

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO DEL CLORHIDRATO DE TICLOPIDINA SOBRE EL DESARROLLO DE LESIONES ATEROSCLEROSAS.

TRABAJO EXPERIMENTAL.

EMILIO VIVER MANRESA. *Jefe del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital «Germans Trias i Pujol». Badalona (España).*

PERE HUGUET REDECILLA. *Médico Adjunto de Anatomía Patológica de la residencia Sanitaria Valle de Hebrón. Barcelona (España).*

Razón de ser

En los últimos 30 años se han realizado numerosos estudios epidemiológicos retrospectivos y, sobre todo, prospectivos con el fin de precisar la noción de factor de riesgo arterial en la enfermedad ateromatosa. Todos ellos han coincidido en afirmar la importancia de los lípidos plasmáticos en el proceso de la aterogénesis.

Por otra parte, en los últimos años, gracias a las aportaciones del microscopio electrónico y al desarrollo de las técnicas bioquímicas e inmunohistoquímicas, se ha ido profundizando en el estudio de los diversos elementos que participan en la patogenia de la aterosclerosis.

Se ha comprobado la emigración de las células del tejido muscular liso desde la media, acumulándose en la placa de ateroma; y con ello se ha demostrado el papel del tejido muscular en la formación de la lesión.

Por otra parte, las plaquetas al adherirse al endotelio dañado contribuyen al crecimiento de la placa y durante la reacción de liberación liberan un péptido que promueve la proliferación del tejido muscular liso (factor mitogénico). Por ello, las sustancias que actúan sobre la adhesividad y la agregación plaquetar podrían reducir la respuesta proliferativa y con ello la progresión de la lesión aterosclerosa.

Esta es la razón que nos impulsa, basados en el mecanismo patogénico, a ensayar un nuevo fármaco.

Objetivos del estudio

Dada la implicación de las plaquetas en el mecanismo patogénico de la aterosclerosis, vamos a estudiar el efecto sobre ella de un fármaco con intensa capacidad antiagregante.

La Ticlopidina es en el momento actual el único fármaco antiagregante que actúa aumentando la síntesis de las prostaglandinas antiagregantes y restaurando así el desequilibrio trombógeno de la plaqueta.

El objetivo que persigue el presente estudio es comprobar, mediante un estu-

dio anátomo-patológico, si el tratamiento con Ticlopidina evita la progresión de las lesiones ateroscleróticas inducidas experimentalmente.

Método a seguir

Se estudiarán 200 ratas adultas de sexo femenino, de raza Sprague-Kawly, de 260 a 280 g. de peso.

I.— Inducción de hiperlipemia:

A) En los primeros cuatro días se suministrará Vit.D₂ a dosis de 300.000 unidades/día.

B) Se someterá a todas las ratas a una dieta hiperlipémica que contenga 2% de colesterol y 5% de aceite de coco hidrogenado, que se administrarán mezclados con el pienso; y se adicionará al agua de bebida 0,01% de 2-Tiouracilo.

En el suero de los animales se determinarán los niveles de colesterol, triglicéridos y lípidos totales. Se harán dos tomas: Una al mes de empezar la dieta y durante el acto operatorio y otra a los 3 meses al finalizar el trabajo, en el momento de la autopsia.

II.— Producción de una estenosis experimental:

Todas las ratas serán intervenidas y se les colocará un «clip» de plata que ocluya parcialmente la luz aórtica. A los dos meses serán sacrificadas y se remitirá para estudio anatomopatológico la bifurcación aórtica, incluyendo el «clip».

III.— Parámetros a valorar:

Analíticos: — colesterol
— triglicéridos
— lípidos totales.

Anátomo-Patológicos:

— macroscópicos: — Edema
— lesión ateromatosa (tamaño y tipo)
— oclusión del vaso.
— microscópicos: — tipo de lesión
— extensión
— tinciones.

El criterio fundamental considerado será el tamaño de la lesión aterosclerosa.

— Valoración de Resultados:

Una vez finalizado el estudio se valorarán los diversos parámetros de los grupos, estableciéndose cuadros comparativos de eficacia.

— Randomización:

Para cubrir todas las posibilidades se hicieron ocho grupos:

1°) Grupo control. 5 ratas. Pienso normal.

2°) Grupo control + Laparotomía y disección aorta. 5 ratas.

- 3°) Grupo control + Estenosis aórtica. 10 ratas.
- 4°) Pienso + Dieta hiperlipemiente. 20 ratas.
- 5°) Pienso + Dieta hiperlipemiente + Estenosis aórtica. 40 ratas.
- 6°) Pienso + Dieta hiperlipemiente + Estenosis aórtica + 50 mg Ticlopidina/Kg/día. 40 ratas.
- 7°) Pienso + Dieta hiperlipemiente + Estenosis aórtica + 100 mg. Ticlopidina/kg./día. 40 ratas.
- 8°) Pienso + Dieta hiperlipemiente + Estenosis aórtica + 150 mg. Ticlopidina/Kg./día 40 ratas.

Trabajo experimental

Sigue siendo válida la definición dada por el primer autor que habló sobre Arteriosclerosis (**Lobstein**, 1.829): Una alteración patológica de los vasos, palpable y visible, caracterizada por el engrosamiento y endurecimiento de la pared. Se trata de un proceso complejo que afecta a la pared arterial, de evolución crónica, que progresa con la edad y en la que influyen alteraciones estructurales de las capas de las arterias, factores hemodinámicos, plasmáticos y otros.

La ateroescclerosis, según definición de la **OMS** en 1.958, es: Combinación variable de alteraciones de la íntima de la arteria y que consiste en la acumulación focal de lípidos y carbohidratos complejos, tejido fibroso y depósito de calcio, que se asocian con alteraciones de la media. Si predomina el depósito lipídico sobre la esclerosis de forma local, hablamos de ateroma.

Varias teorías se han venido sosteniendo como causa etiológica del proceso arterioesclerosis, relacionándose con agentes físicos, químicos o con causas mecánicas. De todas ellas, quizás la más difundida es la teoría de los lípidos, que asegura que la causa primaria o esencial de la aterogénesis es el depósito de lípidos y colesterol en la capa íntima y subíntima de la pared arterial. Los trabajos de **Page, Newman, Lofland** (9, 13), demostrando el papel del endotelio vascular en el transporte de lípidos entre la pared del vaso y la sangre circulante, fueron aportaciones importantes a la teoría de los lípidos. Estos trabajos demostraron la permeabilidad de endotelio vascular a los lípidos que atraviesan la íntima en ambas direcciones, pero que existe un incremento en el transporte hacia la pared arterial cuando la íntima está lesionada.

La arteriosclerosis se localiza con preferencia y de forma acentuada en áreas concretas del árbol arterial, justamente en aquellas en que existe una disminución de la presión lateral del flujo sanguíneo; fenómeno que pone de manifiesto la importancia de la lesión de la íntima por factores hemodinámicos en el desarrollo de la enfermedad.

Hoy en día, se admite que las lesiones arteriosclerosas son la suma de múltiples factores entre los que destacan el metabolismo de los lípidos y las alteraciones de la pared arterial.

La producción experimental de lesiones arteriales en animales de laboratorio ha demostrado la importancia del carácter pulsátil del flujo sanguíneo, del traumatismo local como consecuencia de las turbulencias creadas por las estenosis provocadas experimentalmente, la viscosidad de la sangre, etc. (**Nordenstron, E.**). La afectación de la íntima constituye el estímulo inicial para la respuesta biológica re-

presentada por el engrosamiento relativo de la misma, como consecuencia de la proliferación de células endoteliales y fibroblastos (**Texon**).

Los lugares de mayor incidencia del proceso arterioescleroso son:

A) Las zonas estenosadas, donde por un aumento de la velocidad se produce una aspiración de la pared arterial (efecto Venturi) con la consiguiente afectación de la íntima.

B) Las bifurcaciones, donde la velocidad del flujo aumenta en las ramas secundarias más estrechas, creando un movimiento helicoidal en dichas ramas con las consiguientes zonas de aspiración.

Anatomía patológica

Las lesiones ateromatosas son más acusadas en la aorta abdominal y en la bifurcación. La lesión inicial suele ser la estría grasa fibrosa, que es de aspecto blanquecino, elevando discretamente el endotelio. El paso siguiente es la formación de la placa fibrosa o ateroma y cuyo corte presenta el engrosamiento de la íntima que llega a rechazar la media (**Benditt**). La calcificación es la complicación más frecuente y precoz de la placa de ateroma, pudiendo llegar a perder por completo su elasticidad la pared arterial, con la consiguiente repercusión hemodinámica. Otras placas se ulceran, pudiendo ser foco de emigración de trombos con la consiguiente embolización de partes distales. Otra fase del proceso arterioscleroso puede ser la hemorragia local con destrucción de las fibras musculares, con la consiguiente pérdida de elasticidad y la elongación o dilatación de la pared arterial.

En el aspecto microscópico, las lesiones observadas en el vaso consisten en un edema de la íntima por depósito de sustancias lipídicas y protéicas, tanto en el interior de las células de la pared como en la sustancia conectiva y en la elástica interna. El depósito graso lo constituyen colesterol, fosfolípidos y otros, y el depósito protéico glucoproteínas. En las placas de ateroma se ha observado una emigración de las células de la capa media al interior de la íntima, mecanismo esencial para la progresión de las lesiones parieto-vasculares.

Finalmente, en los vasos afectos por la arterioesclerosis se aprecia una infiltración de la adventicia por células linfocíticas.

Lesión inicial

Cualquier forma de lesión arterial que provoque una muerte celular o descamación endotelial puede provocar una respuesta curativa en la pared vascular. Dependiendo de la intensidad y duración de la lesión y del tipo de reacción tisular obtenida, obtendremos diferentes tipos de hiperplasia. Si a ello añadimos un nuevo factor de riesgo, como es la dieta hipercolesteriante, la respuesta que obtengamos será diferente.

Se han utilizado una gran variedad de modelos experimentales para provocar la lesión arterial: abrasión local de la íntima (21), denudación de la misma con una sonda de Fogarty (2), lesión provocada por sustancias químicas (homocysteminal, 7).

Otros trabajos en que se dieron dietas ricas en lípidos han demostrado que las alteraciones en las placas de ateroma guardan relación con la dieta (8).

La clasificación de las lesiones arterioescleróticas se ha basado en su apariencia macroscópica y correlacionada con las lesiones histológicas halladas en las arterias extraídas durante la autopsia. Ya que estas lesiones pueden permanecer silenciosas por muchos años antes de que interfieran en el flujo sanguíneo, es difícil estudiar su patogenia en la especie humana.

Las lesiones producidas por la arterioesclerosis tienen generalmente una distribución anatómica característica y están localizadas de modo principal en la capa más interna de la pared arterial, aunque algunos cambios pueden encontrarse en la capa media. Las lesiones han sido clasificadas en tres categorías: la estría grasa, la placa fibrótica y las lesiones complicadas. La diferencia entre ellas a veces es imprecisa:

La **estría grasa** es la forma primitiva de la lesión arterioesclerótica. Son relativamente planas, amarillentas y contienen un acúmulo de lípidos y de células musculares lisas. La edad en que aparecen dichas lesiones varía, pero en algunos casos han aparecido a la temprana edad de 10 años. La mayoría de los lípidos se presentan en forma de colesterol libre y ester de colesterol.

La **placa fibrótica** es el signo de una arterioesclerosis en fase avanzada. Está engrosada y protude dentro de la luz arterial. Suelen encontrarse en sitios donde hay un aumento de la turbulencia y un mayor «stress» para la pared arterial. Están formadas por un acúmulo de células musculares lisas con tejido conectivo, fibras elásticas y lípidos extracelulares.

Las **lesiones llamadas complicadas** suelen corresponder a una placa fibrótica donde hay degeneración celular, hemorragia, calcificación y trombosis mural.

Baumgartner (2) demostró que es posible sacar largos segmentos de endotelio de la pared vascular mediante la introducción de un catéter intraarterial, estudiando así la correlación entre las plaquetas y la pared arterial y la subsiguiente respuesta proliferativa. Todos los trabajos en que se provoca una lesión arterial se produce la misma respuesta: adherencia plaquetaria, agregación plaquetaria, proliferación de células musculares lisas y formación de tejido conectivo. Ellos han demostrado que existe una correlación entre el tiempo requerido para la curación de la lesión y la supervivencia de las plaquetas.

Freidman (6) ha demostrado que existe una relación entre la formación de lesiones arterioescleróticas provocadas en el conejo con la supervivencia de plaquetas, así como con su propiedad de adhesión a la pared arterial dañada. Parece que todo ello tiene relación con las prostaglandinas segregadas por las plaquetas.

Ross y Harker han demostrado que existe una correlación entre las plaquetas, la lesión vascular y la presencia de hiperlipemia. Hicieron un trabajo experimental con monos, a los cuales administraron una dieta rica en colesterol por un periodo de tres meses. Encontraron que en un 5% de los casos había cambios en el endotelio vascular. Si introducían catéteres intraarteriales para provocar una lesión vascular el tanto por ciento aumentaba (14).

La observación de que una lesión repetida a nivel del endotelio puede producir una lesión proliferativa arterioesclerótica rica en lípidos, junto al reconocimiento de que la acción de las plaquetas a nivel del sitio de la lesión pueden estimular la proliferación de células musculares lisas, ha demostrado cómo la lesión vascular más las

plaquetas y la trombosis pueden contribuir al desarrollo de las lesiones arterioescleróticas (6).

Se ha demostrado, en animales de experimentación, que si se provoca una lesión vascular y son alimentados con cifras de colesterol normales, se desarrolla la estría grasa, la placa fibrótica y lesiones ateromatosas ricas en colesterol. Por el contrario, si producimos una trombocitopenia, estas lesiones ateroscleróticas no se presentan, indicando así el papel que tienen las plaquetas en el desarrollo de dichas lesiones.

Para explicar el papel que juegan las plaquetas a nivel de la pared vascular dañada debemos considerar los siguientes factores:

a) Efectos del flujo sanguíneo, con las alteraciones dinámicas en forma de turbulancias provocadas por la lesión de la pared vascular.

b) La correlación entre las plaquetas y el endotelio dañado. Se ha demostrado que la formación de prostaglandinas por el endotelio sano previene la adherencia de las plaquetas.

c) Interrelación entre plaquetas y formación de trombo. Se ha demostrado que la cantidad de prostaglandina formada por la pared del vaso dañado es insuficiente para evitar la agregación plaquetaria. Al adherirse las plaquetas a las fibras del colágeno se liberan serotonina y ADP, lo cual hace que las plaquetas cambien de forma y se adhieran a la pared vascular liberando Tromboexano.

Estos mecanismos anteriormente expuestos provocan una activación en los mecanismos de coagulación con la consiguiente formación de fibrina y consecuente formación de trombo.

El conocimiento de estos mecanismos nos motivó el programar un trabajo experimental con ratas, en el cual provocamos una lesión arterial permanente, damos una dieta hiperlipemiente y añadimos una medicación antiagregante.

Material y método

Hemos empleado 200 ratas hembras de la raza Sprague Dawley de 260 gr. de peso y las hemos distribuido en ocho grupos diferentes para poder cubrir el máximo posible de posibilidades y dejar el menor margen posible de error.

Un primer grupo compuesto de 5 ratas, nos han servido de control, ya que estaban en el mismo ambiente y comían del mismo pienso.

Al segundo grupo, compuesto de 5 ratas, le practicamos una laparotomía, disección de la aorta y cierre de la laparotomía. Este grupo solamente tomaba pienso normal.

Al tercer grupo, con 10 ratas, se le ocluyó parcialmente la aorta con un «clip» hemostático de plata, de los usados por los neurocirujanos, y también sólo se les administró pienso.

Al grupo cuarto, compuesto de 20 ratas, se le administró pienso más dieta hiperlipemiente.

Al quinto grupo compuesto, al igual que los tres siguientes, de 40 ratas (grupos 6, 7, 8), se le practicó el clampaje parcial de la aorta con el «clip» o con una ligadura de seda del 6-0. Se les suministró pienso, más dieta aterogénica.

A las del grupo sexto, se les suministró además Clorhidrato de Ticlopidina a dosis de 50 mgr/Kg./día; a las del grupo siete, dosis de 100 mgrs/Kg./día; y a las del grupo ocho, dosis de 150 mgrs./Kg./día de Ticlopidina.

La dieta hiperlipemiente constó de dos fases: en la primera fase les suministramos Viot D2 a dosis de 300.000 U.I., Colesterol 2% y 5% de Aceite de Coco Hidrogenado que se administró mezclado con el pienso. Además, se adicionó agua «ad Libitum», con 0,01% de 2-Tiouracilo. Esta fase duró tres días. En la segunda fase se administró la misma dieta sin la Vit D y durante un periodo de 60 días.

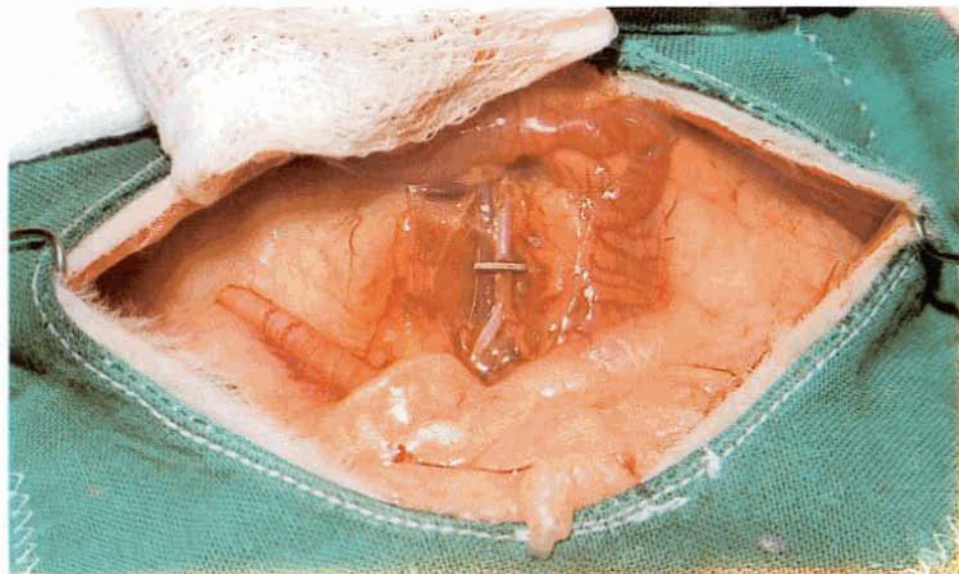


FIG. 1.- Aorta con el «clip» colocado.

A continuación se intervinieron los diferentes grupos y se continuó la misma dieta que en la fase dos, añadiendo a los grupos 6, 7 y 8 el Clorhidrato de Ticlopidina en el agua, a dosis de 50, 100 o 150 mgrs./Kg./día. Esta fase duró un mínimo de 45 días y un máximo de 60 días, según el intervalo transcurrido entre la intervención y la autopsia.

La técnica quirúrgica (fig. 1) se hizo bajo anestesia general con ether, a circuito cerrado en la fase de inducción y a circuito abierto durante la intervención. Se practicó una laparotomía media y, previa exteriorización parcial del paquete intestinal, se procedió a la disección de la aorta, separándola de la vena cava, a la cual está íntimamente unida. A continuación colocamos un «clip» de plata en V en unas ratas y, en otras, una ligadura semioclusiva con seda 6-0. En todos los casos la estenosis provocada se realizó por encima de la bifurcación de la aorta abdominal. Siempre se comprobó la presencia de pulso por debajo de la estenosis.

Se cerraba el peritoneo posterior, para separar el «clip» de las víceras, con un punto de seda 6-0. Cierre de la laparotomía en dos planos, la sutura interior conti-

nua y la piel con puntos sueltos. Se usó seda 2-0. A partir de los 45 días se empezó a sacrificar a los animales. Se usó la misma anestesia. Antes de proceder a la resección de la aorta abdominal, para remitirla a Anatomía Patológica, se extraía sangre para la analítica. El mejor procedimiento, según nosotros, fue practicar la extracción de sangre en la vena cava por encima del hígado o en la renal izquierda. Antes de seccionar la aorta comprobamos la permeabilidad pos-clipaje, habiendo encon-

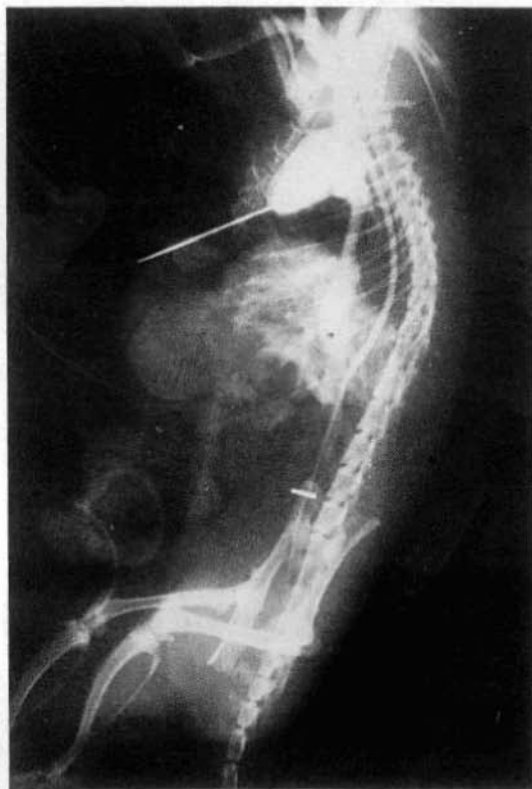


FIG. 2.- Arteriografía de comprobación a los 45 días de haber colocado el «clip».

trado casos de trombosis con la seda y con el «clip». En los casos en que habíamos colocado una ligadura para producir la estenosis, no existía apenas reacción localizada sobre la misma.

Como casos anecdóticos tenemos que contabilizar la existencia de tres quistes de riñón derecho, producidos por la ligadura del ureter correspondiente, ligadura provocada con el punto de cierre del peritoneo posterior. También encontramos tres aneurismas de aorta por encima del «clip».

En algunos casos, antes de proceder a la resección de la aorta para el examen anatomopatológico, practicamos un estudio arteriográfico mediante punción intra-

cardíaca, para comprobar la permeabilidad arterial y la posible detección de lesiones arterioescleróticas (fig. 2). En las treinta arteriografías practicadas confirmamos la obliteración de la aorta en cinco casos y no pudimos describir lesiones arterioescleróticas.

Únicamente algunas de ellas tenían una dilatación uniforme a lo largo de la aorta abdominal previa a la estenosis.

La permeabilidad de la luz vascular se comprobó, además del examen arteriográfico practicado en número de treinta, con la palpación de pulso a nivel de la íliaca derecha y posterior sección de la misma para comprobar el «jet» que salía a través de la arteriectomía practicada.

Procedimos luego a la resección de la aorta abdominal, incluyendo la bifurcación con la estenosis y las dos íliacas comunes. La conservamos en una solución de formol al 10%, remitiéndola a Anatomía Patológica para su estudio macroscópico y microscópico.

La mortalidad operatoria fue de cinco por la anestesia y dos por hemorragia. En el postoperatorio sólo tuvimos dos muertos.

Las cifras normales de colesterol, triglicéridos y colesterol HDL para las ratas de esta familia es de 73 mgr./100 ml., 50 mgrs./100 ml. y 63 mgrs./100 ml. respectivamente. La cifra de lípidos totales es de 320 en las ratas normales (C.A. Villaverde).

En los análisis practicamos en nuestros animales de experimentación, las cifras para el colesterol oscilaban entre 81 la más baja y 163 la más alta; para los triglicéridos, entre 46 y 143; y para el colesterol HDL; entre 85 y 182. Estos resultados son reflejo fiel de la efectividad de la dieta aterogénica suministrada a los animales.

Hemos encontrado 20 aortas trombosas, de ellas correspondían 3 al grupo 4° (pienso más dieta hiperlipemiente), 12 al grupo 5° (pienso + dieta hiperlipemiente + estenosis aórtica), 3 al grupo 6° (pienso + dieta hiperlipemiente + estenosis aórtica + 50 mgr. de ticlopidina) y 2 al grupo 8° (pienso + dieta + estenosis aórtica + 150 mgr. de ticlopidina).

Estudio anatomopatológico

Examen macroscópico de la lesión:

Efectuado siguiendo el método **Holman** y cols. abriendo los vasos longitudinalmente tras su disección, clavándolos en una tabla de corcho y fijándolos en formaldehído al 10%.

Las estrías grasas y placas lipídicas de la pared vascular se tiñen con solución de Sudan IV que se tira sobre el vaso, coloreándose después de unos minutos las citadas placas. El tiempo de exposición varía ligeramente de unos casos a otros, por lo que se deben lavar a menudo para asegurar una intensidad de tinción correcta. La muestra debe diferenciarse seguidamente con etil-alcohol al 80% durante cinco minutos. Seguidamente, se lavan en agua y a continuación pueden ser guardados en solución de formol para su observación.

Examen microscópico

Una vez realizados cortes transversales de las muestras vasculares, se ha procedido a su inclusión en parafina según técnica de rutina. Para valorar las alteraciones en los distintos componentes de la pared vascular se han efectuado las siguientes tinciones:

Hematoxilina-Eosina, con la que el citoplasma celular y las fibras elásticas se tiñen de rojo y amarillento, los núcleos de color azul y las zonas calcificadas de gris, azul, negro. HE.

Verhoeff-van Gisson, tinción específica para fibras elásticas, que las tiñe intensamente de negro, quedando el tejido interfibrilar de color amarillo verdoso. V.V. G. PAS (solución de ácido peryódico) con el que se oxidan los grupos 1,2 glicol de los tejidos y dan lugar a aldehidos que se tiñen con el reactivo de Schiff; se aprecian así los mucopolisacáridos de color rosado fuerte.

Von Kossa, tinción específica para el calcio, que se tiñe de negro.

Grupos 1 y 2. Ratas control

Macroscópico.

La superficie interna de la aorta aparece blanca, brillante y lisa. El vaso en general presenta una textura elástica y es flexible y suave al corte. La tinción con Sudan IV es negativa en todos los casos (grupo 1 y 2) (fig. 3).

Microscópico.

Con hematoxilina-eosina se observa una tinción normal de la pared aórtica. La morfología vascular es normal con una íntima lisa. Con Verhoeff-van Gisson (V.V. G.) se observan varias capas de fibras elásticas paralelas formadas por fibras finas, continuas y ligeramente onduladas. El PAS es negativo, así como la tinción de von Kossa (fig. 3).

Grupo 3. Ratas alimentadas con pienso ÷ estenosis aórtica.

Macroscópico.

En general las aortas están rígidas y son duras al corte observándose en su superficie interna pequeñas estrías y placas blanquecinas que se colorean moderadamente con el Sudan IV.

Microscópico.

Con HE se observan pequeños nódulos celulares en la íntima levantando el endotelio, sin cambios de tipo ateromatoso aunque las fibras elásticas aparecen más evidentes y gruesas.

Con el V.V.G. estas fibras presentan roturas y desdoblamientos, con desorganización de su paralelismo a lo amplio de toda la pared vascular.

Con el PAS pueden observarse mínimos acúmulos positivos a nivel de algunos nódulos y es donde se entrecruzan las fibras elásticas. La tinción con Von Kossa es negativa (fig. 4).

Grupo 4. Ratas alimentadas con pienso y dieta aterogénica.

Macroscópico.

Las arterias se presentan ligeramente rígidas y más duras al corte. En la superficie interna pueden verse estrías blanquecinas que se colorean de rojo con el Sudan IV.

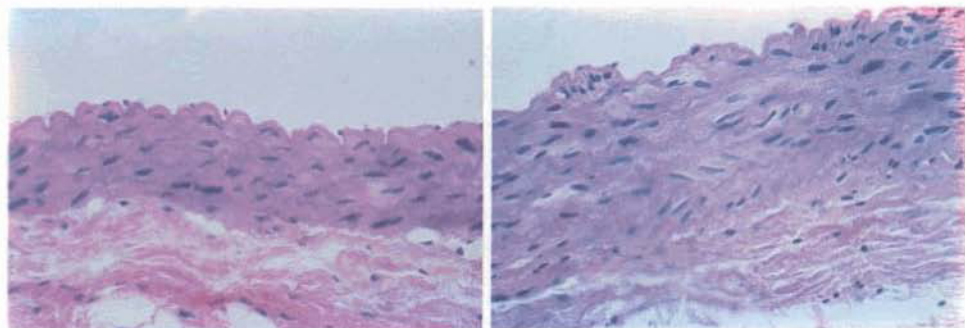


FIG. 3.- Condiciones normales (grupo control). HE. pared normal con íntima regular. Fibras elásticas de color anaranjado, poco visibles.

FIG. 4.- En los animales del Grupo 3 (Estenosis aórtica y pienso) aparecen nódulos visibles con la HE.

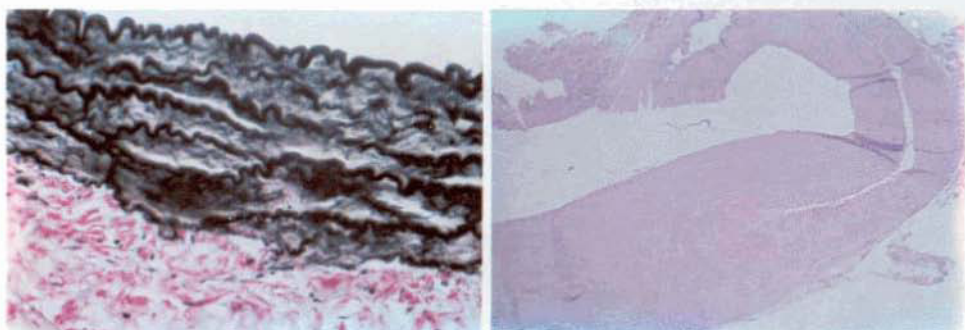


FIG. 5.- Con VVG las fibras elásticas aparecen irregulares y rotas, Grupo 4.

FIG. 6.- Aneurisma. La pared está engrosada y son evidentes las calcificaciones teñidas de azul-negro con la HE. Grupo 5 (Estenosis aórtica, dieta aterogénica).

Microscópico.

Con HE se observan irregularidades intimales en forma de pequeños nódulos celulares que protuyen hacia la luz del vaso. La tinción es normal en cuanto a células musculares, pero las fibras elásticas se observan más azuladas.

Con V.V.G. las fibras elásticas se ven engrosadas, presentando interrupciones coincidiendo especialmente con los nódulos; en la zona media del vaso priva espe-

cialmente la desorganización de las fibras que se entrelazan. El PAS es negativo, aunque en algún caso se observan mínimos acúmulos de mucopolisacaridos en las zonas donde se entrecruzan las fibras elásticas. Von Kossa demuestra la presencia de calcio (fig. 5).

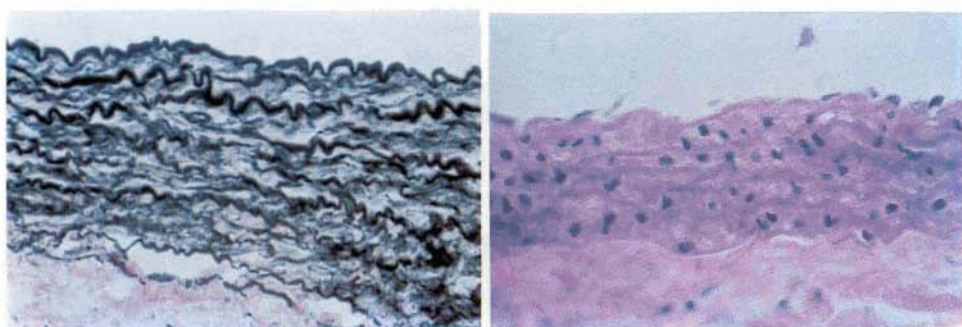


FIG. 7.- En este grupo 5, las fibras elásticas muestran gran alteración de su distribución y en muchos casos evidente hiperplasia con engrosamiento general de la pared del vaso. Tinción VVG.

FIG. 8.- Son evidentes las fibras elásticas de color azulado y gruesas, con tinción HE. Grupo 6. Estenosis, dieta aterogénica más Ticlopidina.



FIG. 9.- Fibras elásticas profundamente alteradas, con VVG. Grupo 6 y 7.

Grupo 5. Ratas alimentadas con pienso ÷ dieta aterogénica ÷ estenosis aórtica.

Macroscópico.

Las arterias se observan rígidas y en general de paredes gruesas y duras al corte, mostrando en su superficie interna la presencia de placas y estrías blancas que se colorean con el Sudan IV. En 2 casos se ha formado un aneurisma de 0,8 cm. de

diámetro por encima del «clip», cuya pared blanca y gruesa se tiñe de rojo con el Sudan IV.

Microscópico.

Con la HE se observa la íntima irregular con numerosos nódulos al corte, más evidentes en la porción de aorta por encima del «clip»; las fibras elásticas se ven azuladas y gruesas. En los aneurismas las paredes son gruesas y con ausencia de fenómenos regresivos: hemorragias, calcificaciones. Por fuera en la zona adventicial no se ven infiltrados inflamatorios.

Con el V.V.G. las fibras se observan muy alteradas, gruesas y desorganizadas, con desdoblamiento múltiple en la zona subintimal y roturas en las zonas más profundas. En los aneurismas destaca la pérdida de fibras elásticas de la pared, quedando solamente pequeños grupos finos y alterados en la zona subintimal.

El PAS pone de manifiesto pequeños depósitos junto a las zonas de agrupamiento de fibras elásticas; en el aneurisma se observan también pequeños depósitos positivos.

Con Von Kossa es positivo, demostrándose calcificaciones sobre todo en los aneurismas (fig. 6).

Grupos 6, 7 y 8. Ratas alimentadas con pienso ÷ dieta aterogénica ÷ estenosis aórtica ÷ ticlopidina.

Macroscópico.

Las arterias en general aparecen rígidas y engrosadas, pero en la superficie endotelial son en general regulares, sin placas evidentes y con poca apetencia por el Sudan IV. Existe un caso en el que se ha desarrollado un aneurisma por encima de la ligadura, de aspecto rígido al corte, duro y de superficie interna blanca.

Microscópico.

Con la HE son escasos los casos en los que se observan nódulos celulares intimaes, siendo su presencia más evidente en los tratados con la primera dosis que en los correspondientes a los grupos con dos o tres dosis de medicación. Destacan en todos ellos, sin embargo, las fibras elásticas engrosadas y ligeramente calcificadas, quedando teñidas de un tono azulado.

Con el V.V.G. se observan las fibras elásticas alteradas, en el sentido de observarse fundamentalmente el engrosamiento elástico de la pared con numerosas capas que han perdido su paralelismo, con fibras rotas y adheridas unas a otras. En el aneurisma se observan fibras en la zona cercana a la luz, pero adelgazadas e intensamente alteradas.

La tinción de PAS pone de manifiesto pequeñas cantidades de mucopolisacáridos, donde se agrupan las fibras. El Von Kossa es positivo (fig. 7 y 8).

Comentarios

En el examen macroscópico se observa que mientras en condiciones normales (grupos control 1 y 2) las arterias se muestran flexibles y poco resistentes al corte y

la superficie endotelial es lisa y brillante, en los demás casos se ha perdido la elasticidad haciéndose las paredes rígidas y endurecidas al corte.

En la superficie endotelial pueden observarse estriaciones y placas blanquecinas de pequeño tamaño, que se tiñen con el Sudan IV. Destaca la formación de dos aneurismas en animales sometidos a pinzamiento + dieta aterogénica.

En los grupos tratados médicamente, persiste el aspecto rígido de la aorta, pero no se observan en general alteraciones endoteliales; sin embargo, se ha observado un caso de aneurisma.

En cuanto al examen microscópico, comparando el grupo control con estructura normal a los demás grupos, destaca el hecho de que en los animales sometidos a dieta se observan nódulos celulares intimales, subendoteliales, independientemente de si ha existido pinzamiento aórtico o no, pero que estos nódulos son mínimos o desaparecen cuando los animales han sido tratados médicamente (grupos 6, 7 y 8).

Por encima de estos nódulos, en la luz vascular, se aprecian algunos casos con formación de pequeños trombos plaquetarios, atribuibles a las alteraciones del flujo producidas por las irregularidades de la superficie interna del vaso.

Estos nódulos, visibles con la HE, coinciden con roturas y desdoblamientos de fibras elásticas (V.V.G.) y con la presencia de pequeños acúmulos de mucopolisacáridos PAS positivos. Igualmente, ya con la HE se observan las fibras elásticas engrosadas y azuladas, signo de calcificación incipiente que se confirma luego con la tinción específica para el calcio de Von Kossa. Esta calcificación de las fibras da lugar a un menor grado de elasticidad y por ende a una mayor fragilidad, ocasionando las roturas y desdoblamientos evidenciados con las tinciones específicas (V.V.G.). Pero destacan los siguientes hechos diferenciales de unos grupos a otros: Mientras en los animales sometidos a dieta normal y pinzamiento (grupo 3) existen alteraciones intimales y rotura de fibras elásticas con proliferación de las mismas, no son tan evidentes las calcificaciones como en los grupos sometidos a dieta aterogénica (grupo 4 y 5). En éstos las fibras son más azuladas, mientras existe el mismo patrón de multiplicación y desorganización. Se suman además dos casos con aneurisma donde existen pequeñas hemorragias intraparietales.

La coincidencia de depósitos PAS positivos en los nódulos y en las zonas de engrosamiento de fibras elásticas calcificadas sugiere que el depósito de iones cálcicos produzca un cambio del pH que ocasiona el aumento de los mucopolisacáridos.

Las roturas de las fibras elásticas se explican en parte por su mayor rigidez al calcificarse en los casos de dieta aterogénica, pero en los demás casos las atribuimos a un efecto mecánico producido por los cambios de presión y flujo debidos al pinzamiento distal, llegando al grado máximo de afectación cuando estas fibras ceden y se produce un aneurisma.

En el grupo de animales con tratamiento médico, los hechos más destacables, desde un punto de vista macroscópico, son las desapariciones de las alteraciones endoteliales. En el examen microscópico destaca la pérdida de los nódulos celulares a medida que aumenta la dosis de medicación y la ausencia total de trombos plaquetarios, mientras se mantiene el cuadro de calcificación-rotura-desorganización-hiperplasia de fibras elásticas, dependiente sobre todo del factor mecánico (estenosis producida por el «clip»).

Conclusiones

— Tras la dieta aterogénica las paredes aórticas se muestran rígidas y muestran placas y estrías endoteliales que se tiñen por el Sudan IV.

— Microscópicamente se observan fibras elásticas ligeramente calcificadas, rotas, desdobladas, desorganizadas, con pérdida del paralelismo que se observa en el grupo control.

— Se observan proliferaciones celulares (nódulos) a nivel de la íntima subendotelial que protuyen en la luz del vaso.

— En algunos casos, sobre estos nódulos se identifican microtrombos plaquetarios.

— Existe en general un pequeño aumento del depósito de mucopolisacáridos (PAS positivo) en las zonas de calcificación y donde se superponen las fibras elásticas engrosadas.

— En los animales pinzados, independientemente de la dieta seguida, se observa engrosamiento de la pared por hiperplasia de las zonas elásticas, persistiendo el patrón de desorganización, con la presencia de roturas y zonas de calcificación y depósitos de mucopolisacáridos. El grado máximo de alteración se aprecia en los casos de aneurisma.

— Cuando los animales han sido sometidos a tratamiento con ticlopidina desaparecen los nódulos intimaes y no se observa ningún caso de trombo plaquetario. No desaparecen, sin embargo, las consecuencias de la alteración mecánica.

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos en un trabajo experimental en que se han sumado dos factores de riesgo; **dieta aterogénica + lesión vascular**, junto al efecto medicamentoso de un antiagregante plaquetario (Clorhidrato de Ticlopidina).

Se han randomizado ocho diferentes grupos, para poder cubrir todas las posibilidades.

A todos los animales se les ha practicado un control analítico de colesterol, triglicéridos y HDL, siendo los resultados positivos en todos, lo que demuestra la eficacia de la dieta empleada (colesterol al 2%, aceite de coco hidrogenado al 5% y tioruacilo al 0,01%) para aumentar los niveles normales en sangre de estos elementos.

El estudio anatomopatológico ha evidenciado la presencia de lesiones ateromatosas en todas las biopsias arteriales estudiadas.

En el trabajo se hace una descripción detallada de los hallazgos anatomopatológicos observados, comparándolos a los vistos en las ratas de control. Se destaca la presencia de calcificaciones en las ratas con dieta hiperlipemiente y la presencia de roturas de fibras elásticas, así como su proliferación y desorganización en todos los casos en que se practicó una estenosis de la luz aórtica. Ello reafirma el papel mecánico que juega la estenosis en el desarrollo de la arteriosclerosis al variarse las condiciones hemodinámicas del flujo sanguíneo, creándose unas turbulencias y fuerzas de cizallamiento que dañan el endotelio vascular.

Las alteraciones histológicas son más acentuadas en los animales del grupo 5. En este grupo la rigidez de la pared y la presencia de calcio es mayor, así como la proliferación de las fibras elásticas.

En los grupos, 6, 7 y 8, a los que se les suministró ticlopidina (50, 100, 150 mgr.), hay que destacar la menor reacción endotelial y la ausencia de trombos, aunque presentaban alteraciones de las fibras elásticas. No hemos encontrado diferencias significativas según la dosis administrada. Han habido 15 trombosis en las ratas sin medicación y 5 con medicación.

Resumiendo, podemos sacar como **conclusiones finales**:

— Una dieta aterogénica + estenosis aórtica favorece el desarrollo de lesiones ateromatosas en animales de experimentación.

— Añadiendo un medicamento antiagregante plaquetario (Ticlopidina) disminuyen los casos de trombosis, no se evidencian trombos plaquetarios y, aunque macroscópicamente el endotelio vascular no presenta alteraciones, existen aunque en menor grado alteraciones de las fibras elásticas con engrosamiento de las mismas y depósitos de calcio.

Por consiguiente podemos afirmar que la **ticlopidina** en los animales de experimentación:

Impide la formación de trombo intravascular.

Favorece la curación normal del endotelio vascular después de un insulto mecánico.

No impide la formación de lesiones ateromatosas en los casos de estenosis vascular.

Se demuestra la importancia del factor mecánico en el desarrollo de las lesiones ateromatosas.

SUMMARY

An experimental study with rats, about antiaggregating effect of Tyclopidin in provoked atheromatous injuries with beneficial results, is presented.

BIBLIOGRAFIA

1. ASHIDA, S.I.: Mode of action of ticlopidina in Inhibition of platelet aggregation in de rat. «Tromb. Hamst.» 41: 436, 1979.
2. BAUMGARTNER, H.R.: Thrombosis: Pathogenesis in clinical trial. Stuttgart 1974.
3. BENDIT, E.P.: El origen de la arterioesclerosis. «Investigación y Ciencia», abril, 56, 1977.
4. FHER, Lab. S.A.: «El Sistema Vascular Enfermo». Barcelona 1976.
5. FRIEDMAN, R.J.: Atherosclerosis. Experimental trial in the rat. «Lab. Investigation», 30: 404, 1975.
6. FRIEDMAN, R.J.: «Journal Clin. Invest.», 60: 1.191, 1977.
7. HARKER, L.H.: «Journal Clin. Invest.», 58: 731, 1976.
8. LEWIS, J.C.: «Science», 196: 1.007, 1977.
9. LOFLAND, H.B.: The bi-directional transfer to cholesterol in normal aorta, fatty streats and atheromatosis plaquets. «Biol. Med.», 133: 1, 1970.
10. MASDEU, S.: Técnicas rápidas para la determinación de colesterol HDL en suero. «Laboratorio», 66: 501, 1978.
11. MORNON, J.: Prevention of vascular lesions in the coronary artery and aorta of rat induced by hypervitaminosis D and cholesterol containing diet. «Atherosclerosis», 16: 105, 1972.
12. NORDENSTRON, B.: Mechanic strain on certain section of the coronary arteries. «Invest. Radiol.», 1: 306, 1966.
13. PAGE, L.H.: Atherosclerosis and introduction. «Circulation», 10: 1, 1954.
14. ROS, R.: «Science», 193: 1.094, 1976.
15. ROS, R.: Patogenesis de la arteriosclerosis. «The New England Journal of Medecine», 117: 28, 1976.
16. SABATER TOBELLA.: Lipoproteínas plasmáticas y dislipemias. «Medicina Clínica», 58: 530, 1972.
17. SEAN MOORE.: «Vascular injury and Atherosclerosis». Monografía 1981.
18. SEGURA, R.: Lípidos, plaquetas y endotelio vascular. «Biol. Clín. Hematol.», 4: 39, 1982.
19. STEINBERG, D.: Research related to underling mechanisms in atherosclerosis. «Circulation», 60: 1.559, 1979.
20. THOMAS, W. A.: Myocardial infarction in rat fat diet. «Circulation», 19: 65, 1959.
21. THORGERRION, G.: Patogenesis de la arteriosclerosis. «England Journal of Medecine», 10: 117.
22. VILLAVERDE, C. A.: Arteriosclerosis: Aportación experimental al estudio de su evolución. «Consejo Superior de Investigaciones científicas», Barcelona, 1980.
23. VILLAVERDE, C. A.: Los lípidos en la aterogénesis experimental de la rata. «Archiv. Farm. Toxi.», 4: 1, 1978.