19, 1960.
- 178.- PARSONS, D.F. and SUBJECK, J.R. - The morphology of the polysaccharide coat of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 265: 85, 1972.

- 179.- PEABODY, R.A., TSAPOGAS, M.J., WU KWANG-TZEN., DEVERAJ, K.T., KARMODY, A.M. and ECKERT, C. - Altered endogenous fibrinolysis and biochemical factors in atherosclerosis. *Ach. Surg.* 109: 309, 1973.
- 180.- POLA, P. and SAVI, L. - Fibrinogenemia, determined immunophelometrically, as a possible parameter in the evaluation of peripheral arteriosclerotic arteriopathy. *Atherosclerosis* 29: 205, 1978.
- 181.- POOLE, J.C.F. and FLOREY, H.W. - Changes in the endothelium of the aorta and the behavior of macrophages in experimental atheroma of rabbits. *J. Pathol. Bact.* 75: 245, 1958.
- 182.- RAINES, E.W. and ROSS, R. - Platelet-derived growth factor high yield purification and evidence for multiple forms. *Chem.* 257: 5154, 1976.
- 183.- RAPAPORT, S.I.- Introduction to Haematology 2nd ed JB Lippincott Philadelphia p., 559, 1987.
- 184.- RENAIS, J., GROULT, N., SCEBAT, L. et LENEGRE, J. - Pouvoir antigenique et pathologique du tissu arteriel, p. 323. In: *Le role de la paroi arterielle dans l'atherogenese*, Paris 1968. C.N.R.S.
- 185.- REYNOLDS, E.S. - The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electronmicroscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208, 1963.
- 186.- RODMAN, N.F., JAGANNATHAN, N., JENKIS, J., RODMAN, A. and ALLENDER, P.A. - Experimental atherosclerosis: surface ultrastructural studies in the rabbit aorta. *Scanning Electron. Microscopy.* 111: 835, 1979.
- 187.- ROKITANSKY, C. - A manual of pathological Anatomy, vol. 4 Day GE (trans.). London, The Sydenham Society, 1852, p. 272.
- 188.- ROSING, D.R., REDWOOD, D.R., BRAKMAN, P., ASTRUP, T. and EPSTEIN, S.E. - Impairment of the diurnal fibrinolytic response in man: effects of aging type IV hyperlipoproteinemia, and coronary artery disease. *Circulation Res.* 32: 752, 1973.
- 189.- ROSS, R. - The pathogenesis of atherosclerosis. *Mechanisms of Ageing Development* 9: 435, 1979.
- 190.- ROSS, R. - Atherosclerosis. *J. Cardiovascular Pharmacology* 6: 714, 1984.
- 191.- ROSS, R., GLOMSET, J.A., KARIYA, B. and HARKER, L. - A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 1207, 1974.
- 192.- ROSS, R. and HARKER, L. - Hyperlipidemia and atherosclerosis. Chronic hyperlipidemia initiates and maintains lesion by endothelial cell desquamation and lipid accumulation. *Science* 71: 1207, 1974.
- 193.- ROSS, R. and GLOMSET, J.A. - The pathogenesis of atherosclerosis. *New. Engl. J. Med.* 295: 369, 1976.
- 194.- SARKAR, N. - Reduced fibrinolytic activity of atherosclerotic sera caused by an increase in low-density lipoproteins in blood. *Nature* 189: 929, 1961.
- 195.- SCEBAT, L., RENAIS, J. et GROULT, N. - Etude des lésions aortiques spontanées du lapin. Role possible de mécanismes immuns. *Paroi Arterielle*, y: 37, 1980.
- 196.- SCHWARTZ, S.M. and GAJDUSEK, C.M. - Growth factors and the vessel wall. *Prog. Thromb Hemost* 6: 82, 1983.
- 197.- SHARK, E.A., GAMAN, E. and FREIGENBAUM, A.S. - Spontaneous aortic lesions in rabbits. I Morphologic characteristic. *Cir. Res.* 19: 80, 1966.
- 198.- SHATOS, M., DOHERTY, J., ALLEN, D. and HOAK, J. - Alterations in vascular endothelial cell function by oxygen-free radicals. *Thromb Haemostas.* 58: 155, 1987.
- 199.- SILBERBAUER, K., SINZINGER, H. and WINTER, M. - Prostacyclin production by vascular smooth-muscle cells. *Lancet.* 1: 1356, 1978.

- 200.- SIMIONESCU, M., SIMIONESCU, N. and PALADE, G.E. - Segmental differentiation of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J. Cell. Biol.* 67: 863, 1975.
- 201.- SIMIONESCU, M., SIMIONESCU, N. and PALADE, G.E. - Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium: Arteries and veins. *J. Cell. Biol.* 68: 705, 1976.
- 202.- SIMIONESCU, N., SIMIONESCU, M. and PALADE, G.E. - Recent studies on vascular endothelium. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2375: 64, 1976.
- 203.- SIMIONESCU, N. and SIMIONESCU, M. - The cardiovascular system. *Hystology*. Edited by L. Weiss, R.O. Greep. New York. McGraw-Hill. Book Co. pg. 373, 1977.
- 204.- SIMPSON, H.C.R., MEADE, T.W., STIRLING, Y., MANN, T.W., CHAKRABARTI, R. and WOOLF, L. - Hypertriglyceridaemia and hipercoagulabiliy. *Lancet* i 786, 1983.
- 205.- SINZINGER, H., SILBERBAUER, K., WAGNER, G., WINTER, M. and AUERSWALD, W. - Prostacyclin-Preliminary results with vascular tissue of various species and its importance for atherosclerotic involvement. *Atherogenese* 3, 123, 1978.
- 206.- SINZINGER, H., FEILG, M. and SILBERBAUER, K. - Prostacyclin genration in atherosclerotic arteries. *Lancet*. 2: 469, 1979.
- 207.- SINZINGER, H., CLOPATH, P. SILBERBAUER, K. and AUERSWALD, W. - Prostacyclin synthesis in human and experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 34: 345, 1979.
- 208.- SINZINGER, H., SILBERBAUER, K. and AUERWALD, W.- Does prostacyclin (PGI₂) regulate human arterial intima smooth muscle cell proliferation in early atherogenesis. *Blood Vessels* 17: 58, 1980.
- 209.- SINZINGER, H., CLOPATH, P., SILBERBAUER, K. and WINTER, M. - Is the variation in the susceptibility of various species to atherosclerosis due to inborn differences in prostacyclin (PGI₂) formation. *Experientia*. 36: 321, 1980.
- 210.- SMITH, E.B. - Fibrinogen, fibrin and fibrin degradation products in relation to atherosclerosis. *Clin Haematol.* 15: 355, 1986.
- 211.- SMITH, E.B., ALEXANDER, K.M. and MASSIE, I.B. - Quantitative estudies on the relationship between insoluble fibrin, soluble fibrinogen and low density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 23: 19, 1976.
- 212.- SMITH, E.B. and ASHALL, C. - Fibrinolysis ans plasminogen concentration in aortic intima in relation to death following myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 55: 171, 1985.
- 213.- SMOKOVITIS, A. and BINDER, B.R. - The effect of alloxan-induced changes diabetes on tissue plasminogen activator activity of the rat. *Thromb. Haemost. Abstr.* 42, 333, 1979.
- 214.- SMOKOVITIS, A. - A new hypotesis: possible mechanisms in the involvement of the increased plasminogen activator activity in branching regions of the aorta in the initiation of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 43: 141, 1980.
- 215.- SMOKOVITIS, A., KOKOLIS, N. and ALEXAKI-TZIVANIDOU, E. - Fatty streaks and fibrous plaques in human aorta show increased plasminogen activator activity. *Haemostasis*. 18: 146, 1988.
- 216.- SONG, S.H., KRATKY, R.G. and ROACH, M.R. - Scanning electron microscopic studies of the vasa vasorum of thoracic aortas. *Acta Anat.* 122: 133, 1985.
- 217.- SPAET, T.H. and STEMERMAN, M.B. - Platelet adhesion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 201: 13, 1972.
- 218.- SPECTOR, A.A., HOAK, J.C., FRY, G.L., DENNING, G.M., STOLL and SMITH, J.B. - Effect of fatty acid modification on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 65: 1003, 1980.

- 219.- SRINIVASAN, S.R., RADHAKRISHNAMURTHY, B., SMITH, C.C., WOLF, R.H. and BERENSON, G.S. - Serum lipid and lipoprotein responses of six nonhuman primate species to dietary changes in cholesterol levels. *J. Nutr.* 106: 1757, 1976.
- 220.- STEHBENS, W.E. - An appraisal of cholesterol-feeding in experimental atherogenesis. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 29: 107, 1986.
- 221.- STEHBENS, W.E. - Vascular complications in experimental atherosclerosis. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 29: 221, 1986.
- 222.- STEHBENS, W.E. - Cholesterol feeding and experimental atherosclerosis. Letter to the Editors. *Atherosclerosis* 73: 85, 1988.
- 223.- STEINER, A. and KENDALL, F.E. - Atherosclerosis and arteriosclerosis in dogs following ingestion of cholesterol and thiouracil. *Arch. Pathol.* 42: 433, 1946.
- 224.- STONE, M.C. and THORPE, J.M. - Plasma fibrinogen a major coronary risk factor. *JR. Coll. Gen. Pract.* 35: 565, 1985.
- 225.- STRONG, J.P. and MCGILL, H.C. - The natural history of coronary atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 40: 37, 1962.
- 226.- SUMIYOSHI, A. - Fibrin (fibrinogen) in the arterial wall and atherosclerosis. *Fukuoka Acta Med.* 59: 542, 1968.
- 227.- SUNDELL, I.B., DAHLGREN, S., RAMBY, M., LUNDIN, E., STENLING, R. and NILSON, T.K. - Reduction of elevated plasminogen activator inhibitor levels during modest weigh loss. *Fibrinolysis.* 3: 51, 1989.
- 228.- THOMAS, W.A., JANAKIDEVI, K., REINER, J.M. and FLORENTIN, R.A. - Some aspects of population dynamics of arterial smooth muscle cells in atherogenesis: In Paoletti R., Gotto A.M. Jr. (eds.). *Atherosclerosis Reviews.* New York Raven Press, p. 87, 1978.
- 229.- THORGEISSON, G. and ROBERTSON, A.L. - The vascular endothelium-Pathobiologic significance. *Amr. J. Pathol.* 93: 803, 1978.
- 230.- TILLET, W.S. and GARNER, R.L. - The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci, *J. Exp. Med.* 58: 485, 1933.
- 231.- TODD, A.S. - The histological localization of fibrinolysin activator. *J. Path. Bact.* 78: 281, 1959.
- 232.- TODD, A.S. - Localization of fibrinolytic activity in tissue. *Br. Med. Bull.* 20: 210, 1964.
- 233.- TODD, A.S. - The blood vessel wall and fibrinolytic activity; in Johnson and Guest, Dynamics of thrombos formation and dissolution, p. 321, (J.B. Lippincott Philadelphia, 1969)
- 234.- TREMOLI, E., SOCINI, A., PETRONI, A. and GALLI, C. - Increased platelet aggregability is associated with increased prostacyclin production by vessel walls in hipercholesterolemia rabbits. *Prostaglandins* 24: 397, 1982.
- 235.- TSCHOPP, T.A. and BAUMGARTNER, H.R. - Defective platelet adhesion and aggregation on subendothelium exposed in vivo or in vitro to flowing blood or fawn hooded rats with storage pool disease. *Thromb. Haemost.* 38: 620, 1977.
- 236.- Van FURTH, R. - Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* 161: 178, 1982.
- 237.- VERBEUREN, T.J., JORDAENS, F.H., ZONNEKEYN, L.L., VAN HOVE, C.E., COENE, M-C and HERMAN, A.G. - Effect of hypercholesterolemia on vascular activity in the rabbit. *Circulation Research.* 58: 552, 1986.
- 238.- VERSTRAETE, M. and VERMYLEN, J. - Thrombosis. Pergamon Press, p. 12, 1984.
- 239.- VESSELINOVITCH, D., GETZ, G.S., HUGHES, R.H. and WISSLER, R.W. - Atherosclerosis in the rhesus monkey fed three foods fats. *Atherosclerosis* 20: 303, 1974.
- 240.- VILLAVERDE, C.A. - Hiperlipemia y cofactores aterógenos relacionados con la hemostasia. *Drugs of Today*, supl. 1, 24: 79, 1988.

- 241.- VIRCHOW, R. - Phlogose and Thrombose in Gefasssystem in: Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin Frankfurt-am-Main, Meidinger Sohn Co, 1856 pp. 458-636.
- 242.- WALKER, L.N., BOWEN-PAPE, D.F. and REIDY, M.A. - Secretor of platelet-derived growth factor (PDGF)-like in arterial smooth muscle cells in induced as a response to injury. J. Cell. Biol. 99: 416, 1984.
- 243.- WARREN, B.A. - Fibrinolytic activity of vascular endothelium. Br. Med. Bull. 20: 213, 1964.
- 244.- WEIGENSBERG, B.I., LONGH, J.I. and MORE, R.H. - Biochemistry of atherosclerosis produced by cholesterol feeding, thrombosis and injury. Exp. Molec. Pathol. 37: 175, 1982.
- 245.- WESTERMARK, B. and WASTESON, A. - The response of cultured normal glial cells to growth factors. In: Adv. Metabol. Disorders, R. Luft, K.Hall (Eds.) Academy. Press. Vol. 8: 85, 1975.
- 246.- WESTERMARK, B. and WASTESON, A. - A platelet factor stimulating human normal glial cells. Exp. Cell. Res. 98: 170, 1976.
- 247.- WILHELMSSEN, L., SVARDSUD, D., KORSAN-BENGTSEN, K., LARSSONS, B., WELIN, L. and TIBBLIN, G. - Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. N. Engl. J. Med. 311: 501, 1984.
- 248.- WIMAN, B., CHMIELEWSKA, J. and RANBY, M. - Inactivation of tissue plasminogen activator in plasma. J. Biol. Chemist. 259: 3644, 1984.
- 249.- WINDAUS, citado por Costero I. Tratado de Anatomía Patológica. VI Atlante S.A. Edt. Mexico 1946.
- 250.- WISSLER, R.W., EILERT, M.L., SCHROEDER, M.A. and COHEN, L. - Production of lipomatous and atheromatous arterial lesions in the albino rat. AMA Arch. Pathol. 57: 333, 1954.
- 251.- WITTE, L.D., KAPLAN and NOSSEL, H.L. - Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured arterial smooth muscle cells. Circ. Res, 42: 402, 1978.
- 252.- WITTE, L.D., CORNICELLI, J.A., MILLER, R.W. and GOODMAN, D.S. - Effects of platelet-derived and endothelial cell-derived growth factors on the low density lipoprotein receptor pathway in cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem. 257: 5392, 1982.
- 253.- WOLF, N. and CARSTAIRS, K.C. - Infiltration and thrombosis in atherogenesis. A study using immunofluorescent techniques. Am. J. Pathol, 51: 373, 1976.
- 254.- WOLF, N. and CRAWFORD, T. - Fatty streaks in the aortic intima studied by an immunohistochemical technique. J. Pathol. Bact. 80: 405, 1960.
- 255.- YORK, J.L. and BENJAMIN, W. - Quantitative studies on the relationship of fibrinogen and fibrin in intima and atherosclerotic plaque. Thrombos. Res. 18: 717, 1980.

