

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>  
Teresa  
Sánchez  
Polo



T  
E  
S  
I  
S  
  
D  
O  
C  
T  
O  
R  
A  
L

**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E  
HISTOLOGÍA

Influencia de la dieta y la terapia con atorvastatina sobre la  
progresión-regresión de la arteriosclerosis en troncos supra-  
aórticos y correlación con lesiones hepáticas en un modelo  
experimental en pollos

D<sup>a</sup>. María Teresa Sánchez Polo

2013

2013



**Universidad de Murcia**  
**Facultad de Medicina**  
Dpto. Biología Celular e Histología

**Influencia de la dieta y la terapia con atorvastatina sobre la progresión-regresión de la arteriosclerosis en troncos supra-aórticos y correlación con lesiones hepáticas en un modelo experimental en pollos**

**M<sup>a</sup> Teresa Sánchez Polo**

**Murcia, 2013**



**Universidad de Murcia**  
**Facultad de Medicina**  
**Dpto. Biología Celular e Histología**

**Influencia de la dieta y la terapia con  
atorvastatina sobre la progresión-regresión  
de la arteriosclerosis en troncos supra-  
aórticos y correlación con lesiones hepáticas  
en un modelo experimental en pollos**

**Memoria presentada por Doña M<sup>a</sup> Teresa Sánchez  
Polo para optar al Grado de Doctor**

**Directores:**

**Dr. D. Ignacio Ayala de la Peña**  
**Dr. D. Bartolomé García Pérez**  
**Dra. Dña. María Teresa Castells Mora**



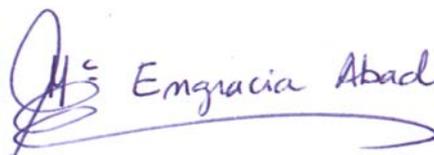
Dña. María Engracia Abad Mateo, Profesora Titular de Universidad del Área de Biología celular y Directora del Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia

**INFORMA:**

Que vista la solicitud de autorización de presentación de Tesis Doctoral de Dña María Teresa Sánchez Polo, titulada *"Influencia de la dieta y la terapia con atorvastatina sobre la progresión-regresión de la arteriosclerosis en troncos supra-aórticos y correlación con lesiones hepáticas en un modelo experimental en pollos."*, realizada bajo la inmediata dirección y supervisión de D Ignacio Ayala de la Peña, D Bartolomé García Pérez y Dña María Teresa Castells Mora, y evaluado el expediente completo, el consejo de departamento, en sesión celebrada el día 21 de marzo de 2013, y de conformidad con lo establecido en el artículo 21 del "Reglamento por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado de la Universidad de Murcia", resolvió la autorización de presentación de la tesis doctoral

En Murcia, a 21 de marzo de 2013



 Engracia Abad

Fdo.: María Engracia Abad Mateo

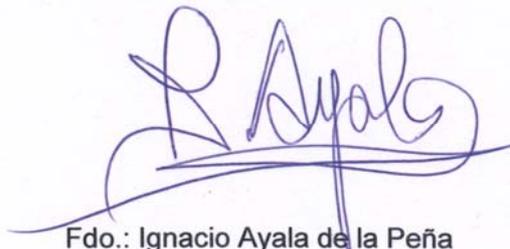


D. Ignacio Ayala de la Peña, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada *"Influencia de la dieta y la terapia con atorvastatina sobre la progresión-regresión de la arteriosclerosis en troncos supra-aórticos y correlación con lesiones hepáticas en un modelo experimental en pollos."*, realizada por Dña María Teresa Sánchez Polo, bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de marzo de 2013



Fdo.: Ignacio Ayala de la Peña

D. Bartolomé García Pérez, Jefe Clínico de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia..

## **A U T O R I Z A**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "*Influencia de la dieta y la terapia con atorvastatina sobre la progresión-regresión de la arteriosclerosis en troncos supraaórticos y correlación con lesiones hepáticas en un modelo experimental en pollos*", realizada por D<sup>a</sup> Maria Teresa Sánchez Polo, bajo mi inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Biología Celular y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 20 de Marzo de 2013





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Dña. María Teresa Castells Mora, Doctora en Biología y profesora asociada del  
Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada *"Influencia de la dieta y la terapia con atorvastatina sobre la progresión-regresión de la arteriosclerosis en troncos supra-aórticos y correlación con lesiones hepáticas en un modelo experimental en pollos."*, realizada por Dña María Teresa Sánchez Polo, bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de marzo de 2013

Fdo.: María Teresa Castells Mora

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia

**Este trabajo experimental ha sido financiado por la Fundación Séneca con los siguientes proyectos:**

Referencia: PI-7/00785/FS/01

Referencia: 05671/PI/07

Referencia: 04542/GERM/06

**Los resultados del presente trabajo han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos y comunicaciones a congresos**

**Artículos:**

Sánchez-Polo MT, Castells MT, García-Pérez B, Martín A, Adánez G, Ayala I. The effect of diet  $\pm$  atorvastatin therapy on supra-aortic trunk atherosclerotic lesions and its association with nonalcoholic fatty liver disease in an experimental chicken model (enviado a Atherosclerosis Supplements)

Sánchez-Polo MT, Castells MT, García Pérez B, Adánez G, Martín A, Ayala I. Caracterización del pollo como biomodelo experimental en arteriosclerosis: lesiones en troncos supra-aórticos. Anales de Veterinaria de Murcia 27: 117-126 (2011)

Martín Castillo A, Castells MT, Adánez G, Sánchez-Polo MT, García Pérez B, Ayala I. Effect of atorvastatin and diet on non-alcoholic fatty liver disease activity score in hyperlipidemic chickens. Biomedicine and Pharmacotherapy 64: 275-281 (2010)

Ayala I, García Pérez B, Doménech G, Sánchez Polo MT, Ortega JV, Castells MT. Estudio de diversos métodos de inducción de aterogénesis

en un modelo experimental de arteriosclerosis en pollos. Anales de Veterinaria de Murcia, 20. 123-127 (2004)

Ayala, I., García Pérez, B., Doménech, G., Montes, A.M., Ortega, N., Ortega, J.V., Sánchez Polo, M.T. Uso del pollo como biomodelo experimental en arteriosclerosis. Anales de Veterinaria de Murcia 19: 99-108 (2003)

### **Comunicaciones a congresos internacionales**

- Sánchez-Polo MT, Castells MT, García Pérez B, Martín A, Adánez MG, Gutierrez Panizo C., Ayala I. Comparison between non-alcoholic fatty liver disease activity and supraaortic vessels atherosclerotic scores in an experimental animal model. Effect of atorvastatin and diet. 18th United European Gastroenterology Week. Barcelona, 23-27 Octubre 2010.
- Martín A, Castells MT, Tvarijonaviciute A, García Pérez B, Sánchez Polo MT, Adánez MG, Tecles F, Ayala I. Correlation between butyrylcholinesterase activity and inflammatory markers in an experimental animal model of steatohepatitis. Effect of atorvastatin and diet. 18th United European Gastroenterology Week. Barcelona, 23-27 Octubre 2010

### **Comunicaciones a congresos nacionales**

- Sánchez Polo MT, Castells MT, Martín MA, Adánez G, Ayala I, Fernández Pardo J, García Pérez B. Estudio experimental de progresión-regresión en troncos supra-aórticos con atorvastatina en aves. XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de

Arteriosclerosis. Madrid, 4-6 Junio 2008. Resumen publicado en la Revista Clínica e Investigación en Arteriosclerosis 20: 19-20 (2008)

- Sánchez Polo MT, Castells MT, Martín MA, Adánez G, Ayala I, Valdés M, García Pérez B. Comparación histológica de hígado graso no alcohólico y troncos supra-aórticos en un modelo hiperlipémico de progresión-regresión experimental. XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Madrid, 4-6 Junio 2008. Resumen publicado en la revista Clínica e Investigación en Arteriosclerosis 20: 54 (2008)
- Fernández Varón E, Cárceles CM, García Pérez B, Ayala I, Doménech G, Sánchez Polo MT. Estudio de las concentraciones estacionarias de atorvastatina y su respuesta farmacológica en un biomodelo de arteriosclerosis experimental en pollos. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Murcia, 2-5 Junio 2004
- Cárceles CM, Fernández Varón E, Ayala I, García Pérez B, Doménech G, Sánchez Polo MT. Biodisponibilidad y farmacocinética de atorvastatina en un biomodelo de arteriosclerosis en pollos. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Murcia, 2-5 Junio 2004
- Ayala I., De Membiela F., García Pérez B., Fernández Pardo J., Valdés M., Ortega J.V., Sánchez M.T., Castells M.T. Efecto de la atorvastatina sobre la regresión de la arteriosclerosis experimental del pollo inducida por la dieta. Reunión del Club español para la Investigación de Dislipemias. Mahón, octubre de 2002.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Castells Mora, por su gran colaboración, su comprensión, paciencia y entrega a lo largo de todo el trabajo de investigación. Gracias por todo el tiempo que me ha dedicado, por los consejos aportados, la enseñanza científica y por ese toque de alegría que la caracteriza.

Al Dr. Bartolomé García Pérez por su confianza plena en mí desde que empezamos a trabajar juntos cuando inicié la residencia de Medicina Interna, su apoyo constante, su ejemplo como clínico e investigador, y su insistencia en hacer realidad un proyecto que ha sido largo e intenso, pero muy gratificante.

Al Dr. Ignacio Ayala de la Peña por su apoyo, aportaciones, enseñanza y comentarios en la elaboración de la tesis y artículos, por estar siempre ahí y por el ánimo que me ha dado en todo momento para seguir adelante y llevar a término el trabajo de experimentación.

A mis compañeros de trabajo dentro del grupo de investigación, Gracia Adánez Martínez, Antonia Martín Castillo y Juan Vicente Ortega Liarte, por todas las horas que hemos compartido en dicho proyecto.

A mis antiguos compañeros de trabajo del Hospital Virgen de la Arrixaca en Murcia, en especial al equipo de la Unidad de Hospitalización a Domicilio, por todo el trabajo y horas compartidas, cuyo tiempo de dedicación a la investigación, coincidió con ellos.

A todos mis nuevos compañeros de trabajo en el Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena, en especial al servicio de Medicina Interna, por la grata bienvenida y apoyo que me han dado.

Al departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina, a la sección de Análisis de Imagen del Servicio de Apoyo a la

Investigación (SAI), al Hospital Clínico Veterinario, de la Universidad de Murcia, y a la empresa Hijos de Juan Pujante y Avícola Levantina, por todas las aportaciones y apoyo prestados, para llevar a cabo este estudio experimental.

A Antonio Maurandi López de la sección de Apoyo Estadístico del SAI, por el asesoramiento realizado.

Para finalizar, dar mi más sincero agradecimiento y dedicación, a mis padres, Mari Tere y Jose Luis, por su gran apoyo y ejemplo que me han dado en la vida; a mis suegros Juani y Juan, por su colaboración; y al resto de familiares y amigos.

Gracias en especial a mi marido Juan Gabriel, por estar en todo momento a mi lado, por sus contribuciones y empujones de esperanza y ánimo. Por último agradecer a mi hijo Jorge, toda su magia e imaginación que me ha aportado, su bondad e inocencia tan maravillosa, que ha sabido convertir los momentos difíciles en historias dulces y fascinantes.

Para que todo esto, siempre permanezca vivo a lo largo del tiempo.

“Muchas gracias a todos”.

## **ACRÓNIMOS**



- Aa:** Densidad de área de  $\alpha$ -actina (área de actina / área de referencia).
- AGL:** Ácidos grasos libres.
- AHA:** American Heart Association (asociación americana del corazón).
- AIT:** Accidente isquémico transitorio.
- ALT:** Alanina aminotransferasa.
- AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico.
- Apo A-1:** Apolipoproteína A-1.
- ARA II:** Antagonistas del receptor de la angiotensina II.
- AST:** Aspartato aminotransferasa.
- ATP-III:** Adult treatment Panel (ATP) III criteria. (Programa norteamericano para la detección, evaluación y tratamiento de la hipercolesterolemia en adultos).
- CA:** Coeficiente aterogénico.
- CAM:** Moléculas de adhesión celular.
- CEP:** Células endoteliales progenitoras.
- CETP:** Proteína de transferencia de ésteres de colesterol.
- c-HDL:** Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.
- CHOD-PAP:** Método enzimático colesterol / esterasa colesterol oxidasa / peroxidasa.
- CI:** Cardiopatía isquémica.
- c-LDL:** Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.
- CML:** Célula muscular lisa.
- Cox-2:** ciclooxigenasa-2.
- DAB:** Diaminobencidina.
- DIA:** Densidad integrada de  $\alpha$ -actina.
- DM tipo 2:** Diabetes Mellitus tipo 2, no insulín dependiente.
- DMS:** Mínimas diferencias significativas.
- DPX:** Material sintético adhesivo con un índice de refracción similar al vidrio empleado como medio de montaje.
- EAP:** Enfermedad arterial periférica.
- EGHNA:** Enfermedad grasa hepática no alcohólica.
- EHNA:** Esteatohepatitis no alcohólica.
- eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial.
- FA:** Fosfatasa alcalina.

**FMV:** Flujo mediado por vasodilatación.

**FNT:** Factor de necrosis tumoral.

**FNT- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa.

**FT:** Factor tisular.

**GGT:** Gamma glutamil transpeptidasa.

**GIM:** Grosor íntima media.

**GOT:** aspartato aminotransferasa.

**HAI:** Índice de actividad histológico.

**H4B:** Tetrahidrobiopterina.

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad.

**H-E:** Hematoxilina-eosina.

**HMG-CoA:** Hidroximetil glutaril coenzima A.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**HPS:** Heart Protection Study.

**HTA:** Hipertensión arterial.

**IC:** Ictus isquémico.

**ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular-1.

**IDL:** Lipoproteína de densidad intermedia.

**IECA:** Inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina.

**IL:** Interleucina.

**IMC:** Índice de masa corporal.

**LEI:** Lámina elástica interna.

**LEE:** Lámina elástica externa.

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad.

**LDLox:** Lipoproteína de baja densidad oxidada.

**LXR:** Receptores hepáticos X.

**MCP-1:** Proteína quimiotáctica para monocitos.

**MIRACL:** Myocardial Ischemia Reduction with Agressive Colesterol Lowering.

**MMP:** Metaloproteinasas.

**NADPH:** Enzima nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato.

**NAFLD:** Nonalcoholic fatty liver disease. (Enfermedad hepática grasa no alcohólica).

**NAS:** NASH Activity Score. (Índice de actividad de la esteatohepatitis no alcohólica).

**NASH:** Nonalcoholic steatohepatitis. (Esteatohepatitis no alcohólica).

**NO:** Óxido nítrico.

**NRS:** Suero normal de conejo.

**O<sup>-</sup>:** Superóxido.

**OH<sup>-</sup>:** Hidroxilo.

**PA:** Activador del plasminógeno.

**PAI:** Inhibidor del activador del plasminógeno.

**PBS:** Solución tampón fosfato salino.

**PCR:** Proteína C reactiva.

**PGI<sub>2</sub>:** Prostaciclina.

**PPAR:** Receptores activados por proliferadores peroxisómicos.

**ProBNP:** Pro-hormona péptido natriurético tipo B.

**Rho:** Proteína isoprenilada.

**RI:** Resistencia a la insulina.

**RM:** Resonancia magnética

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**RNA<sub>m</sub>:** Ácido ribonucleico mensajero.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**SCA:** Síndrome coronario agudo.

**SEM:** Error estándar de la media

**SM:** Síndrome metabólico.

**TAC:** Tomografía axial computerizada.

**TG:** Triglicéridos.

**TLR<sub>4</sub>:** Receptor Toll-Like 4.

**t PA:** Activador del plasminógeno tisular.

**TxA<sub>2</sub>:** Tromboxano A<sub>2</sub>.

**TRC:** Transporte reverso de colesterol.

**US:** Ultrasonográfico.

**VCAM-1:** Molécula de adhesión celular vascular-1.

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular.

**VLDL:** Lipoproteína de muy baja densidad.

**Vv:** Densidad de volumen  $\alpha$ -actina.

<b>INDICE</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
INTRODUCCIÓN DE LA IMPORTANCIA DE LA ARTERIOSCLEROSIS Y SU INCIDENCIA EN LA POBLACIÓN	3
<b>CAPÍTULO 1. DEFINICIÓN HISTOLÓGICA Y DESARROLLO DE LA LESIÓN ARTERIOSCLERÓTICA</b>	9
1.1. DEFINICIÓN HISTOLÓGICA Y DESARROLLO DE LA LESIÓN ARTERIOSCLERÓTICA	11
1.1.1 INTIMA NORMAL	12
1.1.2. LESIONES TEMPRANAS	15
1.1.3. LESIONES AVANZADAS	17
1.1.4. NOMENCLATURA ACTUAL	20
1.2. ENFERMEDAD ATEROTROMBÓTICA	21
1.2.1. ROTURA DE LA PLACA	23
1.2.2. SANGRE VULNERABLE O DE ALTO RIESGO	26
1.2.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	27
1.2.4. EL MONOCITO Y LOS “VASA VASORUM”	30
1.2.5. TROMBOSIS	31
1.2.6. EL CRECIMIENTO DE LA PLACA	34
1.3. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	35
1.3.1. FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES	36
1.3.1.1. ANATOMÍA VASCULAR DEL CORAZÓN	36
1.3.1.2. GENÉTICA	36
1.3.1.3. EDAD	37
1.3.1.4. SEXO	38
1.3.2. FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES	38
1.3.2.1. TABAQUISMO	38
1.3.2.2. SEDENTARISMO	39
1.3.2.3. HIPERTENSIÓN	40
1.3.2.4. HIPERCOLESTEROLEMIA	41
1.3.2.5. OBESIDAD	43
1.3.2.6. HIPERGLUCEMIA E HIPERTRIGLICERIDEMIA POST-PRANDIAL	44
1.3.2.7. DIABETES MELLITUS	45
1.3.2.8. HOMOCISTEÍNA	46
1.3.2.9. SÍNDROME METABÓLICO (ASOCIACIÓN DE FACTORES DE RIESGO)	47
1.4. BIOMARCADORES DE LESIÓN ARTERIOSCLERÓTICA	49
1.4.1. PCR	50
1.4.2. FIBRINÓGENO	52
1.4.3. INHIBIDOR DEL ACTIVADOR TISULAR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1 (PAI-1)	52
1.4.4. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA E INTERLEUCINA 6	52
1.4.5. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR SOLUBLES	53
1.4.6. MICROALBUMINURIA	53
1.5. DETECCIÓN PRECOZ DE ARTERIOSCLEROSIS MEDIANTE PRUEBAS DE IMAGEN NO INVASIVAS	54
1.5.1. ECOGRAFÍA CAROTÍDEA	54
1.5.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	56

<b>CAPÍTULO 2. HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO</b>	59
2.1. LESIÓN PARENQUIMATOSA EN LA ENFERMEDAD GRASA HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA (EGHNA)	64
2.1.1. ESTEATOSIS	64
2.1.2. ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (EHNA)	65
2.1.3. CIRROSIS	67
2.2. SISTEMA DE PUNTUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EHNA	68
2.2.1. GRADACIÓN DE LA ESTEATOHEPATITIS	68
2.2.2. ESTADIFICACIÓN DE LA EHNA	69
2.2.3. PUNTUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA SEVERIDAD	70
2.2.4. INDICE DE ACTIVIDAD DE LA EGHNA (NAS)	72
<b>CAPÍTULO 3. CORRELACIÓN DE LAS LESIONES ARTERIOSCLERÓTICAS EN TRONCOS SUPRA-AÓRTICOS Y LAS LESIONES DE EGHNA</b>	75
<b>CAPÍTULO 4. TERAPIA CON ESTATINAS: ATORVASTATINA</b>	85
4.1. EMPLEO DE ESTATINAS EN LA ENFERMEDAD GRASA HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA	90
4.2. EMPLEO DE ESTATINAS EN LA ARTERIOSCLEROSIS CAROTÍDEA	95
4.2.1. FUNCIÓN ENDOTELIAL	96
4.2.2. INFLAMACIÓN	97
<b>CAPÍTULO 5. OBJETIVOS</b>	101
<b>CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	107
6.1. ANIMALES Y DIETAS	109
6.2. FASES DEL ESTUDIO	110
6.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	112
6.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PLASMA	114
6.5. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS CONVENCIONALES	114
6.6. VALORACIÓN SEMICUANTITATIVA MODIFICADA DE LOS GRADOS DE LESIÓN DE STARY	115
6.7. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS	116
6.8. VALORACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN DE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS-DENSITOMÉTRICOS DE LOS TRONCOS SUPRA-AÓRTICOS	117
6.9. COEFICIENTE ATEROGÉNICO	121
6.10. VALORACIÓN HISTOLÓGICA DEL HÍGADO	122
6.11. COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE ATEROGÉNICO (CA) Y EL ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD DE ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (NAS)	124
6.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS MORFOMÉTRICOS	125
<b>CAPÍTULO 7. RESULTADOS</b>	127
7.1. RESULTADOS BIOQUÍMICOS	129
7.2. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA	131
7.3. VALORACIÓN SEMICUANTITATIVA MODIFICADA DE LOS GRADOS DE LESIÓN DE STARY	134
7.4. VALORACIÓN MORFOMÉTRICA-DENSITOMÉTRICA POR ANÁLISIS DE IMAGEN	137
7.4.1. GROSOR DE LA CAPA MEDIA	137
7.4.2. GROSOR Y ÁREA DE LA CAPA ÍNTIMA	140
7.4.3. GROSOR DE LA PLACA DE ATEROMA	144

7.4.4. VALORACIÓN DE LA NEOÍNTIMA	147
7.4.5. ÁREA DEL VASO	152
7.4.6. DIÁMETRO DEL VASO, MÁXIMO O EXTERNO	155
7.4.7. DIÁMETRO DE LA LUZ, MÍNIMO O INTERNO	156
7.4.8. GROSOR DE LA PARED	157
7.4.9. GRADO DE OCLUSIÓN DEL VASO	158
7.4.10. RELACIÓN PARED/LUZ	161
7.4.11. COEFICIENTE ATEROGÉNICO	162
7.4.12. COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE ATEROGÉNICO Y EL ÍNDICE DE LA ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (NAS)	163
<b>CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN</b>	171
8.1. MODELO ANIMAL	173
8.2. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PLASMA	175
8.3. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA	178
8.4. VALORACIÓN SEMICUANTITATIVA MODIFICADA DE LOS GRADOS DE LESIÓN DE STARY	183
8.5. GROSOR DE LA CAPA MEDIA	186
8.6. GROSOR DE LA CAPA ÍNTIMA	187
8.7. GROSOR DE LA PLACA DE ATEROMA	191
8.8. VALORACIÓN DE LA NEOÍNTIMA	196
8.9. GRADO DE OCLUSIÓN DEL VASO	199
8.10. RELACIÓN PARED/LUZ	201
8.11. COEFICIENTE ATEROGÉNICO (CA)	203
8.12. CORRELACIÓN HÍGADO-TRONCOS SUPRA-AÓRTICOS (NAS-CA)	205
<b>CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES</b>	215
<b>CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA</b>	221

# **INTRODUCCIÓN**



## **IMPORTANCIA DE LA ARTERIOSCLEROSIS Y LA ENFERMEDAD GRASA HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA Y SU INCIDENCIA EN LA POBLACIÓN**

La arteriosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de la pared vascular, desencadenada por factores tanto locales (hemodinámicos), como sistémicos (por ejemplo, hipercolesterolemia, hipertensión, infecciones virales, inmunocomplejos, etc.), que se inicia en la primera infancia y que progresa de manera asintomática hasta la vida adulta. La disfunción endotelial es un trastorno sistémico y reversible, implicado en la atracción de células inflamatorias hacia la pared vascular y en el inicio de la arteriosclerosis, constituyendo el proceso patológico más precoz de la aterotrombosis (Behrendt y Ganz, 2002; Weiss y col., 2002), definida como una rotura de la placa aterosclerótica con trombosis superpuesta, y es la causa principal de mortalidad en el mundo occidental. Por tanto el término de “aterotrombosis”, recoge tanto a la aterosclerosis como sus complicaciones trombóticas.

En las etapas tardías de la vida, esta compleja enfermedad se manifiesta clínicamente causando la mayoría de los episodios patológicos cardiovasculares, entre los que se incluyen la cardiopatía isquémica (CI), el ictus isquémico (II), el accidente isquémico transitorio (AIT), y la enfermedad arterial periférica (EAP). Desde el punto de vista clínico, esta enfermedad se debe considerar una entidad patológica única que afecta a distintos territorios vasculares, como son el coronario, el cerebral y el vascular periférico. Así, cuando un paciente se presenta por síntomas en un territorio, el 25-30% tiene ya una manifestación en otro territorio, y un 5-10% tiene ya los tres territorios afectados (Viles-González y col., 2004).

La enfermedad cardiovascular es hoy en día la primera causa de mortalidad en Estados Unidos, llega al 80% por encima de los 60 años (Hajjar y Kotchen, 2003) y también en Europa, tanto en hombres como en mujeres, seguida a distancia del cáncer. En nuestro país, en España, representa el 40% del total de defunciones. A partir de los años 60,

coincidiendo con la creación de unidades coronarias y un mayor manejo del infarto de miocardio, se ha retrasado la mortalidad unos diez años más tarde en los pacientes con enfermedades cardiovasculares. En cambio, paradójicamente la incidencia de la enfermedad está subiendo. Son los tratamientos y no la prevención, ya que el número de enfermos aumenta. Según el Consejo Mundial de la Salud, comparando el año 1990 con la predicción para el 2020: en los países desarrollados la incidencia está aumentando, como ya se ha comentado, en límites del 29% en la mujer y del 48% en el hombre. Pero en los países que se están desarrollando sube al 120% en la mujer y al 137% en el hombre (Yusuf y col., 2001). Esto supone una verdadera epidemia de gran envergadura, con repercusiones económicas muy preocupantes para poder mantener este ritmo y alargar la vida de la manera que se está haciendo.

La incidencia de enfermedad cardiovascular, es debida a la diabetes mellitus (DM), obesidad, hipertensión arterial (HTA), tabaco y síndrome metabólico. Así las predicciones indican que se va a producir un incremento extraordinario en la prevalencia de la enfermedad cardiovascular durante los próximos años debido al aumento de la obesidad y la diabetes en la población general (Fuster, 2008). Tan tremenda explosión ha llevado a destacar el papel de la prevención en las últimas décadas en los países desarrollados. Sin embargo, desde el punto de vista histórico esto constituye una acusada paradoja, pues en el más antiguo Tratado de Medicina Interna conocido (Nei Ching, atribuido al “emperador amarillo” Huang Ti, 2650 a.C.), ya se afirma categóricamente: “Los doctores superiores previenen la enfermedad, los doctores mediocres la tratan antes de ser evidente y los doctores inferiores la tratan una vez desarrollada”.

La naturaleza crónica del proceso ateromatoso, que se inicia en las primeras décadas de la vida, conduce a la formación de la placa fibrosa, que consiste en una acumulación de material lipídico y proteoglicanos, elementos celulares, tejido fibroso y depósitos de calcio. Según la

Asociación Americana del Corazón, las lesiones ateroscleróticas se clasifican en ocho tipos, según su grado de progresión (Stary, 2000).

Las lesiones ateroscleróticas, a medida que se desarrollan, pueden limitar eventualmente el flujo sanguíneo y producir síntomas de isquemia crónica. Por el contrario, si la progresión es rápida debido a una rotura de la placa acompañada de complicaciones trombóticas, se producen los síndromes agudos (Fuster y col., 1992). La composición de la placa aterosclerótica, más que su tamaño (gravedad de la estenosis), se considera el mayor determinante en el desarrollo de los síndromes agudos mediados por trombosis. De hecho, observaciones clínicas y patológicas indican que las placas con alto contenido en lípidos (lípidos extracelulares) son más vulnerables y trombogénicas que las que son ricas en colágeno.

Existen diversos factores de riesgo cardiovascular que se han asociado al incremento de la trombogenicidad sanguínea y de la placa, tales como la elevación del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), niveles bajos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL), el tabaquismo, la obesidad, la HTA, la hiperglucemia e hipertrigliceridemia transitoria, la DM y la inactividad física. También se han propuesto diversos biomarcadores como factores predictivos significativos de la aterosclerosis y de sus complicaciones trombóticas (Viles-González y col., 2004); así pues hay marcadores de inflamación (proteína C reactiva "PCR", interleucinas, ligando CD40, amiloide sérico A, y moléculas de adherencia vascular y celular) y por otro lado, marcadores de trombosis (fibrinógeno, factor de Von Willebrand, inhibidor del activador del plasminógeno-1, fibrinopéptido A y fragmento de protrombina).

En los últimos años se ha demostrado, en diferentes estudios clínicos, que el tratamiento con inhibidores de la hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa o estatinas, muestra acciones beneficiosas sobre las enfermedades cardiovasculares. El efecto observado en la clínica tras el tratamiento con estatinas es mayor que el esperado, por la reducción

de los valores lipídicos. Estos datos sugieren la existencia de efectos producidos por las estatinas independientes de su acción hipolipemiante (Badimon y Vilahur, 2011). El concepto de arteriosclerosis pues, como enfermedad inflamatoria, ha permitido avanzar en el conocimiento de esta enfermedad y en la investigación terapéutica.

Dada la complejidad del desarrollo de la lesión aterosclerótica en el ser humano, resultaría interesante investigar en modelos animales en los que dicho desarrollo fuera más semejante a la enfermedad humana. No obstante, la mayoría de estos experimentos han sido realizados en conejos, animales herbívoros y cuadrúpedos, que de forma espontánea, no desarrollan arteriosclerosis, siendo ésta inducida por una dieta hipercolesterolemia con concentraciones séricas de colesterol muy por encima de las que se observan en la clínica humana, resultando ser una arteriosclerosis predominantemente xantomatosa, con gran variabilidad individual en su extensión. En consecuencia, nuestro grupo propone el modelo animal de aves para el estudio de la arteriosclerosis por ser bípedos, omnívoros, hipercolesterolémicos, e hiperglucémicos, que desarrollarán lesiones aterosclerosas espontáneas en la aorta abdominal con concentraciones de colesterol próximas a las de los humanos, así como por su fácil manejo y coste (Ayala y col., 2003; Ayala y col., 2004; Ortega y col., 2004). A partir de experiencias previas de nuestro grupo de investigación, se pudo comprobar que los pollos alimentados con huevos eran un buen modelo de experimentación en arteriosclerosis y que los antagonistas del calcio (verapamilo, nifedipino y diltiazem) producían una disminución de los niveles lipídicos en sangre y en aorta, con una disminución en la extensión de las placas arteriosclerosas, tanto macroscópicamente como microscópicamente (García Pérez, 1992; García Pérez y col., 2003 y 2005; Ayala y col., 2005). Posteriormente se reprodujo el modelo experimental en pollos aterogénicos alimentados con dieta rica en colesterol, observando disminución de la placa arteriosclerosa en el grupo al que se le había administrado atorvastatina (Ortega, 2002; Ortega y col., 2002).

Dada la lógica limitación de estos estudios en la especie humana, desde un punto de vista diagnóstico (uso únicamente de técnicas por imagen, ecografía, angiografía, TAC...) y también de diseño experimental, nuestro biomodelo permitirá reproducir los procesos fisiopatológicos y abordajes clínico-dietéticos que se practican en el hombre, permitiendo además una valoración exacta de las lesiones, merced al análisis histopatológico.

Actualmente, desde el punto de vista clínico, se relacionan por métodos no invasivos (ecografía) la probabilidad de eventos cardiovasculares con la afectación del grosor íntima-media y/o desarrollo de placas ateromatosas en carótida (Junyent y col., 2005), de ahí la importancia de valorar estos procesos en troncos supra-aórticos, siendo una técnica no invasiva, con gran fiabilidad, reproducibilidad y de bajo coste, lo cual permite una estratificación del riesgo cardiovascular más allá de los factores de riesgo convencionales.

Por otro lado, dada la importancia que está adquiriendo en las sociedades desarrolladas el síndrome metabólico y patologías relacionadas, resulta muy interesante el cuantificar y comparar los procesos de arteriosclerosis en troncos supra-aórticos con la enfermedad grasa hepática no alcohólica (EGHNA).

En la actualidad, la EGHNA es la enfermedad hepática más prevalente en los países desarrollados, con una prevalencia de hasta el 30%. Es un espectro anatomoclínico que abarca desde la esteatosis simple, a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) donde además de la infiltración grasa se puede acompañar de actividad necroinflamatoria, y a cirrosis grasa, pudiendo ésta conducir a carcinoma hepatocelular. Contribuyen a ello los factores medioambientales como la obesidad y el sedentarismo, la resistencia a la insulina y el estrés oxidativo, junto a una predisposición genética; y se asocia de manera independiente a una disfunción endotelial y a placas, así como a placas y engrosamiento de la capa íntima de las carótidas (Moreno Sánchez, 2009).

Para su diagnóstico, la prueba fundamental es la biopsia hepática con el fin de realizar una gradación y estadificación lesional del hígado, sin embargo la biopsia tiene en su contra no sólo el ser un procedimiento invasivo y costoso, sino también la variabilidad de la muestra. Por ello los investigadores se esfuerzan en encontrar un método no invasivo, barato, reproducible y de seguridad diagnóstica suficiente. Se han desarrollado y validado estudios con un sistema de predicción de la fibrosis (Angulo y col., 2007) basado en seis variables clínicas y analíticas, la edad, glucemia, índice de masa corporal (IMC), plaquetas, albúmina y cociente entre la aspartato aminotransferasa (GOT) y la alanina aminotransferasa (ALT), en una cohorte de 733 individuos, pudiendo haber evitado la biopsia en el 75% de los casos.

Las dificultades previas en su diagnóstico, y las añadidas al estudio de todos los factores involucrados en la EGHNA en la población humana, los estudios en modelos animales proporcionan una perspectiva crucial en la patogénesis de la esteatohepatitis. Así nuestro trabajo de investigación tiene la ventaja de emplear el mismo modelo animal en el que se encuentra esta alteración junto con la arteriosclerosis en troncos supra-aórticos, al darles una dieta hiperlipémica, lo que nos permite comparar histológicamente de forma paralela ambas afectaciones en un mismo grupo experimental (Adánez y col., 2005; Martín Castillo y col., 2005).

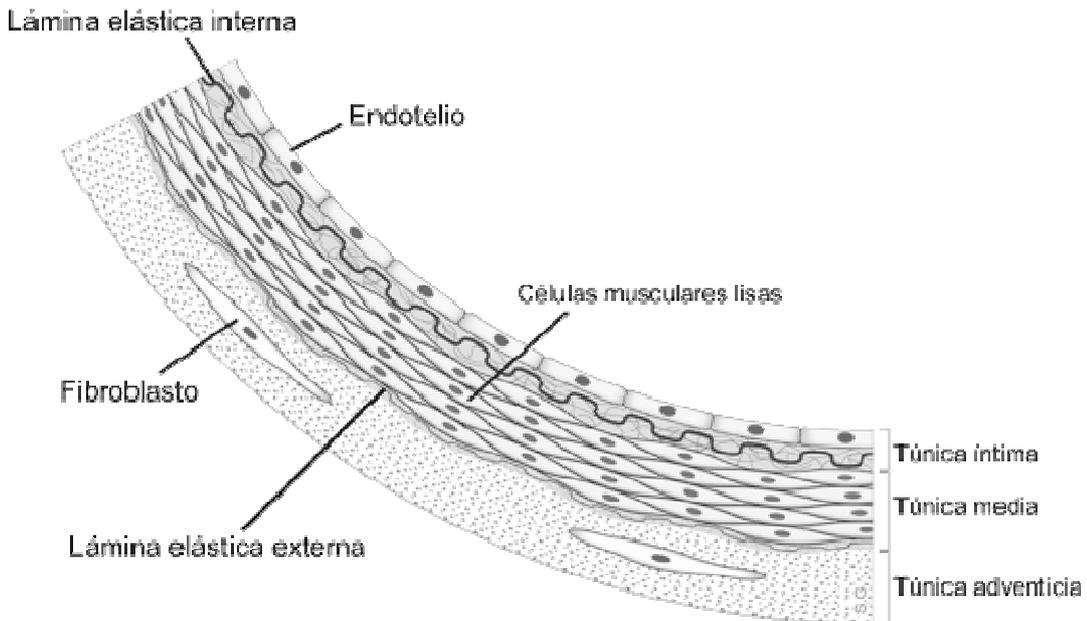
## **Capítulo 1**

# **DEFINICIÓN HISTOLÓGICA Y DESARROLLO DE LA LESIÓN ARTERIOSCLERÓTICA**



## 1.1. DEFINICIÓN HISTOLÓGICA Y DESARROLLO DE LA LESIÓN ARTERIOSCLERÓTICA

Histológicamente la pared arterial está constituida por 3 capas o tunicas: íntima, media y adventicia (Fig. 1).



**Fig. 1.** Esquema de la estructura histológica en las arterias.

(Modificado de Stijn A.I. Ghesquiere 2005).

Las lesiones arterioscleróticas (ateroma) son engrosamientos focales de la capa más interna de la arteria, la íntima. El Comité sobre Lesiones Vasculares de la American Heart Association (AHA) realizó hace algunos años, una clasificación de las lesiones arterioscleróticas humanas, basadas en la estructura y composición histológica, designada en números romanos, indicando así la frecuente secuencia de progresión de la lesión. Describió la íntima arterial normal y las regiones propensas a arteriosclerosis, pues representan engrosamientos adaptativos de la íntima, de tipo excéntrico, a fuerzas mecánicas locales (Stary y col., 1992). La estría grasa inicial y las lesiones intermedias (tipo I, II y III), que no producen manifestaciones clínicas (Stary y col., 1994); las lesiones avanzadas (tipo IV, V y VI) y sus precursores (Stary y col., 1995),

obtenidas en su mayoría de muestras humanas durante intervenciones terapéuticas o en autopsias. Y por último, han realizado una clasificación actualizada de las lesiones arterioscleróticas, con su nomenclatura (Stary 2000).

### **1.1.1. Intima normal**

En primer lugar (Stary y col., 1992), revisan la definición de íntima normal como la región de la pared arterial incluida entre la superficie endotelial hacia la luz, y el margen luminal en la media. La lámina elástica interna (LEI), generalmente considerada como parte de la media, marca el borde entre íntima y media. Sin embargo, la LEI está ausente en algunas zonas de la pared arterial, coincidiendo con transiciones geométricas (bifurcaciones, trifurcaciones, ramas arteriales y curvaturas), por lo que la demarcación entre íntima y media puede ser difícil en estos casos.

La íntima está compuesta por dos capas, una interna adyacente a la luz y al endotelio, llamada capa proteoglicana, por contener abundante tejido conectivo no fibroso finamente reticulado, identificado como proteoglicanos por microscopía electrónica (Wight y Ross, 1975; Richardson y col., 1988). En esta capa las fibras elásticas son escasas y contienen aislados macrófagos y aisladas células musculares lisas de fenotipo sintético (ricas en retículo endoplasmático rugoso). En cultivos celulares, este fenotipo sintético, puede sintetizar una amplia variedad de componentes de la matriz intercelular (Burke y Ross, 1979).

La otra capa, se encuentra por debajo de la capa de proteoglicanos y adyacente a la media, se denomina musculoelástica, por la abundancia de células musculares lisas y fibras elásticas, con mayor cantidad de colágeno que la anterior. Estas células musculares lisas son de fenotipo contráctil (ricas en miofilamentos) y organizadas en capas.

Así entre los componentes celulares más importantes de la íntima, se encuentran las células endoteliales y las células musculares lisas. Los macrófagos se encuentran aisladamente, y los mastocitos en arterias normales se han descrito por varios autores (Sundberg, 1955; Pollak, 1957; Stary, 1990), pero son relativamente raros y no se encuentran en todas las personas. Por tanto, la población de mastocitos es baja pero, conforme progresa el proceso arteriosclerótico, su número aumenta, como ocurre con los macrófagos y los linfocitos T. El citoplasma de los macrófagos contiene gránulos con una serie de mediadores, como la histamina o las citoquinas, así como dos proteasas principales: triptasa y quimasa, que tienen que activarse para liberar el contenido de sus gránulos. Dependiendo del tejido y el tipo de estimulación, varía el grado de degranulación del mastocito, que es completa en caso de shock anafiláctico o parcial y reiterado en las placas de ateroma. La mayoría de los mediadores liberados por los mastocitos activados tienen propiedades proinflamatorias (Lindstedt y Kovanen, 2004). El grado de degranulación de los mastocitos es mayor en las áreas con abundante infiltrado inflamatorio, macrófagos y linfocitos T, lo que sugiere que la activación y la degranulación de los mastocitos es de origen inflamatorio.

Las células endoteliales forman una capa continua de células poligonales, alargadas y aplanadas. El eje longitudinal de la célula endotelial está orientado en la dirección del flujo, a excepción de las áreas de flujo turbulento y desplazamientos suaves de cizalla. La superficie luminal está revestida por un glucocáliz, con una variedad de receptores de membrana para LDL nativo y modificado (Fogelman y col., 1988), insulina (Bar, 1982) e histamina (Simionescu y col., 1982), con un recambio de células endoteliales variable y que disminuye con la edad.

El endotelio arterial es permeable a todas las proteínas plasmáticas. La frecuencia de transporte de las lipoproteínas y de otras macromoléculas a través del endotelio, parece ser dependiente de las concentraciones plasmáticas y del tamaño y carga de las partículas o proteínas, así como

de la localización a lo largo del árbol arterial, de la edad, de la presión sanguínea y del tono vascular del individuo (Hüttner y col, 1973a, 1973b).

El endotelio sano tiene propiedades de trombo-resistencia, actúa como una barrera de protección anticoagulante, por el contenido de trombomodulina en la membrana plasmática luminal y su habilidad para unirse a la trombina (Owen y Esmon, 1981), por lo que ésta pierde su capacidad hemostática (conversión del fibrinógeno en fibrina y activación plaquetaria). El complejo trombomodulina-trombina, activa a la proteína C, que se une como cofactor a la proteína S producida por el endotelio, e inactiva el factor Va de la coagulación y el factor VIII. Así pues, metaboliza rápidamente agentes que agregan plaquetas, y sintetiza y secreta prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Thorgeirsson y Robertson, 1978) y activador del plasminógeno (PA) (Levin y Loskutoff, 1982), el cuál activa la plasmina y promueve la trombólisis. Por el contrario, el endotelio también produce agentes que promueven la coagulación como el factor tisular (FT), el factor de Von Willebrand y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) (Davignon y Ganz, 2004).

El endotelio arterial normal no permite la adherencia de grandes números de leucocitos. Sin embargo, en estudios que muestran activación de células endoteliales de venas umbilicales humanas, con citoquinas, tales como interleucina-1 y factor de necrosis tumoral (FNT), o LDL oxidadas, hay un incremento de la adherencia de leucocitos debido a la expresión de moléculas de adherencia específicas de leucocitos (Bevilacqua y col., 1987; Rothlein y col., 1986; Berliner y col., 1990).

Por otro lado, las células endoteliales normales son muy importantes en la regulación del tono vascular. Las células endoteliales aórticas porcinas y humanas, y las células musculares lisas, sintetizan y secretan óxido nítrico (NO) y PGI<sub>2</sub>. Esto previene la agregación plaquetaria y causa vasodilatación por su capacidad para estimular la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) (Moncada y col., 1977; Spector, 1988). El óxido nítrico se produce a partir de la oxidación del nitrógeno terminal de

la guanidina de la L-arginina, a través de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS), que convierte la arginina intracelular en citrulina y óxido nítrico (NO). La acumulación del calcio intracelular, inducido por los neurotransmisores, estimula la eNOS. El óxido nítrico se estimula por el estrés tangencial (fuerzas de cizalla) del arrastre del flujo sanguíneo, con lo que adecúa la luz de los vasos. También secretan otra sustancia llamada factor relajante derivado del endotelio.

Las células endoteliales provocan vasoconstricción a través de un péptido llamado endotelina, por activación de los canales dependientes de calcio en las células musculares lisas; la angiotensina II y el tromboxano A<sub>2</sub>. Asimismo, participa en el catabolismo de los triglicéridos y de las partículas ricas en lípidos, a través de la lipoprotein-lipasa extrahepática. Y finalmente, es capaz de transformar los impulsos mecánicos en señales biológicas, y dada su estratégica posición, detecta la presencia de una serie de estímulos sistémicos modificando su función en respuesta a los mismos (Verma y Anderson, 2002).

El engrosamiento normal de una arteria debe reconocerse dentro de un rango cuantitativo amplio, llamado ratio media. Este ratio en arterias normales de humanos puede variar desde 0´1 a 1 (Stary, 1987). En muestras obtenidas de arterias de sujetos sanos de todas las edades, y en animales, se han encontrado segmentos gruesos. Estos engrosamientos pueden ser focales (excéntricos) o de forma más extensa (difusos), y representan adaptaciones fisiológicas a los cambios de flujo y de tensión en la pared. Las estructuras de estos engrosamientos adaptativos están compuestas por elementos normales, a diferencia de los cambios arterioscleróticos, descritos más adelante, y son regiones propensas a la formación de arteriosclerosis (Stary y col., 1992).

### **1.1.2. Lesiones tempranas**

En segundo lugar (Stary y col., 1994), definen la estría grasa inicial y las lesiones intermedias (tipo I, II, III). Ambas lesiones de los tipos I (lesión

inicial) y II, representan pequeños depósitos lipídicos (lipoproteínas y ésteres de colesterol) en la íntima arterial, y el tipo II incluye aquellas lesiones generalmente llamadas “estrías grasas”, siendo visibles por lo general a simple vista como estrías amarillentas sobre la superficie de la íntima. Los cambios en la composición de la matriz y arquitectura de la íntima, son mínimos o ausentes. Hay pequeños grupos aislados de macrófagos cargados con gotas lipídicas (células espumosas) en el tipo I. Microscópicamente el tipo II consiste en capas de células espumosas macrofágicas estratificadas, y en menor cantidad células musculares lisas ricas en retículo endoplasmático rugoso (fenotipo sintético) cargadas de lípidos. Se han identificado también linfocitos T, pero en menos cantidad que los macrófagos, y células “mastoides” aisladas. Estas lesiones están ya presentes en lactantes (Stary y col., 1994). La capacidad de los macrófagos para acumular grandes cantidades de lípidos depende de la expresión de sus receptores “scavenger” o basureros (Matsumoto y col., 1990; Ylä-Herttuala y col., 1991). Así se ha observado que la hipercolesterolemia causa incremento de la adherencia de monocitos al endotelio en animales de experimentación, en cerdos (Gerrity, 1981), palomas (Lewis y col., 1985), conejos (Rosenfeld y col., 1987) y monos (Faggiotto y col., 1984), particularmente sobre regiones propensas de la íntima.

Es evidente que ciertas lesiones tipo II avanzan a tipo III, representando éstas una lesión intermedia (pre-ateroma), con las lesiones más avanzadas. En este tipo, hay aislados acúmulos de lípidos extracelulares, por debajo de las capas de macrófagos.

Las lesiones arterioscleróticas son consideradas avanzadas por criterios histológicos, cuando las acumulaciones de lípidos, células y componentes de la matriz, incluyendo minerales, provocan una desorganización estructural, daño y engrosamiento de la íntima, con deformidad de la pared arterial. Estas lesiones arterioscleróticas pueden progresar sin comprometer la luz debido a la dilatación compensadora del calibre vascular, lo que se denomina remodelación positiva (Glagov y col., 1987).

### **1.1.3. Lesiones avanzadas**

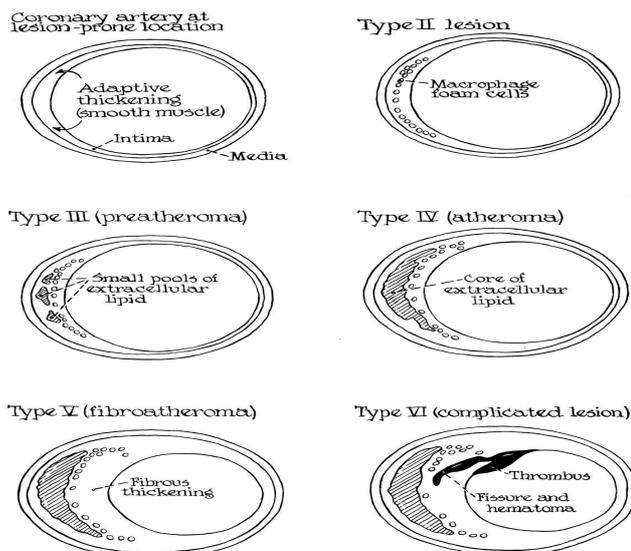
En tercer lugar, las lesiones avanzadas, como se ha comentado previamente se dividen en tres tipos: IV, V y VI. Las lesiones tipo IV (ateroma) presentan una acumulación extensa y bien definida en la íntima de lípidos extracelulares (core lipídico), de tipo excéntrica, con desorganización de la íntima. Entre el core lipídico y la superficie endotelial, la íntima contiene macrófagos y aisladas células musculares lisas, con y sin inclusiones lipídicas, sobre todo en la periferia de la lesión, inmersos en una capa rica en proteoglicanos, con mínimo colágeno, lo que la hace susceptible a la formación de fisuras (tipo VI), de ahí su gran importancia en la clínica, al desarrollar complicaciones súbitamente. Son frecuentes desde la tercera década de la vida.

Debido a la desorganización del core lipídico en las células y en la estructura de la matriz intercelular de la íntima, se forma nuevo tejido conectivo reparador formado por colágeno y células musculares lisas ricas en retículo endoplásmico rugoso, dando lugar a la lesión tipo V. Los capilares en los márgenes del core lipídico pueden ser más numerosos que en el tipo IV. Así pues, cuando el nuevo tejido es parte de una lesión con core lipídico se denomina fibroateroma o tipo Va. Estos pueden formar varias capas, con varios cores lipídicos separados por capas espesas de tejido conectivo fibroso, amontonados irregularmente uno sobre otro, llamado fibroateroma multiestratificado. El core lipídico más profundo y cercano a la media puede haberse formado el primero, lo cuál se explica por repetidas disrupciones de la superficie de la lesión, hematomas y depósitos trombóticos. Si predominan depósitos de minerales, que reemplazan los restos acumulados de células muertas y los lípidos extracelulares, se denomina tipo Vb o lesiones calcificadas. Y si el core lipídico está ausente o es mínimo, se denomina tipo Vc o lesiones fibróticas. Estas lesiones fibróticas pueden ser el resultado de varios procesos, incluyendo la organización del trombo, la extensión del

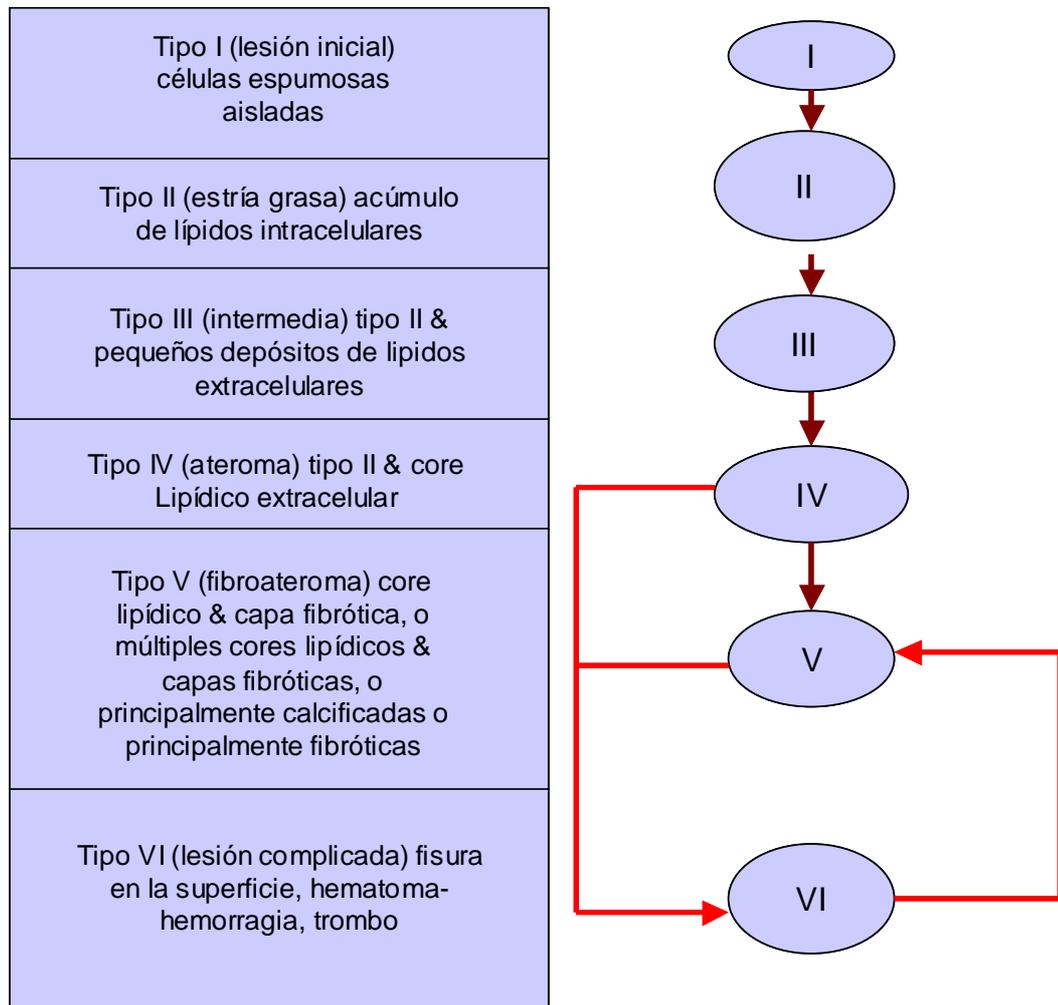
componente fibroso de un fibroateroma adyacente o la regresión del core lipídico. Son más evidentes en arterias de extremidades inferiores.

Como en el tipo IV, las lesiones tipo V, pueden desarrollar fisuras, hematomas y/o trombos (lesión tipo VI, lesión complicada), siendo importante en la clínica por su morbilidad y mortalidad. Los factores que juegan un papel facilitador de las disrupciones de la íntima y trombosis, son la presencia de células inflamatorias en las lesiones (Tracy y col., 1985), la liberación de sustancias tóxicas y enzimas proteolíticas por macrófagos (Steinberg y Witztum, 1990), espasmos coronarios (Nobuyoshi y col, 1991), debilidad estructural relacionada con la composición de la lesión (Richardson y col., 1989) y la tensión de la pared arterial (Ku y col., 1985). Aunque el hematoma normalmente se forma por erosión de la superficie de la lesión, también hay evidencia de hematomas que se forman dentro de las lesiones por hemorragias debidas a los nuevos vasos formados (Beeuwkes y col., 1990). Estas lesiones tipo VI, son muy obstructivas y producen síntomas.

Un resumen de la evolución y progresión de las lesiones arterioscleróticas se muestra en la figura 2 a y b.



**Fig. 2a.** Esquema de la evolución y progresión de las lesiones arterioscleróticas en un corte transversal del vaso (Stary y col. 1995).



**Fig. 2b.** Desarrollo de las diferentes etapas de las lesiones aterogénicas (Stary y col. 1995).

En la figura 2b se ilustra la transformación de hematoma y/o trombo a tejido fibromuscular, con incremento en el engrosamiento de la capa del tipo V. Así una lesión puede ir repetidamente incrementando el grado de oclusión, pasando temporalmente al tipo VI.

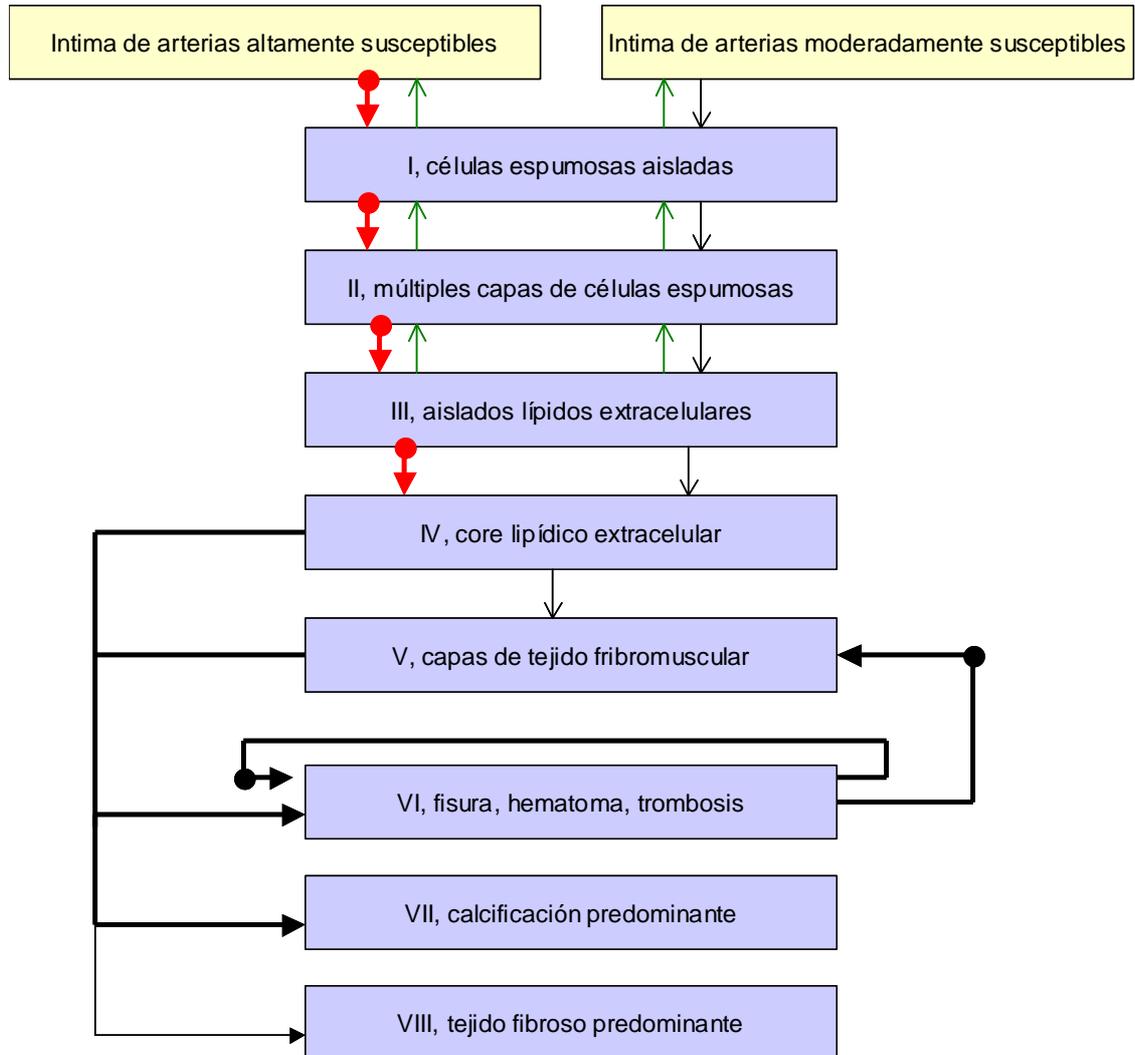
#### **1.1.4. Nomenclatura actual**

Por último, y en cuarto lugar, hace unos años han actualizado la clasificación histológica de las lesiones arterioscleróticas (Stary, 2000), surgiendo como una necesidad ante el estudio de varias autopsias. Así pues, las lesiones morfológicas que fueron catalogadas como tipos Vb (lesiones calcificadas) y Vc (lesiones fibróticas), son reemplazados al final de la secuencia como lesiones tipo VII y VIII. Este cambio refleja mucho mejor las direcciones en las cuáles, los tipos de lesión pueden cambiar morfológicamente. Esto es en parte consecuencia de los resultados de varios grupos de investigación con animales de experimentación y estudios de regresión (Stary, 1999), al disminuir drásticamente los altos niveles lipídicos sanguíneos y observar los cambios histológicos. En estos estudios las lesiones morfológicas similares a los tipos IV y V humanas (el tipo VI no se ha detectado en animales), conducen a las asignadas como VII y VIII. Además, debe añadirse que la composición histológica designada como tipos VII y VIII también puede ser producida por procesos distintos a la regresión lipídica (Stary, 1999).

En la clasificación original, los cambios mínimos (lesiones tipo II) se subdividen a su vez, en lesiones originadas en arterias altamente susceptibles al desarrollo de arteriosclerosis (tipo IIa) y moderadamente susceptibles (tipo IIb) con un desarrollo lento, o no del todo.

En la figura 3 puede observarse la última y actual clasificación, donde la alta o moderada susceptibilidad de las arterias al desarrollo y progresión de la lesión arteriosclerosa, se diferencia con flechas gruesas o delgadas.

**Fig. 3.** Clasificación actual de la evolución de las lesiones arterioscleróticas (modificado de Stary y col. 2000).



## 1.2. ENFERMEDAD ATEROTROMBÓTICA

La arteriosclerosis, principal causa de enfermedad arterial coronaria, es una respuesta exagerada de la pared vascular a las agresiones, caracterizada por inflamación crónica y proliferación fibrocelular o, mejor, consecuencia de un proceso inflamatorio crónico desarrollado como

respuesta a múltiples estímulos, en el que se suceden episodios de daño y reparación tisulares, con participación de diversos mediadores químicos, generalmente en el contexto de una dislipidemia, condicionado por factores genéticos y mecanismos hemodinámicos. El proceso se inicia por un daño endotelial con aumento de su permeabilidad y activación celular, lo que da lugar a una insudación de plasma y una atracción de monocitos, acompañadas o seguidas de proliferación y migración de las células musculares lisas (CML) con síntesis de matriz colágena. Y tienden a desarrollarse en áreas con endurecimiento adaptativo preexistente de la íntima, en lugares de esfuerzo inducidos por movimientos de oscilación o desplazamiento suave de cizalla (árbol coronario, bifurcación carotídea, aorta abdominal).

Como se ha descrito en el apartado anterior, la lesión arteriosclerótica (ateroma) es un engrosamiento focal asimétrico en la capa más profunda de la arteria, la íntima. Está formado por un core, con células espumosas y acúmulos de lípidos extracelulares, rodeado por una capa delgada de células musculares lisas y una matriz rica en colágeno. Linfocitos T, macrófagos y células mastoides infiltran la lesión, sobre todo en el hombro del ateroma, donde el casquete es más fino. Estas células inmunes presentan signos de activación y producen citoquinas inflamatorias.

Desde el punto de vista clínico, esta enfermedad se debe considerar una entidad patológica única que afecta a distintos territorios vasculares: coronario, cerebral y vascular periférico. El conocimiento de la enfermedad ha superado el concepto de oclusión progresiva de la luz de la arteria coronaria por el continuo crecimiento de las células musculares lisas en la placa, para dar paso al reconocimiento de que la rotura de la placa y la trombosis superpuesta (aterotrombosis) son las causas principales de los síndromes coronarios agudos (SCA) y la muerte por causas cardiovasculares. En consecuencia, el principal determinante de esta enfermedad es la composición de la placa (como determinante del riesgo de rotura), más que la estenosis luminal (Corti y col., 2001).

Cuando se hablaba de placas que dan lugar al infarto, siempre se referían a placas con un gran contenido de grasa y un casquete fibroso fino. Pero esto no siempre es así, pues hay placas que no tienen grasa y dan lugar a infartos y a otros accidentes vasculares, datos basados en estudios con resonancia magnética en humanos (Fayad y Fuster, 2001). Así pues, las dos terceras partes de los SCA se deben a la rotura de placas aterotrombóticas de alto riesgo con formación superpuesta de trombos, y en la tercera parte de los SCA, especialmente en los cuadros de muerte súbita por causas coronarias, no hay rotura de una placa aterotrombótica, sino la erosión endotelial superficial de una lesión intensamente estenótica y fibrosa, junto con una hipercoagulabilidad de la sangre. Los procesos de rotura de la placa ocurren con mayor frecuencia en varones menores de 50 años, mientras que los de erosión se producen con igual frecuencia en varones y mujeres de estas edades. El proceso erosivo se encuentra incrementado en pacientes fumadores y afecta especialmente a mujeres premenopáusicas.

### **1.2.1. Rotura de la placa**

Histológicamente, las lesiones con tendencia a la rotura (también denominadas vulnerables o de alto riesgo) están constituidas por una zona central extensa de lípidos extracelulares, una acumulación densa de macrófagos, un número reducido de células musculares lisas vasculares y un casquete fibroso fino. Por lo que no es sorprendente que estas placas tengan una estabilidad menor y una tendencia a la rotura mayor que las placas fibrosas con colágeno abundante. La rotura de la placa se suele producir en el punto más débil “hombro”, en donde el casquete es más fino y muestra una infiltración mayor por células inflamatorias (Van Der Wal y col., 1994). Una vez que la placa sufre la rotura, la zona central lipídica sumamente trombógena y con abundante factor tisular queda expuesta al torrente sanguíneo e inicia la formación de un trombo superpuesto, que da lugar a la oclusión vascular y la consiguiente sintomatología isquémica distal al mismo (Fuster, 1999). Las lesiones

causantes de los síndromes coronarios agudos contienen muchos más macrófagos que las lesiones que producen una angina estable (el 14% frente al 3% de placa ocupada por macrófagos). Los macrófagos son capaces de degradar la matriz extracelular mediante fagocitosis directa y mediante la secreción de enzimas proteolíticas (metaloproteinasas, colagenasas, gelatinasas y estromelinasas) capaces de degradar tanto el colágeno como la lámina elástica de la placa aterosclerótica (Galis y Khatri, 2002). Además los macrófagos también secretan citoquinas y factores quimiotácticos, que atraen un mayor número de monocitos/macrófagos, células T y células cebadas o mastocitos al núcleo ateromatoso. Junto con la generación de productos tóxicos (radicales libres y productos de la oxidación de los lípidos), estas enzimas facilitarán el daño de la pared vascular y contribuirán a debilitar la cubierta fibrosa predisponiéndola a la rotura.

Hoy día, sin embargo, no se puede hablar del término de placa vulnerable en sí misma, pues no hay una placa vulnerable, sino muchas. Asakura y col. (2001), demuestran mediante angioscopia cómo hay varias placas vulnerables, no sólo en la arteria responsable del infarto, sino también en el resto del lecho coronario.

A lo largo de los últimos decenios, los estudios anatomopatológicos han demostrado un número aumentado de *vasa vasorum* en las lesiones ateroscleróticas avanzadas, con un aumento de densidad de microcapilares en el “hombro” de la placa en lesiones con hemorragia interna y en fibroateromas con débil capa fibrosa, así como en lesiones con elevada infiltración de macrófagos (Moreno y col., 2004). Estas observaciones ponen de manifiesto la relación entre la inflamación y la neovascularización. La angiogénesis contribuye pues, a la inestabilidad de las placas debido a una mayor exposición local a fuerzas mecánicas en áreas de neovascularización, y a un aumento de infiltración de monocitos/macrófagos favorecido por la existencia de células endoteliales activadas (que expresan proteínas de adhesión) en los neocapilares (Kockx y col., 2003). Se ha postulado también que las células

progenitoras presentes en la placa o circulando por la sangre, provenientes de la médula ósea, podrían dar origen a estos neocapilares.

A diferencia de lo que ocurre con la mayor parte de las placas coronarias de alto riesgo, las placas carotídeas de alto riesgo son considerablemente más estenóticas. No presentan muchos lípidos, sino que son bastante heterogéneas y muy fibrosas. En la arteria carótida se pueden dar tres mecanismos: por placas de gran contenido en grasa que se rompen, por un problema de hipercoagulabilidad de la sangre o, lo más frecuente, por placas muy fibróticas que estenosan mucho el vaso. En este último caso, la placa se rompe entre la media, donde están los *vasa vasorum*, y produce el accidente cerebrovascular, bien porque un hematoma parietal protuye y completa la obstrucción vascular, o bien porque se abre a la luz del vaso y emboliza un coágulo. Probablemente juegue un papel importante la energía cinética de la sangre durante la sístole, que con el impacto en esa zona fibrosa y estenosada produce mucha más vibración en la pared, lo que puede dar lugar a la disección, la rotura de *vasa vasorum*, el hematoma de pared y el consiguiente accidente cerebrovascular agudo (Glagov y col., 1988). Sin embargo, en el territorio coronario, la mayor parte del flujo coronario ocurre en diástole y no existe por tanto esa energía cinética suficiente para romper una placa muy estenosada.

La aorta torácica tiene placas con una proporción elevada de lípidos extracelulares y se caracterizan por un casquete con un mayor contenido de macrófagos que de células musculares lisas. Estas placas se pueden romper, formar un coágulo y dar lugar a un accidente cerebrovascular idiopático. La caracterización reciente de la placa aórtica mediante resonancia magnética ha confirmado su elevado contenido en lípidos (Fayad y col., 2000).

En la circulación periférica, las placas de alto riesgo de las extremidades inferiores, parecen ser muy estenóticas y fibrosas (Ouriel, 2001), por lo que la sangre circula a gran velocidad por un túnel y debido al “efecto

Venturi" arrastra el endotelio. Esto asociado a la hipertrombogenicidad de la sangre en la enfermedad arterial periférica, es el principal factor que contribuye a los síndromes isquémicos agudos (dolor isquémico súbito, gangrena). Esta relación está apoyada por la elevada prevalencia de causas conocidas de un estado hipertrombótico de la sangre, como la diabetes, el tabaquismo y la dislipemia (McDermott y col., 2001), en los pacientes con enfermedad arterial periférica (Sambola y col., 2003).

### **1.2.2. Sangre vulnerable o de alto riesgo**

En un tercio de los casos de los síndromes coronarios agudos, en particular en la muerte súbita, no se produce rotura de la placa aterosclerótica vulnerable, sino erosión superficial de la placa moderadamente estenótica y fibrosa (Virmani y col., 2000), se identifica como la pérdida de la monocapa endotelial en segmentos arteriales. En estos casos la formación del trombo depende principalmente de un estado hipertrombogénico de la sangre provocado por una serie de factores sistémicos, tales como la elevación del colesterol-LDL, el tabaquismo y la hiperglucemia (Rauch y col., 2001).

Observaciones recientes sugieren que la hipertrombogenicidad asociada a estos factores podría deberse a la activación de interacciones leucocito-plaqueta asociadas con la liberación de FT y la activación de la trombina. Hay estudios donde se ha asociado valores elevados de FT en sangre con hipertrombogenicidad en pacientes con angina inestable y enfermedad coronaria crónica, y se ha demostrado también que las concentraciones sanguíneas de factor tisular predicen el resultado en los pacientes con angina inestable (Soejima y col., 1999). Además los macrófagos apoptóticos, las micropartículas y las CML activadas (Llorente-Cortes y col., 2004) presentes en la placa aterosclerótica parecen ser una fuente de micropartículas de FT y, por tanto, podrían contribuir a la complicación aterotrombótica.

Así pues, en individuos diabéticos, hipercolesterolémicos y fumadores, se activan las células blancas en sangre, las cuáles se vuelven apoptóticas, los monocitos liberan factor tisular a la sangre, y esto unido a los citados factores de riesgo, hace la sangre muy hipercoagulable, tanto que basta que haya una arteria sin endotelio para que se produzca un coágulo de sangre.

### **1.2.3. Disfunción endotelial**

El endotelio ha sido intensamente estudiado desde hace unos veinte años, fecha en la que se comenzó a conocer que era una membrana biológica muy activa. En 1980 se descubrió la existencia de un factor difusible desde el endotelio que tenía capacidad vasorrelajadora (Furchgott y Zawadzki, 1980), y posteriormente se identificó este factor como óxido nítrico (Moncada y col., 1988), el cuál regula el tono vascular, reduce el grado de activación de plaquetas y leucocitos impidiendo su agregación y adhesión a la pared del vaso.

Sin embargo, esta función endotelial dura unos 30 años, al cabo de los cuales comienza un proceso lento y progresivo de muerte y regeneración celular. La continua influencia de la presión tangencial, el estrés oxidativo y los factores de riesgo cardiovasculares, como la hiperlipemia, la edad, la hipertensión, la diabetes y el tabaquismo, aceleran el envejecimiento de las células endoteliales, y por tanto, el proceso de regeneración, con menor actividad. El endotelio experimenta cambios que dan lugar a un aumento de su permeabilidad, al paso de diferentes sustancias desde la sangre al interior de la pared del vaso, junto con una disminución de la síntesis y liberación del óxido nítrico, de forma que estímulos vasodilatadores inducen vasoconstricción o bien vasodilatación muy pobre, por lo que se altera el equilibrio fisiológico con un claro predominio de los agentes vasoconstrictores.

Habitualmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) entran a través de las uniones intercelulares de la pared arterial y se acumulan en el espacio

subendotelial en cantidades que son reguladas por el endotelio. Cuando existe una elevación de las concentraciones plasmáticas de LDL y el endotelio lesionado se hace más permeable, con una mayor infiltración lipídica, se produce un aumento de la presencia de estas partículas en la pared. Debido a la tendencia de las LDL a unirse a los proteoglicanos, se incrementa su tiempo de residencia en el espacio subendotelial (Tozer y Carew, 1997) y aumenta la probabilidad de oxidación, por la producción de radicales libres del endotelio adyacente, por células del músculo liso y/o macrófagos aislados (Morel y col., 1984), con lo que se producen LDL-oxidadas (LDL<sub>ox</sub>). Éstas pueden activar al endotelio (Rangaswamy y col., 1997), estimular la expresión de moléculas de adhesión (Van der Wal y col, 1992) y la secreción de factores quimiotácticos, como la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1), incrementando la adhesión y migración de células circulantes y de células del músculo liso hacia la íntima. La LDL-oxidada es rápidamente captada por los monocitos a través de un receptor scavenger o basurero, con capacidad de inhibir la motilidad de los macrófagos, y los induce a producir citoquinas proinflamatorias. Este receptor basurero, al no estar regulado por el contenido de colesterol intracelular, da lugar a una sobrecarga de lípidos en los macrófagos y las células del músculo liso, formándose “las células espumosas”, célula prototípica en la aterosclerosis.

En el interior del núcleo de la célula endotelial existe un sistema llamado “REDOX”, son unos receptores como el Toll-Like 4 (TLR4) y el NF-κB, que se manifiestan en el endotelio dañado. Estos receptores hacen que se liberen unas proteínas en el endotelio, que son moléculas de adhesión que atraen a los monocitos, la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). Los monocitos penetran y limpian el vaso de la grasa –si no es excesiva– ayudados por el HDL. El problema surge cuando la cantidad de grasa entrante es muy elevada, entonces el mecanismo de defensa se convierte en enfermedad, porque entran demasiados monocitos y se crea allí una laguna de monocitos activos que inician la propia enfermedad vascular.

De todos los estudios realizados con las proteínas de adhesión que se liberan para atraer al monocito cuando hay daño endotelial, el VCAM-1 es la proteína más importante que atrae al monocito como mecanismo de defensa. Sólo el ICAM-1 tiene una cierta especificidad, y aunque existe un gran margen de error, puede ser un marcador de daño endotelial cuando está muy elevado.

Dentro de la respiración celular, se produce el estrés oxidativo, con la presencia de los denominados radicales libres de oxígeno, que son pequeñas partículas con uno o más electrones no apareados. Entre ellas se encuentran el superóxido ( $O^{\cdot-}$ ) y el hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ).

La producción exagerada de radicales libres tiene un gran protagonismo en la disfunción endotelial (Koppenol y col., 1992). El anión superóxido reacciona rápidamente con el NO, lo inactiva y da lugar al peroxinitrito, esto promueve la degradación oxidativa de un cofactor necesario para la eNOs, la tetrahidrobiopterina (H4B). El desacoplamiento que se produce, da lugar a más producción de anión superóxido, en detrimento de la de NO. Se produce así, un círculo vicioso con cada vez una mayor producción de radicales libres y una menor disponibilidad de NO. Su producción aumenta por estímulos proaterogénicos, como la angiotensina II, el estiramiento mecánico y las citoquinas proinflamatorias.

El estrés oxidativo desencadena también el proceso de lipoperoxidación, considerado como el fenómeno bioquímico que inicia el proceso arteriosclerótico, como se ha comentado previamente, con lo que la LDLox es citotóxica para las células endoteliales, inhibe la respuesta vasodilatadora de los agentes que actúan a través del NO y favorece la agregabilidad plaquetaria. Por otra parte, el estrés oxidativo puede afectar la expresión genética de varias moléculas: eNOs, VCAM-1, así como de la proteína quimiotáctica de los monocitos (MCP-1), (Landmesser y col., 2004).

#### 1.2.4. El monocito y los “*vasa vasorum*”

Una vez que los factores de riesgo producen el daño endotelial, se inicia la entrada del colesterol de baja densidad y se pone en marcha el mecanismo de defensa; mediante receptores en los que la genética, como se verá más adelante juega un papel muy importante, se generan en el endotelio proteínas del tipo ICAM, VCAM, P-selectina..., que atraen al monocito hacia el interior del vaso para intentar sacar el exceso de grasa. Este mecanismo de defensa es el que propicia la ruptura de la placa, pues el mecanismo de defensa se ve superado y se excede, va demasiado lejos, y no puede evitar que entren más monocitos de los que en realidad se necesitan. El proceso en ese comienzo de la enfermedad crece excéntricamente, cosa que hizo pensar que no es un problema de la íntima, sino de la parte externa de la arteria, preservando la luz vascular (remodelado positivo), y cuanto más excéntrica es la placa, más grasa contiene, completamente contrario a lo que antes se pensaba.

En los años 1960 y 1970 ya se apuntaba que la media y la adventicia eran importantes en esta enfermedad, pero no se disponía de la tecnología actual, y se enfocó todo al coágulo que se formaba por la ruptura de la placa.

En estudios realizados (Moreno y col., 2004) se observa un fenómeno proliferativo en la adventicia y en la media, con presencia de macrófagos y de pequeños vasos. Llamó la atención que en el enfermo diabético estos vasos proliferan más que en un individuo sin diabetes, y son muy parecidos a los que se ven en la microangiopatía diabética. Son vasos muy irregulares y con aberturas, lo que permitiría la salida de hematíes, que se comportarían como cuerpos extraños y acudirían los macrófagos con la misión de fagocitarlos. La diferencia es que el hematíe es grande y cuando sale de los “*vasa vasorum*” deja orificios también grandes, de tal forma que, por donde ha pasado un hematíe, el orificio permite la salida de cuatro macrófagos, produciéndose así un infiltrado celular que consiste en conglomerados de macrófagos con hematíes. Este proceso inflamatorio, va avanzando hacia el depósito de grasa de la íntima, pues

es probable que la íntima haya llamado a estos vasos para que saquen la grasa. En estudios sobre arterias coronarias humanas obtenidas de corazones inmediatamente después de su extracción durante intervenciones de trasplante cardíaco (Juan-Babot y col., 2003) se ha observado una importante formación de neovasos en lesiones avanzadas sólo donde la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) era altamente significativo, y en términos cuantitativos principalmente asociado con las células musculares lisas, siendo éstas las productoras del VEGF.

La adventicia según datos conocidos recientemente, se caracteriza por ser una capa arterial con células multiformes o pluripotenciales, así parte de las células de la media son fibroblastos procedentes de la adventicia que se han transformado en células musculares.

Estos macrófagos que penetran pueden liberar una serie de sustancias, como el “factor de crecimiento de fibroblastos” que son muy destructoras, su misión es destruir al hematíe y el problema es que destruyen el tejido de alrededor, como es la rotura de la capa elástica interna, con lo que el vaso se relaja al perder su eficaz arquitectura, el lugar donde se almacenaba la grasa queda mucho más debilitado, pierde la cohesión, y se puede producir fácilmente una ruptura de la placa facilitada por lo que en principio era un elemento de defensa. Por tanto, la ruptura de la capa elástica interna se ve sobre todo en placas que se rompen a la luz, placas de tipo VI. Así pues, el número de “*vasa vasorum*” y la ruptura de la capa elástica interna, tienen más importancia en la lesión que lo que clásicamente se consideraba fundamental, como era la cantidad de lípidos en un área y la debilidad de la capa que envolvía esos lípidos.

### **1.2.5. Trombosis**

La etapa final de la cascada inflamatoria tiene lugar cuando el contenido de la placa con material altamente trombogénico, entra en contacto con la sangre y se desencadena la trombosis, que es la base de las

consecuencias clínicas más graves de la aterosclerosis. En el año 1996 se logró cristalizar el factor tisular y se demostró que en los trombos recientes formados en accidentes coronarios agudos, había una relación directa entre la cantidad de macrófagos y el factor tisular, en las placas de ateroma.

El factor tisular se genera desde el macrófago y activa la vía extrínseca de la coagulación, dando lugar a la síntesis de trombina, y ésta transforma el fibrinógeno en fibrina. La trombina llega a la plaqueta circulante y probablemente es el estímulo más importante que tiene dicha plaqueta. Lo primero que se ve en el coágulo es una capa de fibrina, probablemente generada por el factor tisular, y como consecuencia acuden las plaquetas activadas. A su vez, el sistema de coagulación de la plaqueta genera más trombina, y la trombina genera fibrina (las plaquetas sin una red de fibrina no se mantendrían, se marcharían fácilmente). En el momento que el coágulo se hace oclusivo, su cola es de fibrina, porque se produce un fenómeno de éxtasis que activa el sistema de coagulación.

La explicación de la liberación del factor tisular es debido a que si el macrófago tiene un gran contenido de LDL oxidado y el HDL no es suficiente para sacarlo, este monocito entra en un proceso de suicidio, de apoptosis en el que la célula va desapareciendo lentamente, algo muy distinto al proceso de necrosis secundario a isquemia. Así pues, en este proceso de apoptosis se libera el factor tisular para su autodestrucción, es decir, es un producto de liberación residual, y no se libera por una célula activa de defensa. Se ha visto que hay una relación directa entre la agresividad de la apoptosis y la cantidad de factor tisular que se libera (Hutter y col., 2004).

Probablemente es un fenómeno biológico muy importante en donde una célula, en este caso un macrófago, cuando no puede cumplir su misión porque está llena de grasa, se suicida y se inicia la liberación de productos tóxicos; como el factor tisular. Entonces, nos encontramos con una célula muy activa que es el macrófago, que tiene como misión

mediante los receptores “basureros” tomar el exceso de LDL oxidados; los receptores PPAR (receptores activados por proliferadores peroxisómicos) están en muchas células, son un complejo muy sofisticado y un importante factor regulador del metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos, del que se conocen al menos tres tipos, pero lo que sí parece claro es que se encarga de lanzar el LDL oxidado fuera de la célula, potencia el “transporte reverso de colesterol”, a la vez que da lugar a la apoproteína E que activa el HDL para que recoja el exceso de LDL oxidado. Este fenómeno de transporte es muy importante y complejo, extrae el colesterol de tejidos extrahepáticos y lo moviliza hacia el hígado para su metabolización y eventual excreción intestinal con los ácidos biliares (Ibáñez, 2010). Para que el monocito cumpla esta misión de limpieza, tiene que haber una buena integración de muchos receptores, un sistema PPAR muy robusto, un transporte bueno, una apo-E que sea adecuada y un HDL preparado para culminar el trabajo. Cuando, debido a condicionamientos genéticos, alguna de estas moléculas no existen, se desarrolla una enfermedad aterosclerótica muy agresiva. Si el monocito está alterado genéticamente, es muy vulnerable y no puede realizar su labor de defensa.

Durante el fenómeno apoptótico se liberan también metaloproteinasas (MMP), familia de endopeptidasas que degradan proteínas de la matriz extracelular, con la consiguiente degradación de la placa fibrosa y la complicación de la aterosclerosis al favorecer la trombosis y la formación de aneurismas. Durante las fases iniciales, el remodelado de la matriz extracelular representa un mecanismo compensador que evita la estenosis arterial, mientras que en fases ulteriores del proceso aterosclerótico, la degradación de la capa fibrosa o la erosión endotelial mediada por MMP favorece la rotura y la desestabilización, y promueve la trombosis. Finalmente, la formación de aneurismas representaría una fase avanzada del proceso de remodelado arterial por degradación de la matriz extracelular mediada fundamentalmente por MMP-2 y 9 (Páramo y col., 2005). Hay estudios (Orbe y col, 2003) donde se evidencia un incremento significativo de MMP en lesiones avanzadas, sobre todo en áreas con alto

contenido en macrófagos y, por tanto con mayor inflamación, y la inhibición de las MMP podría contribuir a la estabilidad de la placa al promover un incremento del contenido de colágeno.

Por ello, la apoptosis de los macrófagos podría representar el vínculo de unión de la inflamación y las complicaciones trombóticas que tiene lugar durante la enfermedad aterosclerótica (Littlewood y Bennett, 2003), pues el factor tisular es el mecanismo más importante de generación de trombina inducida por la inflamación. Por otra parte, la exposición al torrente circulatorio del colágeno subendotelial, tras la erosión de la íntima, conlleva activación y adhesión plaquetarias, y con ello, la secreción de factores de crecimiento, trombina y citoquinas proinflamatorias, como el ligando CD40; todos contribuyen a la migración y proliferación de células musculares lisas y monocitos. Además las plaquetas activadas liberan tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), potente vasoconstrictor y agregante plaquetario, que influirá en la disfunción endotelial, y son capaces de inducir la expresión y secreción de quimiocinas por los monocitos, como MCP-1.

#### **1.2.6. El crecimiento de la placa**

A la placa que estenosa la luz del vaso, se ha llegado por distintos caminos, pero el proceso más frecuente e importante probablemente sea la formación de un coágulo, que no ha tenido una manifestación clínica evidente y que se organiza con tejido conectivo. Las técnicas de imagen han ayudado mucho a comprender esta fisiopatología, y la resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución ha aparecido como una de las posibles pruebas de imagen no invasivas para la definición in vivo de la placa aterosclerótica, pudiendo diferenciar el casquete fibroso de la zona central necrótica (Yuan y col., 2002), observando que el grado de estenosis no es una progresión paulatina, sino que cambia súbitamente. Se trataría de accidentes vasculares agudos recurrentes, en los que el trombo se organiza y va estenosando más y más la luz del vaso, pudiendo llegar a provocar angina.

El uso de gadolinio aporta información adicional debido a que facilita la identificación de la neovascularización en las placas aterotrombóticas. Así la RMN pone de manifiesto que el coágulo se está organizando y que se sustituye por tejido conectivo, como se puede ver en estudios experimentales (Worthley y col., 2000), cuya duración es de unas ocho semanas. En este estudio por primera vez, la resonancia magnética proporciona información sobre el grado de evolución del trombo, utilizando dos modelos experimentales (conejo y porcino). Así pues, se obtienen datos que confirman que durante este período de organización, el trombo es muy activo, porque actúa como un cuerpo extraño en el que penetran los monocitos activados, se liberan los factores de coagulación, el factor tisular, etc., y un trombo que ocurrió hace un mes, de nuevo se puede complicar fácilmente con otro trombo; lo que demuestra que en los enfermos coronarios agudos, son las primeras ocho semanas donde existe recurrencia trombótica, y es precisamente en este tiempo cuando el coágulo se está organizando y existe todavía actividad protrombótica. Es importante pues, no sólo disponer de información puntual sobre la estructura y localización del proceso aterosclerótico, con las nuevas tecnologías como la RMN, sino conocer la progresión en el tiempo de las lesiones vasculares y conocer los mecanismos celulares implicados en el desarrollo del daño vascular.

### **1.3. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR**

La investigación epidemiológica en los últimos treinta años ha establecido un número de factores de riesgo, que son comunes en pacientes que presentan enfermedad aterosclerótica. Entre los factores de riesgo de mayor importancia se encuentran el tabaquismo, el sedentarismo, la hipertensión, las hiperlipemias, el estrés y la diabetes. Otros factores de riesgo no modificables, son la propia anatomía vascular del corazón, la predisposición genética, la edad y el sexo.

### **1.3.1. Factores de riesgo no modificables**

#### 1.3.1.1. Anatomía vascular del corazón

Desde el punto de vista hemodinámico, una zona vascular sin ninguna curvatura ni bifurcación, es un sistema de flujo laminar, antiadhesivo o antiinflamatorio, ya que el NO que se libera evita la llegada del macrófago; antitrombótico por la liberación de prostaciclina y del activador del plasminógeno tisular (tPA) que facilitan una inhibición de las plaquetas y un aumento de la fibrinólisis; y además, desde un punto de vista funcional, hay una tendencia a la relajación o vasodilatación también por el NO. La morfología de las células endoteliales donde el flujo es laminar y uniforme, es en forma elipsoide y alineadas en dirección al flujo. Todo esto se complica por un problema reológico, ya que cuando en una zona de la arteria existe una bifurcación o una angulación, se produce una turbulencia de sangre con el consiguiente daño endotelial. En esta zona las células tienen una forma poligonal y no presentan una orientación especial. Estas últimas áreas tienen una permeabilidad incrementada a macromoléculas como LDL y son lugares preferentes para la formación de lesiones (Gimbrone, 1999).

#### 1.3.1.2. Genética

La genética juega un papel fundamental en la transcripción del llamado sistema "REDOX", que es quien realmente decide si el endotelio se inclina hacia un proceso disfuncional, inflamatorio agresivo y aterogénico, o si por el contrario se inclina hacia un proceso de protección. Es un sistema muy sensible activado desde el interior del núcleo de la célula endotelial. Hay unos receptores que se manifiestan en el endotelio dañado, como el Toll-Like 4 (TLR4) y el NF-kB, que deciden lo que va a ocurrir una vez producido el daño endotelial. Este sistema determina si van a entrar más o menos monocitos, o si va a haber un proceso más o menos inflamatorio (Kim y col., 2001). Estos receptores del endotelio hacen que se expresen unas proteínas, que son moléculas de adhesión que atraen a los

monocitos (VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina); éstos penetran y limpian el vaso de la grasa (si no es excesiva), ayudado por el HDL.

Si el receptor Toll-Like 4 sufre un polimorfismo, resulta que el individuo puede quedar protegido de la enfermedad. Si tiene una determinada alteración y el individuo toma una estatina, queda muy protegido contra la enfermedad; la estatina junto con el receptor alterado previenen que entre un exceso de grasa dentro de la arteria, y si no se utiliza la estatina la evolución es mucho más problemática. Si existe lo contrario, una sobreestimulación del receptor y hay mucha grasa en la sangre, puede dar lugar al desarrollo de una enfermedad muy agresiva. Se trata pues, de “un sistema de equilibrio”, y lo más justo se da cuando el receptor no está muy activado y además se le ayuda con una estatina.

Por otro lado nos encontramos con una célula muy activa que es el macrófago, que tiene como misión mediante los “receptores basureros” tomar el exceso de LDL oxidado. Los receptores PPAR están en muchas células y es un complejo muy sofisticado del que se conocen tres tipos (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\beta$ ) implicados principalmente en la modulación de diferentes genes mediadores de la adipogénesis, del metabolismo lipídico y de la homeostasia de la glucosa. Se encarga de lanzar el LDL oxidado fuera de la célula, a la vez que da lugar a la apoproteína E que activa el HDL para que recoja el exceso de LDL oxidado. Este fenómeno de transporte, cuando debido a condicionamientos genéticos, falla algún paso, se desarrolla una enfermedad aterosclerótica muy agresiva. Es algo parecido a la genética del endotelio, y aquí, si el monocito está alterado genéticamente, es muy vulnerable y no puede realizar su función de defensa.

#### 1.3.1.3. Edad

La frecuencia de la enfermedad cardiovascular aumenta con la edad en ausencia de otros factores de riesgo, lo cuál sugiere que la edad por sí misma puede alterar la funcionalidad vascular. En la circulación arterial y

en la aorta, que está más expuesta a la presión pulsátil, la liberación de NO disminuye con la edad. La célula endotelial tiene una vida media de unos treinta años, al cabo de los cuáles comienza un proceso lento y progresivo de muerte y regeneración celular.

#### 1.3.1.4. Sexo

Hay investigaciones (Yassue y col., 1990) que han encontrado una asociación entre la respuesta vasoconstrictora a la acetilcolina en arterias coronarias, con el sexo masculino y la edad de los pacientes. En el caso de las mujeres, la deficiencia estrogénica característica de la menopausia puede inducir disfunción del endotelio, con incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular en la mujer, por lo que se equipara al del hombre. El mecanismo responsable del efecto cardioprotector de los estrógenos se debe a su efecto antioxidante, lo que redundaría en una mayor biodisponibilidad del NO, y su efecto protector al inhibir la capacidad de las LDL y reducir la inflamación vascular (Mendelsohn y Karas, 1999).

### **1.3.2. Factores de riesgo modificables**

#### 1.3.2.1. Tabaquismo

El consumo de tabaco actualmente debe considerarse como el principal factor de riesgo coronario modificable más importante de morbilidad y mortalidad debida a coronariopatías. Según datos clínicos y procedentes de autopsias, fumar se asocia con la progresión rápida de esta enfermedad y su grado de gravedad se relaciona directamente con la dosis diaria y con la duración del hábito, y una reducción del riesgo con el abandono del tabaco, haciéndose casi equiparable a la de los no fumadores al cabo de 10-15 años, aunque es probable que el riesgo no llegue a ser exactamente igual al de los nunca expuestos al tabaco.

El monóxido de carbono y la nicotina procedentes del tabaco afectan a la función endotelial y aumentan su reactividad, su vasoconstricción y su agregación plaquetaria, de forma directa e indirecta. El tabaco aumenta la liberación de catecolaminas, que aumentan los valores de fibrinógeno y potencian la actividad plaquetaria. Además, el tabaco induce un aumento agudo de la presión arterial por la liberación de catecolaminas, una reducción de la resistencia vascular coronaria, una reducción en la liberación de oxígeno, un aumento de los valores de homocisteína y de proteína C reactiva (PCR), una reducción de HDL y un mayor depósito de lípidos extracelulares en la placa aterosclerótica, lo que puede implicar una mayor vulnerabilidad (Leone, 2003). El riesgo asociado al tabaco parece ser rápidamente reversible y está directamente relacionado con una respuesta causa-efecto, lo que sugiere que el tabaco induce procesos agudos en la pared vascular (rotura de placa, trombosis y vasoconstricción), más que alteraciones aterogénicas crónicas.

#### 1.3.2.2. Sedentarismo

El ejercicio regular, alrededor de un mes de iniciado el programa, puede retrasar la evolución de la placa y parece que proporciona protección frente al infarto de miocardio y la muerte súbita por enfermedad coronaria. La práctica regular de ejercicio baja el LDL, aumenta los niveles de HDL y produce un efecto beneficioso sobre los triglicéridos (TG). Este cambio lipídico tiene un impacto positivo sobre el funcionamiento del endotelio y produce un aumento de la biodisponibilidad de NO (Walther y col., 2004). Lo curioso respecto a la intensidad del ejercicio es que los efectos no dependen de la cantidad realizada, sino de la fatiga física que se alcanza. Así que, a igual grado de fatiga, aunque con diferente nivel de ejercicio, corresponde el mismo impacto positivo respecto a la enfermedad cardiovascular.

Sin embargo, el ejercicio brusco sin asiduidad y la activación neurohormonal simpática que se asocian a éste, aumentan la liberación de catecolaminas y pueden precipitar el inicio de un infarto de miocardio a

través de la rotura brusca de la placa, la activación de plaquetas, y la coagulación y/o vasoconstricción coronaria.

### 1.3.2.3. Hipertensión

La hipertensión arterial (HTA) aumenta el riesgo relativo del padecimiento y la mortalidad por enfermedad cardiovascular. Son diversos los estudios epidemiológicos, entre ellos el de Framingham, que han demostrado que tanto la presión arterial sistólica como diastólica se asocian de manera positiva, gradual y continua con los episodios cardiovasculares y coronarios, independientemente de la edad, el sexo y la raza (Franklin y col., 2001). La hipertensión produce alteraciones subclínicas en los principales órganos de la economía. El cerebro, el corazón, el riñón y las grandes arterias presentan alteraciones precoces en el paciente hipertenso que pueden ser detectadas y que son de gran importancia pronóstica para el paciente. Aunque en los últimos años se han desarrollado métodos fiables para la evaluación de lesiones cerebrales precoces, especialmente de las lesiones de sustancia blanca, y para determinar lesiones ateromatosas muy precoces en las grandes arterias, fundamentalmente en las carótidas, la presencia de hipertrofia ventricular izquierda y de pequeñas cantidades de albúmina en la orina (microalbuminuria) siguen siendo los principales indicadores de la lesión de órgano diana.

El beneficio potencial de cualquier terapéutica antihipertensiva reside en la capacidad de reducir la probabilidad de padecer una complicación cardiovascular mortal o no mortal, en un individuo concreto, mediante el descenso de las cifras de presión arterial y, por tanto, de las fuerzas de cizallamiento que actúan sobre el endotelio arterial y promueven su disfunción, su lesión morfológica, el desarrollo de la placa de ateroma y, finalmente, la oclusión arterial por la formación del trombo.

Diversos estudios han demostrado que los inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA) y los antagonistas del receptor de la

angiotensina II (ARA II) favorecen la estabilización de la placa aterosclerótica y la reducción de episodios cardiovasculares. La angiotensina II provoca disfunción endotelial e induce la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1, con lo que favorece la adhesión de monocitos a las células endoteliales y se mantiene un estímulo inflamatorio crónico, lo que contribuye a la formación de las lesiones ateroscleróticas. La inhibición de los efectos de la angiotensina II parece afectar no sólo a la progresión de la lesión aterosclerótica y a la vulnerabilidad de la placa, sino también a los mecanismos desencadenantes del inicio de la enfermedad (Kon y Jabs, 2004).

#### 1.3.2.4. Hipercolesterolemia

La existencia de alteraciones de la pared arterial fue reconocida por los patólogos desde la antigüedad. Leonardo da Vinci describió la presencia de alteraciones degenerativas en los vasos sanguíneos. En el siglo XVI, Andreas Vesalio describió la existencia de aneurismas arteriales. En el siglo XVIII las observaciones microscópicas de Giovanni Battista Morgagni permitieron relacionar la presencia de lesiones ateromatosas con enfermedad y Rudolf Virchow, en el siglo XIX, realiza las primeras descripciones precisas del proceso situándolo en la íntima arterial y vinculándolo con la trombosis. En la actualidad las descripciones más detalladas del desarrollo de la enfermedad se deben a los trabajos de Herbert C. Stary (Stary, 2000), que clasifica las lesiones en diversos estadios evolutivos y en todos ellos desempeña un papel importante el depósito lipídico, por lo que no se entiende la arteriosclerosis sin infiltrado graso en la pared arterial. El depósito de lípidos en la pared vascular es consecuencia de un desequilibrio en el tráfico (entrada/salida) de colesterol en la pared arterial. Mientras que el mecanismo de entrada está directamente relacionado con los valores de LDL, el reflujo o transporte reverso desde la pared hasta el hígado depende de los valores de HDL.

La dieta es el determinante fundamental del colesterol aterogénico, es decir, el LDL. Tanto el exceso de calorías, como las grasas saturadas y,

posiblemente, las proteínas de origen animal tienden a elevar los niveles de LDL.

La cantidad y calidad de las lipoproteínas plasmáticas es determinante del desarrollo del proceso arterioscleroso y de su impacto en la aterogénesis. La asociación entre colesterol sérico y cardiopatía isquémica es conocida desde hace ya muchos años, concretamente el colesterol ligado a LDL es uno de los principales factores desencadenantes de alteraciones en el endotelio vascular, así como del desarrollo y la progresión del proceso aterogénico. Su disminución en estudios de intervención con estatinas se ha asociado a una reducción del riesgo de cardiopatía coronaria y a un retraso en la progresión de la aterosclerosis coronaria, tanto en la prevención primaria como en la secundaria (La Rosa, 2003).

El transporte reverso de lípidos favorece la estabilización de la placa aterosclerótica e incluso favorece su regresión. El papel protector frente a la enfermedad aterosclerótica de valores incrementados de HDL se ha demostrado de forma experimental y en estudios de población tanto epidemiológicos como de intervención (Badimon y col., 1990), demostrando claramente la relación inversa entre HDL y riesgo coronario. Entre los diferentes mecanismos de acción que se han postulado para explicar los efectos antiaterogénicos de las HDL, los más aceptados son el transporte reverso del colesterol, el efecto antioxidante mediado a través de la paraoxonasa en la inhibición de la oxidación de las LDL, la reducción de los valores de expresión de las moléculas de adhesión vasculares (selectinas, ICAM-1, VCAM-1, etc) que facilitan la adhesión de los monocitos circulantes a la pared arterial y un incremento de la capacidad fibrinolítica endógena. Adicionalmente, las HDL inducen la producción de prostaciclina mediante la inducción de ciclooxygenasa-2 y, por tanto, mejoran la homeostasis vascular contra la aterotrombosis (Escudero y col., 2003).

Por otro lado, múltiples ensayos clínicos han demostrado los efectos independientes de las estatinas en cuanto a la reducción de colesterol, al

estabilizar las placas ateroscleróticas, mejorar la función endotelial, disminuir el grado de inflamación y reducir el riesgo de trombosis (Badimon y Vilahur, 2011).

#### 1.3.2.5. Obesidad

La obesidad es una condición crónica que, por su creciente prevalencia y la importancia de las complicaciones metabólicas que supone, va a representar en los próximos años un auténtico problema de salud pública. De hecho, en el año 2000, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la obesidad como la epidemia del siglo XXI. Puede considerarse un síndrome de etiología multifactorial, en el que se han implicado múltiples factores ambientales y genéticos. En la actualidad se define por el índice de masa corporal (IMC) (peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla expresada en metros), que nos da una idea de la corpulencia y se relaciona de forma aceptable con la proporción de grasa del individuo. Las personas con un IMC mayor de 25 kg/m<sup>2</sup> padecen sobrepeso y tienen un riesgo aumentado de padecer enfermedades cardiovasculares. Aquellos con IMC mayor de 30 kg/m<sup>2</sup>, son obesos con riesgo elevado y, finalmente si el IMC supera los 40 kg/m<sup>2</sup>, el riesgo está muy aumentado. La distribución de la grasa es un factor importante, puesto que el riesgo para la salud es sustancialmente superior cuando la distribución de la grasa es abdominal (un perímetro abdominal elevado, obesidad “en forma de manzana”), que cuando la distribución es periférica (“en forma de pera”).

La relación obesidad/morbimortalidad cardiovascular es conocida desde hace milenios. Hace más de veinte siglos, Hipócrates reconoció que la “muerte súbita es más común entre aquellos que son naturalmente obesos que en los delgados”. La obesidad se asocia con frecuencia a la aparición de una serie de enfermedades y condicionantes que afectan a la salud y a la calidad de vida, entre ellas destacan la hipertensión arterial, el accidente cerebrovascular, la diabetes mellitus tipo 2, la dislipemia, las enfermedades cardíacas y de la vesícula biliar, la osteoartritis, las

enfermedades venosas de los miembros inferiores, la limitación de la movilidad, la gota, algunas formas de cáncer, las alteraciones del sueño, la depresión, la tensión emocional, la baja autoestima, la discriminación y el aislamiento. La obesidad acelera pues la progresión de la aterosclerosis coronaria, al alterar la función del endotelio y favorecer el aumento de grasa, existiendo una asociación positiva entre el IMC y la concentración plasmática de LDL y triglicéridos (TG), y una asociación inversa con la concentración de HDL (Datillo y Kris-Etherton, 1992). Por otro lado, el paciente obeso presenta en general una mayor predisposición a la agregabilidad plaquetaria y a la deposición de fibrina, y se ha observado que las concentraciones circulantes de inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) se relacionan con la magnitud de las reservas grasas, y son por tanto más elevadas en los pacientes que presentan obesidad en relación a los individuos con normopeso, y disminuyen tras una pérdida de peso media (Svendsen y col., 1996). Este incremento de PAI-1 con la obesidad dificultaría la activación del plasminógeno y por tanto inhibiría su capacidad fibrinolítica, con incremento del riesgo cardiovascular, además la sobreproducción de PAI-1 favorece la deposición de fibrina en la pared vascular y la migración de las células musculares lisas, favoreciendo así la formación de las placas de ateroma (Nordt y col., 1999). Se ha observado también una relación positiva entre el grado de adiposidad corporal y las concentraciones séricas de proteína C reactiva, valores circulantes de ferritina, fibrinógeno y de citoquinas proinflamatorias sintetizadas por los adipocitos como el factor de necrosis tumoral-alfa (FNT- $\alpha$ ), la interleucina-6 (IL-6), PAI-1 o la leptina, provocando un mínimo estado inflamatorio sistémico.

#### 1.3.2.6. Hiperglucemia e hipertrigliceridemia post-prandial

Se han hecho estudios de función endotelial después de comer, al cabo de seis horas y a las veinticuatro horas, y se ha observado que los triglicéridos en sangre alteran el endotelio. Simplemente una comida rica en grasa provoca un deterioro transitorio de la vasodilatación inducida por

el endotelio que no se normaliza hasta seis horas más tarde (Davignon y Ganz, 2004). Parece que este descenso de la vasorreactividad endotelial está relacionado directamente con el incremento transitorio de los triglicéridos en el suero de forma post-prandial, no apreciándose cuando se mide una trigliceridemia en ayunas, y es independiente del ulterior deterioro de la función endotelial derivado del incremento de la concentración de colesterol en plasma.

La glucemia post-prandial ha demostrado ser también un factor de riesgo independiente de complicaciones cardiovasculares, de modo que valores comprendidos en el rango de 140-199 mg/dl incrementan en 1- 27 veces el riesgo cardiovascular global.

#### 1.3.2.7. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) y los estados prediabéticos son dos factores de riesgo independientes de la aterosclerosis acelerada y, en consecuencia de complicaciones cardiovasculares. La diabetes es una epidemia y sus principales mecanismos bioquímicos involucrados en la disfunción endotelial se deben a los productos finales del metabolismo de la glucosilación, es decir, de la glucosilación no enzimática de proteínas específicas de la pared vascular por un exceso de glucosa, provocando una alteración endotelial en su vertiente endocrina, al tiempo que facilita la permeabilidad de la barrera unicelular para agentes proaterotrombóticos, con aumento de la secreción de sustancias vasoconstrictoras e hiperproliferativas, como la endotelina y la angiotensina II. Por otro lado, la adhesividad y la agregabilidad plaquetaria están aumentadas, como consecuencia de un incremento de la actividad del tromboxano A<sub>2</sub> y de la expresión de los receptores IIb-IIIa por el fibrinógeno, una reducción de la expresión de la antitrombina y la proteína C (dos bloqueadores de la coagulación) y un aumento de la apolipoproteína A, homóloga del plasminógeno, con el que compete y hace disminuir la fibrinólisis (Llyons, 1992).

En trabajos realizados con monocitos humanos a los que se estimulaba, se consiguió demostrar que se convierten fácilmente en apoptóticos y liberan vesículas con grandes cantidades de factor tisular. El monocito y la célula neutrófila se unen con la plaqueta, e incluso se identificó la p-selectina de la plaqueta y el CD 15 del monocito como los dos elementos moleculares que unían uno con el otro. Así la diabetes y los LDL oxidados, estimulan el sistema inflamatorio de la circulación en humanos, por lo que los monocitos circulantes sobreestimulados hacen apoptosis con liberación de factor tisular, que se une a la plaqueta y ésta se activa, circulando así la plaqueta por la sangre con una gran activación del sistema de coagulación, lo que convierte a la sangre en hipercoagulable.

#### 1.3.2.8. Homocisteína

La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente de la enfermedad coronaria, el ictus, la arteriopatía de las extremidades inferiores, la isquemia retiniana y las trombosis venosas. Entre las causas de hiperhomocisteinemia, el déficit de ácido fólico es el más frecuente y, en segundo lugar, el déficit de vitaminas B12 y B6. En menor proporción existe una causa genética.

Los estudios clínicos y experimentales sugieren que la homocisteína es la responsable de la predisposición a la arteriosclerosis y trombosis que tienen los pacientes hiperhomocisteinémicos. La homocisteína tiene un efecto citotóxico directo sobre las células endoteliales en cultivo y su exceso altera la función endotelial, la cuál mejora al disminuir la concentración de homocisteína con ácido fólico. La homocisteína promueve la oxidación de las LDL y la multiplicación de las células musculares lisas, disminuye la síntesis de ADN en las células endoteliales, provoca una alteración de los factores de la coagulación y aumenta la agregación plaquetaria (Ueland y col., 2000).

#### 1.3.2.9. Síndrome metabólico (asociación de factores de riesgo)

Hoy día se han desarrollado criterios para definir de una forma arbitraria este conjunto de anomalías por parte de diferentes asociaciones, grupos y entidades. Entre las distintas definiciones, la más utilizada por su simplicidad de aplicación, al no focalizarse de manera prioritaria en una sola alteración y por el hecho de estar avalada por la literatura médica americana, es el National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP III) (Giménez y col., 2006).

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por la convergencia de varios factores de riesgo cardiovascular en un solo sujeto, con un marcado carácter de alteración metabólica subyacente. Estos factores de riesgo metabólicos consisten en: obesidad visceral, dislipemia aterogénica (elevación sérica de triglicéridos, apoproteína B, aumento de LDL, descenso de HDL), elevación de la presión arterial, elevación de la glucosa asociada a resistencia a la insulina, estado protrombótico y estado proinflamatorio. Su presencia en un sujeto duplica su riesgo de presentar una enfermedad cardiovascular de origen aterotrombótico y quintuplica la probabilidad de que éste desarrolle diabetes mellitus tipo 2 en el futuro. El mecanismo principal de este síndrome como denominador común, es la resistencia a la insulina (González, 2006), en cuya génesis juega un papel fundamental el tejido adiposo al segregar hormonas y citoquinas, que provocan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, como son: resistina, leptina, ácidos grasos libres (AGL), FNT- $\alpha$ , IL-6 y adiponectina (cuyos valores son inversamente proporcionales al grado de resistencia insulínica). Provocan resistencia a la insulina tanto muscular como hepática, dando lugar a un hiperinsulinismo compensador que consigue durante años mantener la glucemia en valores normales. Cuando este balance no se alcanza, aparece hiperglucemia, y por tanto, intolerancia a la glucosa en ayunas, y posteriormente DM tipo 2 (Contreras-Leal y Santiago-García, 2011).

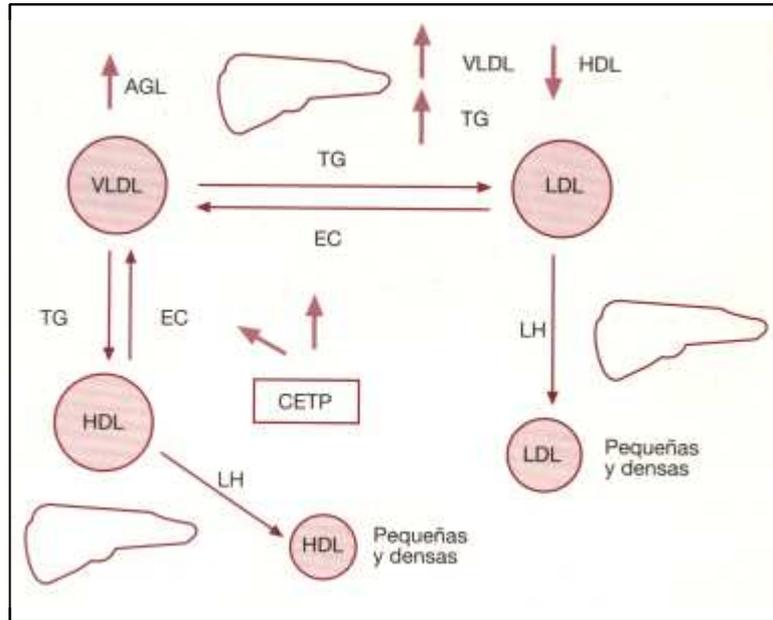
Esta falta de acción periférica de la insulina induce a un aumento de la lipólisis, y los TG se movilizan desde el tejido adiposo abdominal en forma de ácidos grasos libres hacia el músculo para su consumo y hacia el hígado, donde se sintetizan partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Aumentan así los AGL circulantes, e incrementan en el músculo la resistencia a la insulina.

Paralelamente, la disminución en la actividad de la lipoproteinlipasa en el tejido adiposo no produce el aclaramiento de los triglicéridos de las VLDL, por lo que también se acumulan lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y LDL. La vida media de las partículas ricas en triglicéridos se alarga, lo que favorece su exposición a la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), que produce un intercambio de lípidos con otras lipoproteínas. Las partículas VLDL reciben colesterol a cambio de los triglicéridos que ceden. De esta forma se transfieren TG desde las VLDL a las LDL y se produce un paso del colesterol de éstas hacia las VLDL. Aparecen de esta forma, partículas LDL ricas en triglicéridos y pobres relativamente en colesterol. Estas partículas al sufrir la hidrólisis de los TG en el hígado por la lipasa hepática, disminuyen de tamaño e incrementan su densidad: son las LDL “pequeñas y densas” propias de este síndrome y muy aterogénicas.

También las HDL sufren este intercambio de TG y colesterol con las VLDL. Las HDL ricas en TG cedidos por las VLDL sufren la hidrólisis de la lipasa hepática y dan lugar a las partículas HDL pequeñas y densas, con escaso poder antioxidante y vida media más corta, lo que lleva a un descenso del colesterol unido a las HDL. De aquí, la asociación entre la hipertrigliceridemia e insulinoresistencia y descenso del colesterol unido a las HDL.

La figura 4 resume los pasos que se producen en el síndrome metabólico.

**Fig.4.** Esquema de la dislipemia en el síndrome metabólico (Ferreira y col., 2005).



Por último, la resistencia insulínica deteriora la función endotelial y es esta alteración la que conduce a la hipertensión arterial, por desequilibrar el tono endotelial hacia la vasoconstricción. La insulina tiene efectos presores a través de una estimulación del sistema nervioso simpático y facilita la absorción renal de sodio, promueve la hiperplasia de las células de músculo liso de la pared vascular, e incrementa la sensibilidad de la presión arterial al sodio de la dieta, aumenta la respuesta a la angiotensina II y facilita la acumulación de calcio intracelular. Así pues, la resistencia a la insulina es más prevalente entre hipertensos que en la población general, y está asociada a una presión arterial superior y a una mayor prevalencia de hipertensión (Ferreira y col., 2005).

#### 1.4. BIOMARCADORES DE LESIÓN ARTERIOSCLERÓTICA

El término biomarcador se puede definir como cualquier variable medible (sustancia en muestra clínica como sangre u orina, imagen tisular u orgánica...) que permite reflejar procesos fisiopatológicos, predecir

eventos cardiovasculares futuros, indicar daño orgánico, indicar enfermedad o monitorizar la respuesta a un tratamiento, y que además puede ser un factor causal.

La arteriosclerosis es una enfermedad inflamatoria, por lo que se ha postulado que algunos marcadores de inflamación circulantes podrían utilizarse como factores predictivos de enfermedad cardiovascular en la población general. Se han descrito numerosos reactantes de fase aguda, como la proteína C reactiva, el fibrinógeno, el PAI-1, la IL-6, TNF- $\alpha$ , la pro-hormona péptido natriurético tipo B (proBNP), que se relacionan con un riesgo cardiovascular aumentado.

#### **1.4.1. PCR**

A diferencia de otros biomarcadores, la PCR es más sensible y estable. La PCR es una proteína sintetizada por el hígado en situaciones de inflamación o infección, pero también se produce a nivel local en las células musculares lisas de vasos dañados, en respuesta a IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ . A pesar de la falta de especificidad diagnóstica, su determinación reflejaría la presencia e intensidad de la inflamación presente en la enfermedad ateromatosa. En estudios prospectivos ha mostrado ser un indicador de inflamación sistémica y tener un claro valor predictivo en la aparición del primer evento cardiovascular, infarto de miocardio e ictus, (Ridker y col., 2002). Por otro lado, en los pacientes coronarios, el incremento de PCR es un marcador del riesgo de recurrencia y de un peor pronóstico (Biasucci y col., 1999). Como los valores de PCR aumentan de forma notable (más de 100 veces) con cualquier proceso inflamatorio inespecífico, se aconseja para valorar su uso como indicador de una inflamación subclínica, descartar cualquier cuadro sistémico y considerar un límite máximo de 1 mg/dL.

Con todas estas evidencias disponibles, la Asociación Americana del Corazón (AHA) publicó en 2003 unas recomendaciones que podemos

resumir en los cuatro puntos siguientes: el mejor marcador disponible de inflamación en el proceso arteriosclerótico es la PCR de alta sensibilidad; la PCR se debe cuantificar mediante técnicas de alta sensibilidad, debiéndose descartar procesos infecciosos o inflamatorios si los niveles son superiores a 1 mg/dL; los puntos de corte que definen bajo, medio y alto riesgo son  $> 0.05$  mg/dL, 0.1 a 0.3 mg/dL y  $> 0.3$  mg/dL; y la mayor evidencia (tipo B) de su utilidad es en sujetos de riesgo intermedio cardiovascular (del 10% al 20% a 10 años) en prevención primaria.

En el SM, la obesidad abdominal es el factor clínico más importante que determina los valores de PCR. Existen datos fisiopatológicos que relacionan la obesidad con una situación proinflamatoria, pues como se ha comentado en el apartado anterior, los adipocitos viscerales son una fuente de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6) que a su vez estimulan la secreción hepática de PCR, que es un marcador inespecífico de inflamación. En estudios prospectivos realizados a corto plazo en series de pocos pacientes la pérdida de peso se acompaña de una disminución de los valores de PCR.

Por otro lado, tras tratamiento con estatinas, un tratamiento intensivo con 80 mg de atorvastatina en pacientes con enfermedad coronaria documentada angiográficamente, comparados con un tratamiento moderado con 40 mg de pravastatina, se ha observado un descenso mayor de LDL y de los niveles de PCR en el tratamiento intensivo, junto con una menor progresión del volumen de la placa de ateroma, lo que sugiere una relación entre ambos biomarcadores y la progresión de la enfermedad (Nissen y col., 2005).

Recientemente Thongtang y col., 2013, estudian el mecanismo por el que disminuye la PCR en un grupo de personas con dosis intensivas de atorvastatina (80 mg) comparado con placebo, llegando a la conclusión de que aumenta el catabolismo de la PCR, manteniéndose constante la producción de dicha proteína.

### **1.4.2. Fibrinógeno**

El fibrinógeno es un importante determinante de la viscosidad sanguínea y la agregabilidad plaquetaria. En numerosos estudios, el exceso de fibrinógeno plasmático se ha mostrado como un potente predictor independiente de la recurrencia de episodios cardiovasculares en aquellos individuos con enfermedad cardiovascular establecida y de primeros episodios isquémicos en individuos sanos (Maresca y col., 1999). Sin embargo, existen distintos factores que disminuyen la utilidad clínica del fibrinógeno, entre éstos está la gran variabilidad intraindividual de sus concentraciones, el ser un reactante de fase aguda que aumenta de forma inespecífica en las enfermedades inflamatorias, el estar influenciado por factores ambientales, tales como la actividad física, la pérdida de peso y el consumo moderado de alcohol, que lo disminuyen, mientras que el hábito de fumar lo aumenta de forma muy evidente. También lo disminuyen los fibratos, la ticlopidina y el tratamiento sustitutivo con estrógenos.

### **1.4.3. Inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)**

El PAI-1 es una proteína reguladora de la cascada de la coagulación e inhibidor rápido de la activación del plasminógeno, por lo que desciende la fibrinólisis. Es pues, un marcador de un mayor riesgo cardiovascular en estudios realizados en personas sanas de ambos sexos y en individuos con enfermedad coronaria, con enfermedad vascular periférica y con enfermedad carotídea previa; y en la obesidad, dado que el TNF- $\alpha$  es el mediador del incremento del PAI-1 en la obesidad y de la resistencia a la insulina, contribuyendo directamente al desarrollo de DM tipo 2 y enfermedad coronaria (De Taeye y col., 2005).

### **1.4.4. Factor de necrosis tumoral alfa e interleucina-6**

Son citoquinas proinflamatorias que reflejan procesos inflamatorios en la arteria y en otros tejidos, como el tejido adiposo. En el adipocito el TNF- $\alpha$

estimula la expresión de IL-6, mientras que disminuye la expresión de adiponectina, lo que juega un papel clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina y del síndrome metabólico (Berg y Scherer, 2005).

#### **1.4.5. Moléculas de adhesión celular solubles (VCAM-1, ICAM-1, P-selectina)**

No sólo son marcadores de inflamación, sino que desempeñan un papel en la vulnerabilidad de la placa y la progresión rápida de la estenosis coronaria. De todos los estudios realizados con las proteínas de adhesión que se liberan para atraer al monocito cuando hay daño endotelial, se ha visto que sólo el ICAM-1 tiene cierta especificidad, y aunque existe un gran margen de error, puede ser un marcador de daño endotelial cuando está muy elevado. En el Physicians Health Study, los varones con valores aumentados de ICAM-1 mostraron un riesgo aumentado de infarto de miocardio (Ridker y col., 1998).

#### **1.4.6. Microalbuminuria**

En condiciones normales se excreta por orina menos de 30 mg de proteínas al día, ya que las proteínas prácticamente no se filtran por los glomérulos y existe un procesamiento tubular proteico que evita la pérdida urinaria de proteínas. La eliminación de 30 a 300 mg diarios de proteínas por orina constituye la microalbuminuria. Cuando se eliminan más de 300 mgr al día, hablamos de proteinuria; y si se supera el gramo diario consideramos la pérdida proteica como proteinuria franca.

En la patogenia de la microalbuminuria pueden coexistir tres procesos fisiopatológicos: cambios hemodinámicos (por vasoconstricción de la arteriola eferente, aumento de la presión de filtración e hiperfiltración), alteraciones de la permeabilidad de los capilares glomerulares y alteraciones del procesamiento tubular de la albúmina. Estos procesos se pueden producir por la acción de mecanismos patogénicos comunes a los que ocasionan la arteriosclerosis como son los mediadores inflamatorios y

la disfunción endotelial resultante. Por ello, la microalbuminuria es un indicador de daño vascular objetivado a nivel renal pero que no tenemos que circunscribirlo a dicho territorio. Aunque es bien conocida la relación de la diabetes y la microalbuminuria como marcador de nefropatía diabética, hay otros factores arterioscleróticos que pueden originar microalbuminuria, como la hipertensión, el tabaquismo, las partículas LDL oxidadas, la hiperinsulinemia, la hiperhomocisteinemia y la acción de la angiotensina II. Se ha demostrado una relación de la microalbuminuria con el riesgo cardiovascular a nivel coronario y cerebral en diabéticos y no diabéticos, e incluso un aumento de la mortalidad en diabéticos en la medida que es mayor la microalbuminuria (Miettinen y col., 1996).

## **1.5. DETECCIÓN PRECOZ DE ARTERIOSCLEROSIS MEDIANTE PRUEBAS DE IMAGEN NO INVASIVAS**

Dada la importancia de la composición de la placa, más que del grado de estenosis, a lo largo del último decenio se han efectuado avances importantes en las diferentes pruebas de imagen no invasivas para poder definir con detalle las placas aterotrombóticas y detectar alteraciones subclínicas con el objeto de mejorar la valoración del riesgo cardiovascular, especialmente en los pacientes con un riesgo intermedio.

### **1.5.1. Ecografía carotídea**

En 1986, Pignoli y col. demostraron en piezas quirúrgicas de tejido arterial que las dos líneas ecogénicas paralelas apreciables en cortes longitudinales de la pared distal carotídea se originaban a partir de las interfases sangre-íntima y media-adventicia, respectivamente, y propusieron la medida de la separación entre ambas líneas para la cuantificación de la aterosclerosis. Desde entonces varios grupos han confirmado la validez de esta propuesta; se puede determinar pues el grosor parietal de las arterias de calibres grande e intermedio (carotídeo y aorta), sus características cualitativas y cuantitativas. Las placas heterogéneas hipoeoicas se asocian a hemorragia y lípidos en su

interior, mientras que las placas homogéneas hiperecoicas son fundamentalmente fibrosas. Es un método no invasivo, fiable y reproducible, de bajo coste, que valora la aterosclerosis preclínica.

En diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que el grosor del complejo íntima-media (GIM) de la carótida primitiva medido por ecografía se relaciona con los factores de riesgo cardiovascular clásicos, con la existencia y gravedad de las lesiones coronarias y lo que es más importante, tiene valor predictivo de la positividad de la prueba de esfuerzo en estudios transversales y del desarrollo de cardiopatía isquémica en estudios longitudinales (Salonen y Salonen, 1991), demostrando que el riesgo de infarto de miocardio aumenta 2´14 veces por cada milímetro de engrosamiento de la íntima. Es pues, un factor de riesgo independiente de la incidencia de enfermedad cardíaca coronaria y accidente vascular cerebral (Viles-González y col., 2004).

En estos estudios un GIM aumentado y/o la detección precoz de placas incrementaron el riesgo relativo de complicaciones clínicas de aterosclerosis hasta cinco veces más allá del valor predictivo de los factores de riesgo tradicionales. Este nivel de riesgo es similar al observado en prevención secundaria, por lo que una ecografía carotídea patológica predice un riesgo equivalente al del paciente con enfermedad cardiovascular previa. Basándose en estas evidencias, la American Heart Association recomienda efectuar una ecografía carotídea en pacientes seleccionados de riesgo global intermedio y propone que, en caso de obtener una prueba patológica, se considere al paciente de alto riesgo o equivalente a prevención secundaria. A la inversa, el hallazgo de una pared carotídea delgada y sin placas puede mitigar la intensidad de la intervención, al recalificar a un individuo supuestamente de riesgo intermedio como de bajo riesgo.

Antes de tomar decisiones clínicas sobre la base de los hallazgos de la ecografía carotídea, se diseñó un estudio para conocer los valores de referencia en la población española (Junyent y col. 2005) con el objetivo

de definir los parámetros de la normalidad de la ecografía carotídea en función del sexo y la edad en individuos sanos. En general el GIM medio y máximo fueron mayores en los varones que en las mujeres. Los varones presentaban placas en edades más jóvenes que las mujeres, con una progresión gradual y afectación en más de la mitad de los grupos a partir de los 55 años. En cambio, en las mujeres la progresión de la frecuencia de placas fue más brusca, y se igualó a la de los hombres a partir de los 65 años, convergiendo ambos sexos a la edad de 80 años. Es la edad, el principal factor que condiciona la progresión del GIM y la aparición de placas de ateroma.

### **1.5.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

La aplicabilidad de la RMN no se limita al diagnóstico de la enfermedad aterosclerótica, sino también a la caracterización de los mecanismos celulares implicados en el desarrollo del daño vascular, y el estudio de la evolución de la placa de ateroma, tanto en animales de experimentación como en humanos. Además es importante conocer la progresión en el tiempo de las lesiones vasculares, y no sólo disponer de información puntual sobre su estructura. La evolución de la placa de ateroma en una arteria debe considerarse como una enfermedad tumoral, en la que es más importante determinar el grado de malignidad que la estenosis. En este caso, la biopsia corresponde a las imágenes que se pueden obtener utilizando técnicas, que como la RMN, nos aportan una información relevante sobre la biología de las lesiones.

En un estudio progresivo de imagen en arterias carótidas humanas (Corti y col., 2002) con RMN, se ha determinado el efecto del tratamiento hipolipemiente con estatinas en pacientes con hipercolesterolemia asintomáticos y no tratados con aterosclerosis carotídea y aórtica. A pesar del efecto hipolipemiente precoz y esperado de las estatinas, debió transcurrir un mínimo de 12 meses para demostrar una disminución de la superficie parietal vascular y una sustitución de la grasa por tejido conectivo, sin modificaciones del calibre luminal.

La última fase de la organización del trombo por tejido conectivo, está siendo estudiada por RMN para conocer la edad del trombo. Se han obtenido resultados positivos utilizando dos modelos experimentales (conejo y porcino) tras la realización de angioplastia (Worthley y col., 2000). Ultimamente se ha detectado la rotura del casquete fibroso (identificado mediante RMN) en pacientes que habían sufrido un ictus isquémico o un AIT durante los 90 últimos días. Además el uso de gadolinio aporta información adicional al identificar la neovascularización en las placas aterotrombóticas, y diferencia el casquete fibroso de la zona central necrótica (Viles-González y col., 2004). Por último, se han efectuado técnicas de RMN de sangre oscura con alta resolución en arterias coronarias humanas normales y ateroscleróticas, observando una diferencia en el grosor parietal máximo entre las personas normales y los pacientes (estenosis  $\geq$  40%), estadísticamente significativa.



## **Capítulo 2**

# **HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO**



La enfermedad grasa hepática no alcohólica (EGHNA) está definida por un patrón de lesión histológica específico similar al de la hepatopatía alcohólica en individuos que no consumen alcohol (consumo menor de 20 gr/día), pues se ha estimado que un consumo de 20 gr diario puede causar esteatosis hepática (Coates y col., 1986). Esta dosis hepatotóxica es variable en la población general que oscila de 20-30 gr/día en mujeres a 40 gr/día en hombres (Becker y col., 1996). La esteatosis hepática es además un factor de riesgo para la lesión hepática inducida por el alcohol (Naveau y col., 1997). Es importante pues, excluir el consumo de alcohol. La EGHNA es un espectro anatomoclínico que engloba a la esteatosis simple (con o sin inflamación), la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y a la cirrosis hepática grasa, existiendo áreas de solapamiento entre estos tres patrones que se consideran parte del amplio espectro de la lesión histológica (Clark y col., 2002). Estos cambios histológicos con frecuencia son reversibles en los estadios iniciales, pero a medida que la enfermedad progresa a fibrosis y cirrosis, el potencial de reversibilidad disminuye. Así por orden de severidad se divide en:

- 1) Esteatosis con/sin inflamación.
- 2) EHNA (esteatosis, inflamación y balonización) o (esteatosis, balonización, hialina de Mallory y/o fibrosis).
- 3) Cirrosis hepática.

La EGHNA se ha consolidado como la enfermedad hepática más prevalente en los países desarrollados. Las actuales estimaciones (Moreno Sánchez, 2009) sitúan la prevalencia en un 20-30% de norteamericanos adultos con elevación crónica de aminotransferasas, y la EHNA en un 2-5%, estimándose que un 19% de estos últimos evolucionan a cirrosis. Esta prevalencia se incrementa a un 70-90% entre las personas que son obesas y tienen diabetes, en los países occidentales, con un riesgo incrementado de desarrollar fibrosis y cirrosis (Targher y col., 2010).

En su etiopatogenia se distingue una forma primaria y otra secundaria. La EGHNA primaria (objeto de este estudio por su alta prevalencia e impacto social) de etiología desconocida tiene bien establecido que los factores medioambientales (la obesidad y el sedentarismo), la resistencia a la insulina (RI) y el estrés oxidativo, junto a la diabetes tipo 2, hipertensión arterial e hipertrigliceridemia, son elementos esenciales; pero cierta agregación familiar de casos, diferencias étnicas significativas y evolución a fibrosis y cirrosis sólo en una minoría de sujetos apuntan a una predisposición individual a la enfermedad y/o a sus formas más graves (Moreno Sánchez, 2009).

Por otro lado está la EGHNA secundaria, de etiología conocida en asociación con un gran número de técnicas quirúrgicas relacionadas con la obesidad y una rápida pérdida de peso, metabólicas (enfermedad de Wilson, glucogenosis tipo 1, abetalipoproteinemia), tóxicas (amiodarona, maleato de perhexilina, bloqueadores de los canales del calcio, glucocorticoides a altas dosis, estrógenos sintéticos, tamoxifeno, cloroquina, síndrome del aceite tóxico, toxicidad por dimetilformamida) y otras anomalías de la nutrición (anorexia, ayuno, bulimia, nutrición parenteral total, enfermedad celiaca, diverticulosis yeyunal y otros sobrecrecimientos bacterianos), cuyas patologías deben ser excluidas pues su pronóstico y tratamiento es distinto (Chitturi y Farrell, 2001).

La presentación clínica de la EGHNA en la mayor parte de los pacientes suele ser asintomática, aunque algunos refieren astenia y molestias en el hipocondrio derecho del abdomen (Santos y col., 2010). El paciente obeso o diabético con hígado graso crónico sólo tiene una hepatomegalia ligeramente dolorosa a la palpación. Las pruebas de función hepática son normales o muestran ligeras a moderadas elevaciones de las aminotransferasas, la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT). El índice AST/ALT es usualmente menor de 1, pero este índice se incrementa en la fibrosis avanzada conduciendo hacia una pérdida de su exactitud diagnóstica en pacientes con cirrosis por EGHNA. La fosfatasa alcalina (FA) y/o la gamma glutamil transpeptidasa

(GGT), pueden ser normales o aumentar hasta el triple de lo normal en algunos pacientes, aunque su rango de elevación es menor que el observado en la hepatitis alcohólica (Brea y Puzo, 2010). Los hallazgos de enfermedad hepática crónica y disminución del número de plaquetas sugieren una enfermedad avanzada y que la cirrosis está presente.

Por lo general la presencia de EGHNA se confirma con estudio ultrasonográfico (US) al mostrar un incremento difuso de la ecogenicidad en el hígado al compararlo con los riñones. La ecografía tiene una sensibilidad del 89% y una especificidad del 93% en la detección de la esteatosis y una sensibilidad y especificidad del 77% y 89% respectivamente para detectar fibrosis (Saadeh y col., 2002), siendo incapaz de detectar procesos necroinflamatorios. Con la tomografía axial computerizada (TAC) la infiltración grasa del hígado produce una disminución de la densidad del parénquima hepático. La esteatosis es difusa en la mayoría de los pacientes con EGHNA, pero ocasionalmente es focal, y en estos casos la US y el TAC pueden malinterpretar la imagen como una lesión hepática maligna, pudiendo en estos casos la resonancia magnética nuclear distinguir la lesión ocupante de espacio de la infiltración grasa focal.

Aunque como se ha comentado previamente, la EGHNA puede diagnosticarse con métodos no invasivos, la distinción entre esteatosis simple y EHNA sólo puede realizarse mediante estudio histológico (Saadeh y col., 2002). Los estudios de imagen aunque ayudan en la observación de cierta infiltración grasa en el hígado no pueden ser usados con exactitud para determinar la severidad del daño hepático.

En la actualidad ningún fármaco ha sido aún aprobado para el tratamiento de la EHNA (Moreno Sánchez, 2009), aunque recientemente se han publicado los resultados de un estudio multicéntrico que evaluó la eficacia y seguridad de dosis altas de ácido ursodesoxicólico, con resultados alentadores (Ratziu y col., 2011). Los pilares del tratamiento son pues, la

reducción del índice de masa corporal (IMC) y la recuperación de la sensibilidad a la insulina. Por tanto, cuando los análisis de laboratorio y las pruebas de imagen sean compatibles con la EGHNA y el paciente presente factores de riesgo para la enfermedad, éstos deben ser tratados. Si no hay mejoría evidente se sugiere la realización de una biopsia hepática que confirme el diagnóstico y proporcione datos sobre el grado y estadio de la enfermedad. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que existe una serie de factores que aumentan el riesgo de evolución de la EHNA hacia formas más avanzadas, incluyendo la aparición de cirrosis. Entre estos factores se han identificado la edad (mayor de 45 años), un índice de masa corporal alto (superior a 28 Kg/m<sup>2</sup>), un cociente GGT/ALT superior a 1 y la coexistencia de al menos dos causas de EHNA, como la diabetes mellitus y la dislipemia (Clemente y García, 2003).

## **2.1. LESIÓN PARENQUIMATOSA EN LA EGHNA**

### **2.1.1. Esteatosis**

El hígado graso puede clasificarse en dos tipos, según sea la forma de depósito graso en los hepatocitos, macrovesicular o microvesicular. El hígado graso macrovesicular es el tipo más frecuente de hígado graso y se observa sobre todo en alcoholismo o hepatopatía alcohólica, diabetes mellitus, obesidad y tras nutrición parenteral prolongada. Su histología muestra hepatocitos con grandes vacuolas llenas de lípidos que desplazan el núcleo hacia la periferia de la célula.

La esteatosis hepática puede observarse con o sin inflamación, y representa un desequilibrio entre la importación y la síntesis de lípidos de una parte y su catabolismo y excreción de otra. En el análisis lipídico hepático cuantitativo de la EGHNA publicado (Puri y col, 2007), el contenido de ácidos grasos libres fue normal, el de triglicéridos y el de diglicéridos aumentó, y el cociente entre estos dos últimos se incrementó de manera progresiva hasta la EHNA. Esto demuestra un aumento de actividad de la diacilglicerol aciltransferasa, una enzima sensible a la

leptina que promueve el paso de los ácidos grasos libres tóxicos a triglicéridos (una forma de almacenamiento bastante inerte). Si bien la normalidad del contenido de ácidos grasos libres en el hígado descarta la hipótesis clásica de la lipotoxicidad, la acumulación intrahepática progresiva de triglicéridos se asocia a un deterioro creciente de la sensibilidad a la insulina en el propio hígado, en el músculo esquelético y en el tejido adiposo, como se ha puesto de manifiesto en individuos obesos no diabéticos; lo que avala la hipótesis de que la EGHNA es parte de una alteración multiorgánica de sensibilidad a la insulina.

### **2.1.2. Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)**

En la EHNA además de la esteatosis, se observa lesión hepatocelular (balonización, apoptosis/necrosis, hialina de Mallory, megamitocondrias), inflamación (neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos T) y fibrosis. Esta lesión predomina inicialmente en la región perivenular. De todos los hallazgos, el criterio más importante es la balonización y está típicamente asociada a la formación de hialina de Mallory.

La degeneración balonizante resulta de la acumulación de fluido intracelular y se caracteriza por el hinchamiento del hepatocito y finalmente la granulación y rarefacción del citoplasma. Los grupos de hepatocitos balonizados son típicos de la zona perivenular, cerca de los hepatocitos esteatósicos (Kleiner y col, 2005). La muerte de los hepatocitos puede ocurrir por apoptosis o necrosis. Resultado de la muerte apoptótica de la célula se observan pequeños fragmentos de citoplasma refringente eosinófilo en el sinusoides (cuerpos acidófilos). La severidad de la esteatosis, parece ser importante en determinar la extensión de la apoptosis, a mayor esteatosis se produce mayor apoptosis.

La hialina de Mallory, hallazgo característico de la esteatohepatitis alcohólica y común en EHNA, es una inclusión citoplasmática perinuclear

que consiste en agregados bien caracterizados de péptidos del citoesqueleto, en los hepatocitos balonzados de la zona perivenular, dando lugar a una quimiotaxis de los neutrófilos alrededor de las células afectadas, proceso que se denomina “satelitosis”. La presencia de la hialina de Mallory no se considera necesaria para el diagnóstico de EHNA (Burt y col., 1998).

El rasgo característico del infiltrado lobulillar que distingue a la EHNA de otras formas de enfermedad crónica hepática es la presencia de leucocitos polimorfonucleares en el sinusoides, sobre todo, junto a células balonzadas, proceso anteriormente descrito como satelitosis (Baptista y col., 1981). Por otro lado, la inflamación de la esteatohepatitis es típicamente leve y predominantemente lobulillar, más que portal, caracterizada por ser mixta con neutrófilos, linfocitos y macrófagos/células Kupffer, existiendo una fuerte correlación entre el infiltrado de leucocitos neutrófilos y la apoptosis en la EHNA.

Por último, el patrón de fibrosis reconocido en la EHNA es uno de los hallazgos que sirve para distinguirla junto con la esteatohepatitis alcohólica, de otras formas necroinflamatorias, colestásicas y enfermedades hepáticas metabólicas, en las cuáles, la fibrosis es inicialmente portal. Así pues, el depósito inicial de colágeno se observa en la zona perivenular del espacio perisinusoidal y usualmente en asociación con otras lesiones de esteatohepatitis (Ludwig y col., 1997). En algunas áreas, el colágeno parece revestir las células en un patrón de fibrosis pericelular, como está descrito en la enfermedad hepática alcohólica. Sin embargo, también puede haber un patrón de fibrosis periportal progresivo, con cambios inflamatorios parecidos a los observados en las hepatitis crónicas y alteraciones biliares similares a la obstrucción biliar de bajo grado con reacción ductular, aunque no es una característica típica.

### 2.1.3. Cirrosis

La biopsia hepática es aún la prueba diagnóstica más fiable de la EGHNA, en especial para la gradación y estadificación de la lesión. En estudios llevados a cabo mediante biopsias secuenciales, los individuos con esteatosis simple tienen una esperanza de vida similar a la población general y un riesgo bajo de desarrollar enfermedad hepática terminal, pero aquellos con balonización hepatocelular, fenómenos necroinflamatorios y fibrosis (EHNA) tienen un pronóstico peor (Moreno Sánchez, 2009). En el seguimiento de una cohorte de 129 pacientes con EGHNA y elevación de aminotransferasas, tras 13,7 años de seguimiento y en comparación con la población general, la supervivencia de los sujetos con EHNA fue menor (el 70% frente al 80%) y la mortalidad fue superior, tanto por motivos hepáticos como por motivos cardiovasculares. En el 41% de los casos se constató progresión de la fibrosis y en el 5,4% se desarrolló enfermedad hepática terminal, lo que se asoció al exceso de peso y a la intensidad de la resistencia insulínica. Así pues los pilares del tratamiento son la reducción del índice de masa corporal y la recuperación de la sensibilidad a la insulina.

No obstante, tras el análisis comparativo de la evolución, la cirrosis grasa parece tener un mejor pronóstico vital que la cirrosis causada por el virus C. En un estudio llevado a cabo por autores suecos (Sanyal y col., 2006) tras el análisis comparativo de la evolución de 152 sujetos con cirrosis grasa y 150 sujetos con cirrosis por virus C, se observó una mortalidad a 10 años inferior en el grupo de la cirrosis grasa (el 19 frente al 29%;  $p < 0,04$ ), lo que estuvo vinculado a un menor desarrollo de ascitis (el 14 frente al 41%;  $p < 0,006$ ) y de hepatocarcinoma (el 6,7 frente al 17,0%;  $p < 0,01$ ), mientras que la mortalidad cardiovascular fue superior (el 5,2 frente al 0,7%;  $p < 0,03$ ).

Por último, hoy en día, la EGHNA supone la tercera causa de trasplante hepático en el mundo, si bien la recurrencia de la lesión hepática es

frecuente. En un análisis retrospectivo de 68 casos, y tras 28+/-18 meses, el 18% desarrolló EGHNA de novo y el 9% desarrolló EHNA. En cualquier caso, la pérdida del injerto de 5 a 10 años es comparable con la media del resto de los motivos de trasplante hepático (Moreno Sánchez, 2009).

## **2.2. SISTEMA DE PUNTUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EHNA**

A mediados de 1990 se introdujo el concepto de gradación y estadificación por separado como reevaluación de las hepatitis crónicas y autoinmunes (Ishak, 1995). La gradación o actividad de la hepatitis crónica es una medida de la gravedad de la enfermedad y corresponde al daño hepatocelular, la necrosis y la inflamación. Por otro lado, la estadificación es una medida de la progresión de la enfermedad y su evaluación histológica está basada en la extensión de la fibrosis y el desarrollo de cirrosis.

En 1999, Brunt y colaboradores hacen la propuesta de extender este sistema de estadificación y gradación a la EHNA, analizaron material de 51 biopsias de 50 pacientes con esteatohepatitis (28 mujeres y 22 hombres) con edades entre 18 y 72 años, excluyéndose previamente otras formas de enfermedad hepática, tratamiento con esteroides o un consumo de alcohol mayor a 20 gr/día, durante un periodo de cinco años.

### **2.2.1. Gradación de la esteatohepatitis**

El grado de actividad de la esteatohepatitis se basa en la combinación de distintas variables entre las que se incluyen la esteatosis hepatocelular, la balonización de los hepatocitos y la inflamación portal y lobulillar (Brunt y col., 1999). Según el grado de afectación, se divide en leve, moderado y grave (Tabla 1).

**Tabla 1.** Gradación de la EHNA

GRADO	ESTEATOSIS	BALONIZACIÓN	INFLAMACIÓN
Leve	1-2	Mínimo	Lobulillar 1-2 Portal 0-1
Moderado	2-3	Presente	Lobulillar 2 Portal 1-2
Grave	3	Marcado	Lobulillar 3 Portal 1-2

Características individuales valoradas semicuantitativamente en una escala de:

0=ausente, 1=leve, 2=moderado, 3=severo.

Severidad de la esteatosis según la proporción de hepatocitos afectados: 1= < 33%, 2= 33 – 66 %, 3= > 66%.

Severidad de la inflamación lobulillar basada en el número de focos inflamatorios en campos 200x: 1= 1-2, 2= 3-4, 3= >4.

Tomada de Brunt 1999 y Neuschwander-Tetri y Caldwell 2003.

Este sistema estaba propuesto inicialmente para la evaluación de la esteatohepatitis clásica como se ha descrito previamente, sin considerar los casos de EGHNA que no reunían los criterios generalmente aceptados para la EHNA, y no se hacía mención al patrón de fibrosis que se había observado en algunos casos pediátricos, y por último también esto implica que las tres características histológicas valoradas se incrementen en paralelo unas a otras.

### 2.2.2. Estadificación de la EHNA

Como en las hepatitis crónicas, el estadio es definido por el grado de fibrosis. Así pues, se refleja el patrón de fibrosis, el incremento de depósito de tejido conectivo y el remodelamiento arquitectural.

El inicio de la fibrosis en la esteatohepatitis no alcohólica se produce en la zona 3 perisinusoidal o pericelular. Este tipo de inicio y su progresión observada, es la base para proponer el sistema de estadificación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Estadificación de la fibrosis en la EHNA

Estadio 1	Fibrosis perivenular, perisinusoidal/pericelular en zona 3, focal o extensa.
Estadio 2	Como la anterior con fibrosis periportal focal o extensa.
Estadio 3	Fibrosis en puentes, focal o extensa.
Estadio 4	Cirrosis.

(Tomada de Brunt 1999 y Neuschwander-Tetri y Caldwell 2003).

### 2.2.3. Puntuación histológica de la severidad

En respuesta a la necesidad de estudiar la historia natural de la EGHNA, su pronóstico y tratamiento en adultos y niños afectados por el espectro entero de la EGHNA/EHNA y que pudiera ser validada en relación con su reproducibilidad, en 2005 se publicó una escala de actividad histológica ideada por la red de investigación clínica de esteatohepatitis no alcohólica, (Kleiner y col., 2005) donde desarrollan un sistema de puntuación que incluye todo el rango de características vistas en niños y adultos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Sistema de puntuación histológico para adultos y niños con EGHNA

Característica	Definición	Puntuación
	<b>ESTEATOSIS</b>	
<b>Grado</b>	< 5 %	0
	5 – 33 %	1
	33 – 66 %	2
	> 66 %	3
<b>Localización</b>	Zona 3	0
	Zona 1	1
	Azonal	2
	Panacinar	3
<b>Esteatosis microvesicular</b>	Ausente	0
	Presente	1

		INFLAMACIÓN	
<b>Inflamación lobular</b>	0 focos		0
	< 2 focos por campo 200x		1
	2-4 focos por campo 200x		2
	>4 focos por campo 200x		3
<b>Microgranuloma</b>	Ausente		0
	Presente		1
<b>Lipogranuloma</b>	Ausente		0
	Presente		1
<b>Inflamación portal</b>	Ninguna o mínima		0
	Mayor a la anterior		1
		LESIÓN CELULAR	
<b>Balonización</b>	Ninguno		0
	Pocas células balonizadas		1
	Muchas células balonizadas		2
<b>Cuerpos acidófilos</b>	Ninguno o raro		0
	Varios		1
<b>Macrófagos pigmentados</b>	Ninguno o raro		0
	Varios		1
<b>Megamitocondria</b>	Ninguna o rara		0
	Varias		1
		OTROS HALLAZGOS	
<b>Hialina de Mallory</b>	Ninguna o rara		0
	Varias		1
<b>Núcleo glucogenado</b>	Ninguno o raro		0
	Varios		1
		FIBROSIS	
<b>Estadio</b>	Ninguna		0
	Leve, zona 3, perisinusoidal		1 A
	Moderada, zona 3, perisinusoidal		1 B
	Portal / periportal		1 C
	Perisinusoidal y portal/periportal		2
	Fibrosis en puentes		3
	Cirrosis		4

(Tomado de Kleiner y col., 2005, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network, NASH CRN).

Este sistema de puntuación, basado en el sistema original, valora las tres características histológicas principales de la actividad de la enfermedad, pero de forma individual, para dar lugar a un índice de actividad general (NASH activity score).

#### 2.2.4. Índice de actividad de la EHGNA (NAS)

Aunque hay un gran espectro de lesiones histológicas encontradas en la EHGNA, únicamente hay cuatro elementos que son esenciales: la esteatosis, la inflamación lobular, la balonización y la fibrosis. Como se ha mencionado previamente, Kleiner y col. (2005), desarrollaron una escala de actividad histológica validada en relación con su reproducibilidad pero no en cuanto a su potencia pronóstica, un índice de actividad para la EHGNA, el NASH Activity Score (NAS), usado de igual forma que el índice de actividad histológico (HAI) en la hepatitis crónica viral.

Este índice, el NAS, es el resultado de la suma de los distintos índices de puntuación que se han obtenido para el grado de esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3) y balonización (0-2), y tiene por tanto una escala que va desde el 0 al 8. El índice de fibrosis no se incluía en el NAS, con la finalidad de mantener separadas las características histológicas indicativas del grado de actividad de la enfermedad y las características consideradas para el estadio de la enfermedad, como la fibrosis (Tabla 4).

**Tabla 4.** Puntuación de la actividad de la EHGNA (NAFLD Activity Score, "NAS")

Característica	Puntuación
<b>Esteatosis (0-3)</b>	
<5% de hepatocitos afectados	0
5-33% de hepatocitos afectados	1
33-66% de hepatocitos afectados	2
>66% de hepatocitos afectados	3

<b>Inflamación lobulillar (0-3)</b>	
Ningún foco	0
<2 focos por campo 200x	1
2-4 focos por campo 200x	2
>4 focos por campo 200x	3
<b>Hepatocitos balonizados (0-2)</b>	
Ninguno	0
Pocas células balonizadas	1
Muchas células afectadas	2

(Modificado de Kleiner y col., 2005).

Según el valor total de la puntuación, el NAS se clasifica en:

- ≥ 5        EHNA probable o definitiva
- 3 – 4      Dudoso diagnóstico de EHNA
- ≤ 2        No diagnóstico de EHNA

Así pues, la esteatohepatitis es un patrón específico de lesión hepática, siendo la biopsia hepática el patrón más fiable para su diagnóstico, sin embargo, tiene en contra no sólo el ser un procedimiento invasivo y costoso, sino también la variabilidad de la muestra. Por tanto, el NAS como otros sistemas de puntuación son herramientas de investigación y no pueden reemplazar el diagnóstico estándar de evaluación del patólogo.



## **Capítulo 3**

# **CORRELACIÓN DE LAS LESIONES ARTERIOSCLERÓTICAS EN TRONCOS SUPRA-AÓRTICOS Y LAS LESIONES DE EGHNA**



La enfermedad hepática grasa, causa más común de alteraciones en la analítica de la función hepática en la práctica clínica, está frecuentemente asociada con obesidad visceral, dislipemia, resistencia a la insulina y DM tipo 2, y puede representar otro componente del síndrome metabólico, siendo parte de una alteración multiorgánica de falta de sensibilidad a la insulina (Santos y col., 2010). Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado estudios clínicos y epidemiológicos que han monitorizado los estadios más tempranos de la arteriosclerosis mediante la medida del grosor íntima-media (GIM) con ecografía carotídea, cuyo aumento se considera un marcador temprano de arteriosclerosis generalizada (De Groot y col., 2004), ya que se ha asociado con un riesgo cardiovascular desfavorable de arteriosclerosis en otras localizaciones, se ha relacionado con la existencia de cardiopatía isquémica y con la extensión del ateroma coronario medido por angiografía, y de accidente vascular cerebral (Lorenz y col., 2006). Por lo que una ecografía carotídea patológica predice un riesgo equivalente al del paciente con enfermedad cardiovascular previa. Es pues, la ultrasonografía en modo-B de alta resolución, un camino sencillo, seguro y reproducible, para valorar el diámetro de la luz vascular, el engrosamiento de la íntima-media de la pared vascular y la presencia y extensión de placas carotídeas (Junyent y col., 2005; Jaranta y col., 2010).

El aumento en la prevalencia en los países en vías de desarrollo apunta a que la aterotrombosis se convertirá eventualmente en una epidemia mundial (Santos y col. 2010), lo que sugiere la necesidad de nuevas herramientas que permitan la detección de la enfermedad en su estado subclínico. La utilización de las técnicas de imagen no invasoras para la detección y la cuantificación de la arteriosclerosis ha evolucionado de forma notable en la última década, demostrando muchos estudios, que la arteriosclerosis aórtica o carotídea son marcadores fidedignos de arteriosclerosis coronaria (Junyent y col., 2005); al igual que la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EGHNA) está asociada con las características del síndrome metabólico, y con un incremento del riesgo

cardiovascular con aceleración de la arteriosclerosis y de los eventos vinculados a ella, junto con aterosclerosis carotídea (Brea y Puzo, 2010); y con un incremento del engrosamiento carotídeo y una prevalencia aumentada de placas ateroscleróticas carotídeas (Targher y col., 2010). Sin embargo los primeros estudios que muestran que la EGHNA está asociada con un incremento del engrosamiento de la arteria carótida (marcador de arteriosclerosis generalizada) y con un mayor número de placas de ateroma, están exclusivamente basados en la ecografía hepática (89% de sensibilidad y 93% de especificidad) sin confirmarse por biopsia del hígado, junto con ecografía carotídea (Targher y col., 2004; Brea y col., 2005 y Volzke y col., 2005).

El grupo de Targher, en 2004, estudió un grupo de hombres jóvenes, sanos sin obesidad, objetivando el incremento del grosor íntima-media junto con la acumulación de la grasa visceral medida por TAC, con gran evidencia de publicaciones que relacionan la EGHNA con la aterosclerosis carotídea por el impacto adverso del síndrome metabólico (particularmente resistencia a la insulina, aumento de grasa visceral, posiblemente a través de múltiples factores secretados, como ácidos grasos libres, factor de necrosis tumoral-alfa y otras adipocitoquinas), más que debido a un impacto directo de la EGHNA sobre la aterosclerosis carotídea.

El grupo de Brea en 2005, estudió una muestra de personas con gran variedad de edad e índice de masa corporal, predominantemente obesos e hipertensos, con un resultado estadísticamente significativo después de ajustarlo para aquellos con síndrome metabólico definido por los criterios de ATP-III. En su estudio proporcionan evidencia mediante un análisis multivariable, de la asociación independiente de EGHNA con incremento del GIM carotídeo: GIM ajustado a edad y sexo (control sin SM < control con SM < EGHNA sin SM < EGHNA con SM) lo que sugiere que la EGHNA es aterogénica, además de su asociación con el SM y la acumulación de grasa central.

En el grupo de Volzke en 2005, la esteatosis hepática también es medida por ecografía abdominal, definida como la presencia de un modelo de hígado brillante, con contraste evidente entre el parénquima renal y hepático. El GIM se midió bilateralmente en la arteria carótida común, la bifurcación y en la arteria carótida interna y externa, con un área de engrosamiento de la capa íntima-media mayor o igual a 1.3 mm y la observación de placas, en un total de 4.222 individuos (2.070 hombres y 2.152 mujeres). La mayoría de los factores de riesgo establecidos tales como diabetes, hipertensión, obesidad y alteraciones lipídicas, fueron más prevalentes en sujetos con esteatosis hepática, en concordancia con estudios previos. Se encontró una relación entre esteatosis y placas ateroscleróticas en toda la población sin consumo de alcohol. Al final del estudio, concluyen que hay una asociación entre esteatosis hepática y aterosclerosis carotídea, lo cuál es independiente de otros factores de riesgo y predominantemente está presente en sujetos con abstinencia o consumo mínimo de alcohol (< 20 gr/día), por lo que los cambios metabólicos debidos a la EGHNA pueden contribuir a esta relación.

Posteriormente por primera vez (Targher y col., 2005), con un estudio piloto de 50 pacientes con EHGNA y un grupo control sano de 40 personas, se realiza biopsia hepática, el mejor método diagnóstico para confirmar histológicamente la EGHNA, con exclusión de factores etiológicos conocidos de enfermedad hepática crónica, como ingesta de alcohol > 20 g/día, hepatitis viral, hepatitis autoinmune y el uso de drogas hepatotóxicas. Un patólogo a ciegas clasificó las muestras de la biopsia hepática según la clasificación de Brunt y col. (1999). Así la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) fue definida como la presencia de esteatosis, inflamación lobular, balonización hepatocelular o esteatosis y algún estadio de fibrosis. Los resultados histopatológicos fueron 7 sujetos con esteatosis sólo, EHNA con fibrosis estadio 0 en 14 sujetos, EHNA/fibrosis estadio 1 en 16 sujetos, EHNA/fibrosis estadio 2 en 8 sujetos y EHNA/fibrosis estadio 3 en 5 sujetos; ninguno tenía cirrosis (fibrosis estadio 4). El GIM carotídeo fue medido ultrasonográficamente

por un único operador, a ciegas con respecto a las características de los participantes, en la pared distal de la arteria carótida común, como en otros estudios. Se observó en primer lugar, una mayor prevalencia de resistencia a la insulina y de síndrome metabólico con un incremento significativo en pacientes con EGHNA, junto con un mayor GIM carotídeo en comparación con el grupo control sano, agrupados por edad, sexo e índice de masa corporal (IMC). En segundo lugar el engrosamiento carotídeo era mayor en individuos con esteatohepatitis que en los individuos con esteatosis simple; y por último, la severidad de la EGHNA es un factor que predice de forma independiente arteriosclerosis carotídea después de ajustarlo en un amplio grupo de variables, incluyendo el síndrome metabólico fuertemente relacionado de por sí con la EGHNA. El resultado no cambió después de excluir a los pacientes diabéticos.

Estos resultados confirman y extienden las observaciones de las investigaciones anteriores, documentando que pacientes con EGHNA tienen un mayor grado de GIM carotídeo y un incremento de la prevalencia de placas carotídeas comparadas con los grupos control. Esto apoya la posibilidad de que la EGHNA es aterogénica más allá de su estrecha relación con el síndrome metabólico, posiblemente a través del incremento del estrés oxidativo, la inflamación subclínica, la lipemia post-prandial y las concentraciones de adiponectina disminuídas.

Más adelante, los mismos autores (Targher y col., 2006) ampliaron el trabajo de investigación a 85 pacientes, todos ellos con transaminasas elevadas y esteatosis hepática detectada por ecografía, a los que se les realizó biopsia hepática, con la misma clasificación histológica empleada anteriormente y se les midió el GIM carotídeo por ecografía, con placa carotídea definida como un engrosamiento focal mayor o igual a 1.2 mm a nivel de la arteria carótida común. Las conclusiones del estudio mostraban por primera vez que: 1) Los pacientes con EGHNA confirmada por biopsia tenían un incremento marcado del GIM carotídeo en comparación con la edad, el sexo y el IMC del grupo control. 2) El GIM

carotídeo es mayor en individuos con EHNA que en los individuos con esteatosis simple. 3) La severidad de la histología en la EGHNA predice independientemente el GIM carotídeo después de ajustarlo para un amplio espectro de potenciales variables confusas, incluyendo el síndrome metabólico, una alta condición aterogénica que está fuertemente relacionada con la EGHNA.

También enfatizar que el valor medio del GIM carotídeo encontrado entre el grupo control y los pacientes con EGHNA fue de 0.82 y 1.14 mm, respectivamente. Por tanto, todo ello apoya la hipótesis de que la severidad de las características histológicas en la EGHNA está fuertemente asociada con la aterosclerosis carotídea temprana, independientemente de los factores de riesgo clásicos, la resistencia a la insulina y la presencia de síndrome metabólico.

Por otro lado, Villanova y col., (2005) comparan las asociaciones encontradas entre la histología hepática y la disfunción endotelial, medida por flujo mediado por vasodilatación (FMV) en la carótida, en pacientes con EGHNA. Demuestran un descenso en el flujo vascular mediado por vasodilatación carotídea en pacientes con EGHNA demostrada por histología hepática tras biopsia, e incluso se observa que la severidad de la histología hepática está fuertemente relacionada con bajo flujo vascular, independientemente de la edad, sexo, IMC, y de la puntuación de la resistencia a la insulina. Además se estima un riesgo de evento cardiovascular a los 10 años, moderadamente más alto en los pacientes con EGHNA. Por tanto, el resultado confirma las observaciones de los estudios previos, que documentan los pacientes con EGHNA y un marcado grosor carotídeo, comparado con el grupo control.

En 2008 se ha realizado un meta-análisis, en el cuál se han evaluado siete estudios según el criterio de selección (Sookoian y Pirola, 2008) con sujetos control y pacientes con EGHNA diagnosticados al menos por ecografía abdominal o biopsia hepática y determinaciones del grosor

íntima-media carotídeo y placas carotídeas por ultrasonografía, con importantes implicaciones clínicas (Tabla 5). Se han excluido causas secundarias de esteatosis, como abuso de alcohol (> 30 gr/día en hombres y > 20 gr/día en mujeres), nutrición parenteral total, infección por virus hepatitis B y C, y el uso de drogas hepatotóxicas.

**Tabla 5.** Características de los estudios incluidos

Primer autor, año	Tamaño de la muestra (N)	Biopsia hepática (n)	Media ± SD de GIM (mm) en controles	Media ± SD de GIM (mm) en NAFLD
Aygun, 2008	80	40	0.54 ± 0.06	0.64 ± 0.10
Brea, 2005	80	-	0.54 ± 0.13	0.70 ± 0.20
Fracanzani, 2008	375	54	0.64 ± 0.14	0.89 ± 0.26
Targher, 2006	245	85	0.82 ± 0.1	1.14 ± 0.2
Targher, 2006	200	-	0.95 ± 0.11	1.24 ± 0.13
Targher, 2004	85	-	0.94 ± 0.12	1.18 ± 0.14
Volzke, 2005	2432	-	0.78 ± 0.17	0.81 ± 0.17

(Sookoian y Pirola, 2008).

Del total de 3497 individuos reclutados de los siete estudios heterogéneos, se observa en primer lugar que el GIM carotídeo está fuertemente asociado con EGHNA, mostrando un incremento del 13% del GIM en pacientes con esteatosis hepática, en comparación con individuos sin hígado graso. El análisis de meta-regresión muestra también que los análisis de función hepática se asocian de forma importante con el GIM carotídeo y con la presencia de placas carotídeas. Así pues, se demuestra que se debe sospechar arteriosclerosis carotídea cuando hay cambios en la ecografía hepática que muestren enfermedad hepática grasa, y viceversa, existiendo un aumento de la probabilidad de enfermedad cardiovascular en un futuro.

En segundo lugar se apoya la asociación entre enzimas hepáticas y arteriosclerosis carotídea, sobre todo una fuerte relación entre GPT y GGT, con engrosamiento carotídeo. La principal hipótesis para explicar estos resultados es la observación de que en el grupo con EGHNA se incluyó pacientes con distintos estadios de severidad de la enfermedad, y consecuentemente los pacientes con más enfermedad hepática grasa eran aquellos quiénes mostraban resultados en la función hepática elevados.

Así, por último, éste es el primer estudio cuyos datos están basados en la evidencia, que puede resultar en la formulación de guías para el manejo de pacientes con EGHNA, en relación con la prevención de eventos cardiovasculares en individuos que hasta el momento no tienen factores de riesgo potenciales para aterosclerosis carotídea. Por tanto, como se ha expuesto previamente, la detección rutinaria de GIM carotídea por ultrasonografía en modo-B está fuertemente recomendada en pacientes con enfermedad hepática grasa y viceversa. Esto proporcionaría beneficios en la prevención primaria y en la decisión de tratar la existencia de enfermedad cardiovascular, pero no diagnosticada, en pacientes con enfermedad hepática grasa.

Dando un paso más adelante en la medicina basada en la evidencia, en los humanos está claro que no se puede realizar una correlación cronológica a la vez entre la histología a nivel vascular y hepática, necesita de medios no invasivos. En animales, existen estudios de progresión y regresión de arteriosclerosis y EHGNA de forma individualizada, siendo pocos los trabajos en los que se combinan ambos aspectos de forma conjunta.

Incluso la mayoría de los modelos animales tienen en común que desarrollan esteatosis espontánea fácilmente, pero la progresión a esteatohepatitis es más difícil (Tous y col., 2005). En ratones manipulados genéticamente Apo E<sup>-/-</sup>, consiguen valorar cronológicamente y

cuantitativamente la asociación entre daño hepático histológico (esteatosis, inflamación y macrófagos) con el tamaño de las lesiones ateromatosas, teñidas con Sudán rojo y con hematoxilina-eosina, cuantificando el área de la lesión en la región proximal de la aorta, observando que efectivamente hay una correlación cronológica entre la severidad de las lesiones hepáticas y las lesiones ateromatosas con ratones alimentados con colesterol y aceite de palma, lo que sugiere la existencia de factores circulantes comunes que inducen reacciones inflamatorias en tejidos distantes.

Teniendo en cuenta que la arteriosclerosis es una enfermedad crónica inflamatoria, y similarmente a la obesidad y la DM tipo 2 donde hay una acumulación de macrófagos en el tejido adiposo visceral e islotes pancreáticos, ya que el tejido adiposo blanco es un órgano endocrino activo que juega una gran función en el síndrome metabólico; se ha llevado a cabo otro estudio de la inflamación sistémica en arteriosclerosis con hipercolesterolemia, en ratones Apo E<sup>-/-</sup> sin obesidad (Lohmann y col., 2009). Realizando un examen histológico de la raíz de la aorta, se ha medido la grasa con tinción de aceite rojo, y por inmunohistoquímica la cuantificación de células T y macrófagos, mostrando que el grado de aterosclerosis se asocia con macrófagos y células T dentro de las placas de ateroma y en el tejido adiposo periadventicial y mesentérico, hepático y en los islotes pancreáticos. Estos hallazgos evidencian unos efectos inflamatorios tanto locales como sistémicos, en la aterosclerosis.

Por tanto, estos experimentos realizados en estudios de progresión con dieta hiperlipémica, han podido demostrar una correlación cronológica e inflamatoria en las lesiones arteriosclerosas y EGHNA. Para finalizar, Bieghs y col. (2012) resumen los conocimientos actuales sobre la similitud en epidemiología, patofisiología, diagnóstico y tratamiento de la arteriosclerosis y esteatohepatitis no alcohólica, proponiendo la hipótesis de que actualmente son dos aspectos de una misma enfermedad.

## **Capítulo 4**

# **TERAPIA CON ESTATINAS: ATORVASTATINA**



La aparición de las estatinas a finales de los años ochenta y su aplicación clínica ha sido uno de los avances más importantes de la historia de la medicina del siglo XX. Las estatinas han disminuido la mortalidad y la morbilidad por enfermedades cardiovasculares alrededor de un 25%. Si tenemos en cuenta que en los países desarrollados la patología cardiovascular tiene un carácter epidémico, este porcentaje ha supuesto que millones de personas se hayan beneficiado de su utilización. Por ello, el empleo de estatinas se ha convertido en la piedra angular para la prevención primaria y secundaria de eventos cardiovasculares (Badimon y Vilahur, 2011).

Estos compuestos inhiben competitivamente la hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima clave en la síntesis endógena de colesterol. La inhibición de esta enzima, fundamentalmente a nivel hepático, estimula la expresión de los receptores de las LDL, lo que favorece la captación del colesterol plasmático transportado por estas lipoproteínas y sus precursores. Así la cantidad intracelular de colesterol guarda una relación inversa con la velocidad de síntesis de receptores celulares para las LDL, cuando se reduce la concentración intracelular de colesterol, provoca la estimulación de la síntesis de receptores de LDL y su expresión en la superficie de los hepatocitos (Goldstein y Brown, 1990). Las estatinas inhiben también la vía del mevalonato en una de sus primeras reacciones, por lo que afecta no sólo a la biosíntesis de colesterol, sino a la de otros muchos compuestos funcionalmente importantes para las células, en particular reducen la disponibilidad celular de compuestos isoprenoides de 15 y 20 átomos de carbono. La incorporación postraduccional de estos grupos en ciertas proteínas es imprescindible para que éstas se localicen en la membrana plasmática y participen en la transducción de señales y en la organización del citoesqueleto celular, mecanismos ambos decisivos en la regulación de múltiples procesos vitales para la célula, como el tráfico de macromoléculas a través de la membrana y transporte intracelular, la migración y proliferación celular y la regulación tanto de la expresión de

genes como de la estabilidad de sus ácidos ribonucleicos mensajeros (RNAm), (Alvárez De Sotomayor y col., 1999).

La acción favorable de los inhibidores de la HMG-CoA o estatinas no sólo se debe a su potente efecto reductor de la concentración de colesterol y del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), concepto claramente establecido, sino que en los últimos años se ha demostrado, en diferentes estudios clínicos, que el tratamiento con estatinas es beneficioso incluso en pacientes con valores de colesterol bajos. Así por ejemplo, en el estudio MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering), Schwart y col. (2001), demuestran que los pacientes tratados con atorvastatina con concentraciones de c-LDL  $\leq$  121 mg/dl tienen una reducción en episodios isquémicos comparable a la de los pacientes con concentraciones superiores a 121 mg/dl. En el estudio HPS (Heart Protection Study) 2002, el tratamiento con simvastatina provocó una disminución de episodios vasculares mayor en pacientes con valores basales de c-LDL  $<$  116 mg/dl. La explicación de los resultados no sólo se atribuye a su acción directa sobre la inhibición de la biosíntesis de colesterol hepático, sino también a sus efectos directos sobre mecanismos implicados en la formación de las lesiones ateroscleróticas, los cuáles se conocen con el nombre de “efectos pleiotrópicos” (Blanco-Colio y col., 2004). Entre dichos efectos pleiotrópicos se incluyen los que ejercen sobre la función endotelial, la respuesta inflamatoria, la formación de células espumosas, la activación de las células musculares lisas, la apoptosis celular, la estabilidad de la placa y la modificación oxidativa de las lipoproteínas principalmente de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), provocando una disminución de la síntesis de metabolitos intermediarios, disminuyen la expresión de moléculas quimiotácticas, y como consecuencia se observa una disminución en el infiltrado de células inflamatorias (monocitos/macrófagos y linfocitos T).

Recientemente se ha publicado un estudio basado en los ensayos clínicos previos, en el cuál se revisan en profundidad las propiedades protectoras

de las estatinas, dependiente e independiente de la reducción del colesterol, y se analiza su utilidad en las distintas situaciones clínicas de enfermedad arterial (Badimon y Vilahur, 2011), cuya reducción en la síntesis de importantes isoprenoides intermediarios, avalan su acción en ciertas proteínas de las células endoteliales, consiguiendo así una serie de propiedades antiateroscleróticas y antitrombóticas a través de estos efectos en las proteínas de membrana celular. La tabla 6 resume los ensayos clínicos que han corroborado la capacidad de las estatinas de ejercer efectos cardioprotectores y vasculoprotectores más allá de la reducción del colesterol.

**Tabla 6.** Estudios clínicos derivados del tratamiento con estatinas

Estudio clínico	Estatinas	Población
POSCH	Operación bypass de ileon	Pacientes que han sufrido infarto agudo de miocardio
WOSCOPS, CARE	Pravastatina	Enfermedad coronaria estable
PROVE IT	Atorvastatina 80 frente a pravastatina 40	Síndrome coronario agudo
REVERSAL	Atorvastatina frente a pravastatina	Enfermedad coronaria estable
JUPITER	Rosuvastatina	Prevención primaria
Landmesser y colaboradores	Simvastatina	Insuficiencia cardíaca
Fichtlscherer y colaboradores	Atorvastatina	Enfermedad coronaria estable
ENHANCE	Simvastatina	Hipercolesterolemia familiar
IMPROVE-IT	Simvastatina	Síndrome coronario agudo
CORONA	Rosuvastatina	Insuficiencia cardíaca
GISSI-HF	Rosuvastatina	Insuficiencia cardíaca
Fauchier y col	Estatina no determinada	Ritmo sinusal
ASCOT-LLA	Atorvastatina	Hipertensión y tres o más factores de riesgo

(Badimon y Vilahur, 2011).

En la actualidad existen también, diferentes marcadores séricos relacionados con el proceso inflamatorio que ocurre durante el desarrollo y formación de la placa de ateroma. Así, el incremento de las concentraciones plasmáticas de proteínas de fase aguda, entre ellas la PCR y su relación con la enfermedad coronaria, ha sido uno de los hallazgos más significativos en los últimos años (Lahoz y Mostaza, 2007). Aunque diversos estudios en muestras pequeñas habían demostrado que los inhibidores de la HMG-CoA disminuían la PCR en sangre, en el estudio CARE (Ridker y col., 1998), se observó por primera vez que, tras cinco años de seguimiento, la pravastatina disminuía de forma significativa los valores de PCR, en gran medida de manera independiente del c-LDL. En estudios posteriores se ha demostrado con otras estatinas, como la atorvastatina, la simvastatina, la rosuvastatina, la fluvastatina y la lovastatina (Ridker 2003; Ridker y col., 2005; Ridker y col., 2009).

Todo esto refuerza la idea del efecto antiinflamatorio de las estatinas, contribuyendo por medio de diferentes acciones, a la estabilización de la placa de ateroma y, por tanto, a reducir el número de eventos cardiovasculares.

#### **4.1. EMPLEO DE ESTATINAS EN LA ENFERMEDAD GRASA HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA (EGHNA)**

Todas las estatinas tienen el mismo mecanismo de acción, el cuál lo ejercen principalmente en el hígado, órgano en el que alcanzan sus mayores concentraciones tisulares.

En los últimos años existe un enorme interés en compuestos que modifican la actividad de receptores nucleares implicados en la transcripción de genes diana en el metabolismo lipoproteico y la arteriosclerosis, como los receptores activados por proliferadores

peroxisómicos (PPAR) y los receptores hepáticos X (LXR), (Mostaza, 2004).

Los PPAR son miembros de la familia de receptores nucleares de hormonas esteroides y existen tres tipos:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$ . Los receptores PPAR $\alpha$  se localizan fundamentalmente en el hígado y, en menor cuantía, en células musculares y en adipocitos. Su activación regula principalmente genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos. Los fibratos son activadores exógenos de este sistema. Los PPAR $\gamma$  se localizan predominantemente en adipocitos y en macrófagos. Su activación se relaciona con genes implicados en la adipogénesis, modificando también genes del metabolismo de ácidos grasos. Las glitazonas son activadores exógenos que incrementan la sensibilidad a la insulina. Los PPAR $\beta/\delta$  son ubicuos y su acción no está establecida. La activación de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ , además de las acciones sobre el metabolismo lipídico e hidrocarbonado, incrementan la transcripción de genes relacionados con otros aspectos del proceso aterogénico (Tabla 7).

**Tabla 7.** Localización y acciones de los receptores PPAR $\alpha$  y  $\gamma$

Receptor	Localización	Acción	Efecto
PPAR $\alpha$	Hígado, corazón, músculo, riñón, adipocito	↓ Síntesis hepática de triglicéridos	↓ Triglicéridos
		↑ Oxidación de ácidos grasos	↑ cHDL
		↑ Apo A-1	↓ PAI-1
		↑ Actividad LPL	
PPAR $\gamma$	Adipocito, músculo, corazón, macrófagos	↑ Sensibilidad a la insulina	Mejora sensibilidad a la insulina
		↑ Adipogénesis	↓ Glucemia
		↑ Almacenamiento lipídico	↑ Peso corporal

(Mostaza, 2004).

La pitavastatina, es un nuevo y potente inhibidor sintético de la HMG-CoA reductasa, con un efecto intrínseco agonista sobre los PPAR $\alpha$  (Martín y col., 2001). Estos estudios en cultivo celular indican que las estatinas pueden reducir el estado de fosforilación de PPAR $\alpha$  y, de esta forma incrementar su activación transcripcional. Esta disminución de la actividad de fosforilación de PPAR $\alpha$  se debe a la inactivación de proteínas Rho (proteínas isopreniladas), que reducen la expresión de moléculas de adhesión, por las estatinas. Estos mismos autores demuestran que las estatinas pueden inducir la expresión de apolipoproteína (apo) A-1 mediante la activación de PPAR $\alpha$ , lo que podría explicar el incremento de los valores de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) observado tras el tratamiento con estatinas. También observan una inhibición del ensamblaje y secreción de las VLDL, un mecanismo común observado en las estatinas, junto con un aumento del reciclaje de los receptores hepáticos de los LDL. Esta vía contribuye a la eliminación en plasma de los triglicéridos, pero da lugar a una acumulación hepática de triglicéridos a menos que sean oxidados eficientemente.

La primera evidencia in vivo de que la pitavastatina activa la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal, ha sido estudiada por Egawa y col., 2003. Investigan el efecto hipolipemiante de la pitavastatina y su capacidad de eliminar grasa en el hígado graso espontáneamente desarrollado en ratones con déficit de aromatasa (Ar $^{-/-}$ ). Estos ratones tienen reducida la expresión de los genes de las enzimas del metabolismo de ácidos grasos en los hepatocitos y espontáneamente desarrollan esteatosis hepática masiva, observando un restablecimiento significativo en la expresión de RNAm de los enzimas esenciales implicados en la  $\beta$ -oxidación regresando sustancialmente la esteatosis hepática severa observada en los ratones Ar $^{-/-}$ .

En los últimos años se han publicado estudios con diversos modelos experimentales de síndrome metabólico en la rata (Sanguino y col., 2005), donde se ha visto que las ratas presentan un perfil del fenotipo del metabolismo lipídico relacionado con el sexo y vinculado a la edad. Las

ratas Sprague-Dawley son hipercolesterolémicas e hipertrigliceridémicas presentando altas concentraciones en plasma de ácidos grasos monoesterificados, insulina y leptina y acumulan más ésteres de colesterol y triglicéridos en el tejido hepático. Estos cambios están parcialmente vinculados a una marcada disminución en la expresión hepática de PPAR $\alpha$  y su actividad, causada por el envejecimiento y ello justifica la reducción en la expresión de los genes diana del PPAR $\alpha$  que codifican las proteínas implicadas en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. La administración de atorvastatina desde el día 21 hasta los 18 meses de edad en ratas macho previno parcialmente la disminución hepática de PPAR $\alpha$  relacionada con la edad, e incrementó significativamente (21%) la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en la muestra hepática de las ratas macho tratadas, junto con una reducción de la concentración hepática de ésteres de colesterol (-48%) y triglicéridos (-41%). Además mostraban una disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de glucosa, ácidos grasos no esterificados y triglicéridos, comparados con el control. En las hembras tratadas se incrementó la cantidad de proteínas PPAR $\alpha$  en un 42% comparada con el control pero no se modificó el PPAR $\alpha$ -RNAm ni su actividad vinculada, siendo la atorvastatina incapaz de reducir la hipertrigliceridemia asociada al envejecimiento, mientras que mostraba una capacidad similar de interactuar con la enzima HMG-CoA reductasa en ambos sexos. Aún queda por determinar si el déficit hepático de PPAR $\alpha$  relacionado con la edad es parcialmente responsable de esta condición en humanos, pero estos resultados sugieren que la atorvastatina puede prevenir el déficit PPAR $\alpha$  relacionado con la edad y evitar algunos de los desórdenes asociados al síndrome metabólico como el hígado graso.

En otro modelo experimental (Miana y col., 2007) en conejos hipercolesterolémicos tratados con atorvastatina, se incrementa la expresión de PPAR $\gamma$ , y sugiere que la interrelación entre las estatinas y PPAR $\alpha$  también puede estar implicada en la manifestación del propio efecto hipolipemiante de las estatinas. La atorvastatina también puede incrementar la expresión de PPAR $\alpha$ , por lo que la normalización de los

triglicéridos y la reducción del colesterol plasmático observada podrían estar relacionadas con un incremento de actividad de PPAR $\alpha$ , no ya en la pared arterial, sino en el hígado.

Por último, nuestro grupo de investigación (Martín Castillo y col., 2005), en su modelo experimental en pollos de la raza White-Leghorn, clasificados en cinco grupos experimentales con diferentes dietas y tratamiento con atorvastatina, los hígados se valoraron y clasificaron macroscópica y microscópicamente en cuatro grados de lesión. La valoración macroscópica sirvió para una discriminación rápida del efecto de la dieta, observándose una tendencia al efecto beneficioso de la atorvastatina. Por otro lado, la evaluación microscópica, basada en los depósitos lipídicos, demostró una reducción estadísticamente significativa de la lesión de esteatosis hepática en los grupos tratados con atorvastatina.

En estudios llevados a cabo con pacientes (Horlander y col., 2001) tratan a siete pacientes con hiperlipemia y EHNA diagnosticada por biopsia, con atorvastatina durante un año, realizando una segunda biopsia hepática al final del tratamiento. Objetivaron una mejoría importante de la inflamación, balonización e hialina de Mallory. La fibrosis y la esteatosis mejoró sin una significación estadística.

En 2003, Kiyici y col. realizaron un estudio prospectivo de 44 pacientes con EHNA confirmada con biopsia hepática. A 17 pacientes normolipémicos se administró ácido ursodesoxicólico 13-15 mg/Kg/día y a 27 pacientes hiperlipémicos se trató con atorvastatina 10 mg/día durante seis meses. La normalización de las aminotransferasas fue más llamativo en el grupo tratado con atorvastatina, con disminución del contenido graso hepático por tomografía.

En el año 2004, Hatzitolios y col. evaluaron la terapia con tres fármacos (ácidos grasos omega-3, atorvastatina y orlistat, según predominase la hipertrigliceridemia, la hipercolesterolemia o la obesidad) en 72 pacientes

con dislipemia mixta, asintomáticos y con aumento persistente de aminotransferasas en las 24 semanas previas al inicio del estudio. Al final del estudio los niveles de transaminasas disminuyeron en todos los grupos, y la ecografía hepática evidenció mejoría. Sólo se realizó biopsia hepática a 8 pacientes, con mejoría en 6 de ellos, sin variar el grado de fibrosis.

Más tarde se realizó un estudio prospectivo durante un año, a 22 pacientes con EHNA, hipertransaminasemia, hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia, y ecografía compatible con esteatosis (Gómez y col., 2006). A pesar de no existir cambios en el hábito de vida ni en el IMC, se normalizó o mejoró el colesterol y las enzimas hepáticas de manera estadísticamente significativa.

En un estudio de 68 pacientes diagnosticados de EGHNA, 15 de ellos se trataron con estatinas, realizando un seguimiento durante un periodo de 6 años, con biopsia hepática al inicio y final del estudio (Ekstedt y col., 2007). Se objetivó en los pacientes tratados con estatinas menor progresión a fibrosis y una reducción significativa de la esteatosis, constatándose así un efecto positivo en la histología hepática en pacientes con EGHNA. Para finalizar, en otro estudio con seguimiento durante 4 años (Georgescu y Georgescu, 2007) encontraron también una disminución de las aminotransferasas y de la esteatosis hepática, sin encontrar cambios respecto a la fibrosis y a la inflamación en 10 pacientes tratados con atorvastatina.

#### **4.2. EMPLEO DE ESTATINAS EN LA ARTERIOSCLEROSIS CAROTÍDEA**

En varios estudios se ha demostrado que las estatinas pueden reducir la progresión de las lesiones y en algunos casos revertirlas, aunque los cambios en el tamaño de la lesión son mínimos. El cambio más importante radica en su composición, reduciéndose sobre todo su contenido lipídico. Sin embargo, los cambios anatómicos producidos por

las estatinas son mínimos y se producen demasiado lentamente como para ser los causantes del beneficio clínico que se observa de forma mucho más temprana. Así pues, actualmente se considera más relevante la estabilización de la placa derivada de los diferentes efectos que estos fármacos producen sobre el conjunto de los componentes de las lesiones.

#### **4.2.1. Función endotelial**

La función endotelial, capacidad de respuesta a agentes vasodilatadores dependientes de la liberación de óxido nítrico (NO) por el endotelio, se ve afectada por la hiperlipidemia; al disminuir ésta, la función endotelial mejora. Sin embargo, diversos estudios (Badimon, 2004) atribuyen la mejora de la función endotelial producida por las estatinas no sólo a su acción hipolipemiente, sino a un incremento de los niveles de la enzima NO sintasa endotelial (eNOS), enzima que regula la producción de NO a nivel del endotelio, por medio de la regulación de funciones del citoesqueleto celular dependientes de proteínas isopreniladas (Rho), con acción vascular directa, afectando a procesos como la contractibilidad. Por otro lado, el NO además de ser un potente vasodilatador y antiagregante plaquetario, inhibe la proliferación de las CML, inhibe la adhesión de células inflamatorias y modula el estrés oxidativo (Badimon y Vilahur, 2011).

Otro mecanismo por el cuál las estatinas pueden mejorar la función endotelial es disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales hidróxilo, lo que produce una disminución del estrés oxidativo en la pared vascular. Aunque la normalización de los niveles de lípidos por sí mismo puede reducir el estrés oxidativo, se ha observado que las estatinas reducen los niveles de expresión de ciertas subunidades de la enzima nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) oxidasa en el endotelio arterial, que es la principal fuente de aniones superóxido en la pared vascular. E incluso se ha visto que las estatinas estimulan la angiogénesis al aumentar la proliferación, la migración y la supervivencia de células endoteliales progenitoras (CEP)

circulantes (Badimon y Vilahur, 2011). Las CEP son capaces de aumentar la neovascularización inducida por la isquemia, acelerar el proceso de reendotelización tras la lesión por balón y mejorar la función cardíaca tras daño isquémico. Un estudio en pacientes con enfermedad coronaria estable demostró que la administración de estatinas durante cuatro semanas aumentaba el número de CEP circulantes y mejoraba la función cardíaca (Vasa y col., 2001), cuyo efecto angiogénico se observó en situaciones de concentraciones bajas de estatinas tras un mínimo de 4 semanas de tratamiento y de manera independiente de las cifras de colesterol.

#### **4.2.2. Inflamación**

El efecto antiinflamatorio de las estatinas es apoyado por múltiples estudios en los que se analiza la presencia de células inflamatorias y marcadores de inflamación en las lesiones de animales de experimentación. En estudios de conejos sometidos a dieta aterogénica (Fukumoto y col., 2001; Hernández-Presa y col., 2002), las estatinas reducen la infiltración de monocitos/macrófagos con la consiguiente y lógica reducción de los niveles de todas aquellas proteínas cuya presencia en las lesiones se asocia mayoritariamente con estas células. Así se ha observado disminución de la expresión de metaloproteasas, factor tisular y ciclooxigenasa-2 (Cox-2). La reducción de células inflamatorias en la pared producida por las estatinas puede ser el resultado de la reducción del proceso lesivo inicial que es la hipercolesterolemia como inductor de la infiltración de lípidos en la pared y de varios efectos adicionales descritos a nivel experimental: a) la reducción de la adhesión de las células mononucleares al endotelio vascular debido a la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión endoteliales y de los receptores monocíticos que se unen a dichas moléculas; b) a la reducción de la producción de moléculas quimiotácticas para los monocitos por parte de las células vasculares y de los monocitos infiltrados en las lesiones, y c) a la reducción de la proliferación de los monocitos/macrófagos. La resultante de estas acciones es que disminuye

la actividad inflamatoria en las lesiones, lo que redundaría en un enriquecimiento en colágeno que contribuye a la estabilización de las placas.

Cuando se sustituye la dieta aterogénica de los animales por una baja en colesterol se consigue que las lesiones remitan, se reduce la presencia de macrófagos y los niveles de muchas de las proteínas mencionadas disminuyen. Sin embargo, como en el caso de la función endotelial, las estatinas podrían ejercer efectos vasculares directos. Así, en ausencia de efectos significativos sobre los niveles de LDL se ha observado reducción de la acumulación de macrófagos y expresión de factor tisular en lesiones carotídeas de conejos hipercolesterolémicos. También se ha constatado que dos estatinas pueden reducir la expresión de moléculas quimiotácticas para los monocitos en lesiones tempranas de cerdos hipercolesterolémicos (Martínez-González y col., 2001) de forma similar, aunque sólo una de ellas reduzca significativamente los niveles de lípidos; por otra parte, algunos de estos efectos se producen de forma muy temprana sin que los niveles de lípidos se vean afectados, como la reducción de la adhesión de leucocitos y la expresión de P-selectina en la microvasculatura observada tan sólo horas después de la administración de los fármacos.

Por otro lado, las estatinas inhiben la deposición de plaquetas sobre la pared vascular lesionada, como se ha observado *ex vivo* en sistemas dinámicos de perfusión en cámara tanto en seres humanos (Rauch y col., 2000) como en animales de experimentación (Alfón y col., 1999). Esta reducción de la reactividad plaquetaria podría estar relacionada con la reducción de la producción de Tromboxano  $A_2$  ( $TxA_2$ ) y la modificación del contenido de colesterol de las membranas plaquetarias. Las estatinas también inhiben la expresión de factor tisular en los macrófagos presentes en las lesiones, por lo que reducen su potencial trombogénico.

Al interferir la isoprenilación de proteínas de las familias Rho, como se ha expuesto previamente, las estatinas interrumpen las vías de transducción

de señales, a través de las cuáles diferentes factores de crecimiento inducen la expresión de protooncogenes y promueven la proliferación de las CML vasculares (Badimon y Vilahur, 2011). El bloqueo de estas vías puede conducir no sólo a la inhibición de la proliferación, sino que, dependiendo de factores como las condiciones de cultivo o la concentración de fármaco utilizada, pueden producir la muerte de las células por apoptosis. Sin embargo, in vivo no se ha observado incremento del índice de apoptosis, ni de CML ni de macrófagos en lesiones de conejos hipercolesterolémicos (Badimon, 2004). Aunque en modelos de arteriosclerosis acelerada inducida con balón se ha demostrado actividad antiproliferativa e inhibición de la reestenosis, estos resultados no se han reproducido en seres humanos. La actividad antiproliferativa se ha observado a concentraciones elevadas, difícilmente alcanzables con las dosis utilizadas como hipolipemiantes. De hecho, las estatinas no han demostrado reducir la tasa de reestenosis a los 6 meses de intervención de revascularización. No obstante, el estudio LIPS, diseñado para investigar si la reducción del colesterol con fluvastatina, iniciada de inmediato a la intervención de revascularización coronaria (con/sin stent), prolongaría supervivencia respecto a placebo, demostró que el tratamiento con estatina (40 mg dos veces/día) reduce significativamente el riesgo de episodios cardíacos mayores. Los efectos beneficiosos se obtuvieron independientemente de los niveles basales de lípidos en plasma (Serruys y col., 2002).



## **Capítulo 5**

### **OBJETIVOS**



Los objetivos principales de este estudio experimental son los siguientes:

1. Reproducir las lesiones arterioscleróticas humanas en un modelo animal sencillo y fácil de reproducir, a través de una dieta hiperlipémica.
2. Valorar el efecto de la dieta y el tratamiento con atorvastatina sobre el perfil lipídico de los distintos grupos de experimentación.
3. Realizar un estudio histológico de las lesiones arterioscleróticas de los troncos supra-aórticos según el grado de afectación, por medio de un estudio de intervención con progresión y regresión espontánea e inducida con atorvastatina.
4. Comparar de forma paralela, los resultados histológicos obtenidos en el estudio de la arteriosclerosis en los troncos supra-aórticos con la afectación hepática en la enfermedad grasa del hígado no alcohólico (EGHNA).

Con el fin de llevar cabo los objetivos previamente descritos, nuestro grupo de investigación ha seleccionado cinco grupos experimentales con pollos de la raza White-Leghorn:

- Grupo A: Control con dieta normal.
- Grupo B: Dieta hiperlipémica.
- Grupo C: Regresión espontánea.
- Grupo D: Regresión espontánea y farmacológica.
- Grupo E: Progresión farmacológica.

Y para demostrar dichos objetivos planteamos lo siguiente:

1. Valoración bioquímica del plasma, realizando un perfil lipídico en los distintos grupos de experimentación (colesterol, triglicéridos, HDL, LDL) y análisis del marcador inflamatorio PCR.
2. Descripción histológica de los distintos grados de lesión de cada grupo experimental de muestras teñidas con hematoxilina-eosina y van Gieson, según el grado de afectación de la capa íntima, la capa media, la celularidad observada, las fibras musculares lisas y la placa de ateroma.
3. Clasificación histológica de los grados de lesión de arteriosclerosis, imitando en lo posible los estadios de la clasificación de Stary, según la American Heart Association.
4. Estudio comparativo de los siguientes parámetros morfométricos, en los diferentes grupos experimentales:
  - a. Grosor de la capa media.
  - b. Grosor de la capa íntima.
  - c. Grosor de la placa de ateroma.
  - d. Valoración de la neoíntima por medio de técnicas inmunocitoquímicas para  $\alpha$ -actina, empleando anticuerpos contra esta proteína como marcador de células musculares lisas. Valoramos el grosor de la  $\alpha$ -actina subendotelial, la densidad de volumen de  $\alpha$ -actina y por último, la densidad integrada de  $\alpha$ -actina (dichos parámetros se describen extensamente en material y métodos).
  - e. Grosor de la pared.
  - f. Grado de oclusión del vaso.
  - g. Relación pared/luz.

5. Obtención de un nuevo índice denominado “coeficiente aterogénico” (CA) para describir de forma precisa los grados de lesión, mediante un sistema de asignación de puntos.
6. Por último, correlación entre las lesiones arteriosclerosas y las hepáticas en los mismos grupos experimentales. Para ello nos hemos basado en estudios previos de nuestro grupo de investigación en la afectación hepática. Se compara el coeficiente aterogénico y el índice de actividad histológica de la enfermedad hepática.



## **Capítulo 6**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 6.1. Animales y dietas

Se emplearon 100 pollos de la raza White-Leghorn, de tres semanas de edad, vacunados previamente a los 7 días de bronquitis, y a los 14 días de Gumboro y peste; y alimentados durante esas tres primeras semanas de vida con una dieta estándar de crecimiento y engorde. Se han mantenido aislados en salas de las dependencias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia, con temperatura y humedad controlada (aproximadamente 23° C y 60% respectivamente). Tanto las jaulas de los animales como los procedimientos de sacrificio, se han desarrollado cumpliendo la legislación vigente en materia de protección animal y con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

La alimentación administrada fue la siguiente:

a) Dieta normal para engorde-puesta: Cereales (maíz y cebada), harina de soja, fosfato bicálcico, complemento vitamínico-mineral (4 Kg/Tm de pienso para progenitores Broilers, cuya composición por Kg es: Vitamina A, 3000000 UI; D3, 750000 UI; E, 12500 mg; B1, 1 gr; B2, 3´75 gr; B12, 12´5 mgr; B6, 1´25 gr; Acido pantoténico, 5 gr; Acido nicotínico, 12´5 gr; Biotina, 75 mgr; K3, 1´5 gr; Acido fólico, 750 mgr; Manganeso, 30 gr; Zinc, 27´50 gr; Hierro, 12´50 gr; Cobre 3´75 gr; Yodo, 750 mgr; Selenio, 75 mg; Cobalto, 150 mgr; Molibdeno, 250 mg; Excipiente c.s.p., 1000 gr).

b) Dieta hipercolesterolemizante: Dieta aterogénica con un 2% de colessterina pura y aceite de palma líquido (20%) añadido al pienso normal, administrada ad libitum.

c) Medicación: Atorvastatina 3 mg/kg/día, diluida en polietilenglicol (1- 2 ml). Se diluía en 1 cc hasta la cuarta semana de experimentación y posteriormente en 2 cc debido a la mayor cantidad de fármaco necesario. Se administraba una vez al día por la mañana, por vía oral, con una jeringa, abriendo directamente el pico a cada pollo y vertiendo todo el

contenido en su interior para asegurar la toma completa del fármaco. Los animales eran pesados semanalmente y tras calcular el peso medio de cada grupo, se preparaba la disolución de atorvastatina adecuada hasta la siguiente pesada. Se empleó como placebo 2 ml de polietilenglicol en los grupos a los que no se administraba el fármaco.

## 6.2. Fases del estudio

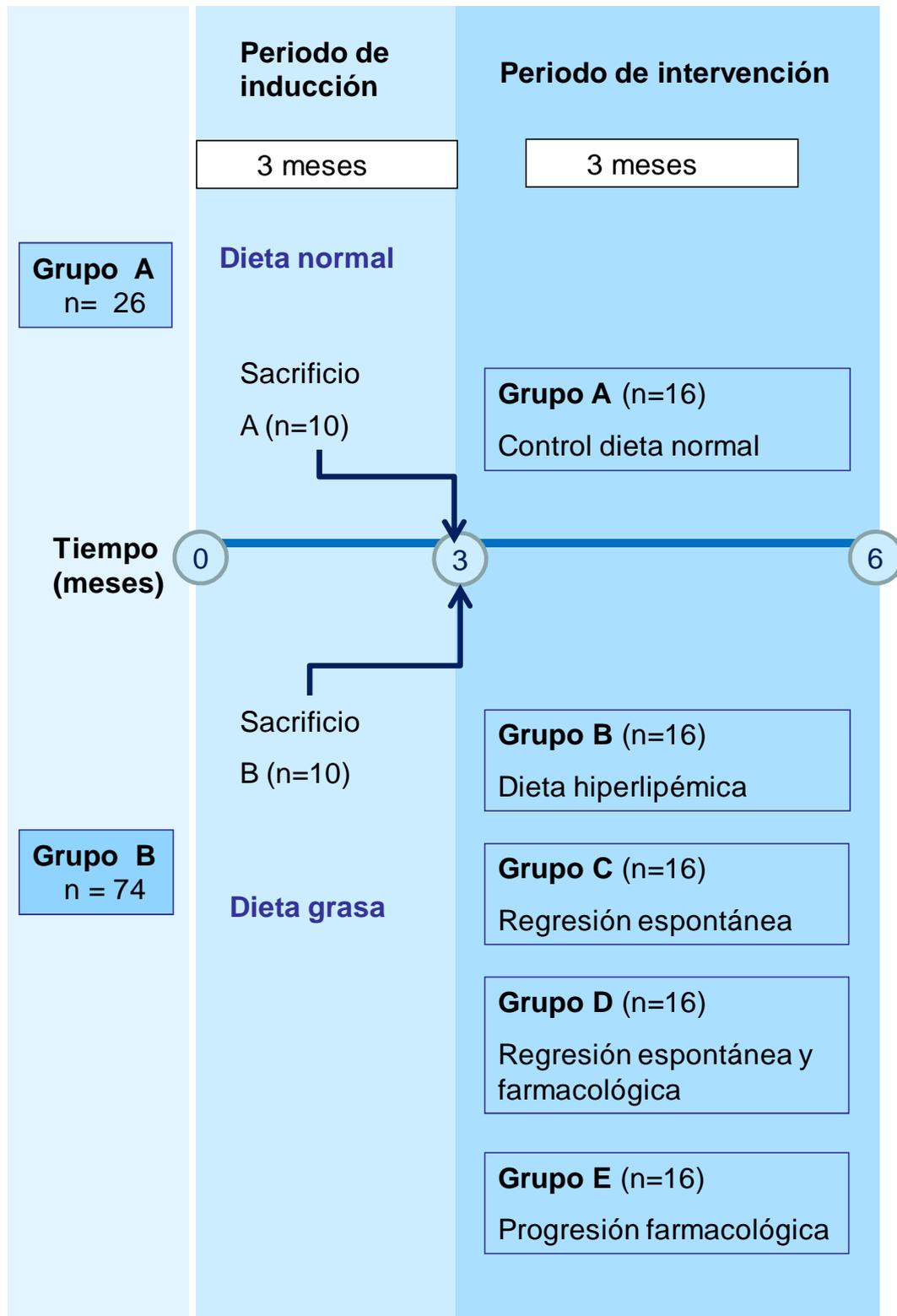
El estudio de experimentación se dividió en dos fases, una primera fase de inducción de tres meses de duración con un grupo control sano (n=26) y el resto de los animales con dieta aterogénica (n=74), y una segunda fase de intervención donde se mantuvo al grupo control y al resto de los animales se les divide en distintos grupos (Fig.5).

- Fase de inducción (3 meses de duración): se les ha suministrado una dieta aterogénica a todos los animales, excepto al grupo control normal (A) al que se le ha suministrado sólo el pienso normal. A la finalización de estos tres meses, se sacrificaron 10 animales del grupo A y otros 10 animales del grupo B, para controlar el efecto aterogénico.

- Fase de intervención (3 meses de duración): se establecieron los siguientes grupos experimentales de forma arbitraria, marcados con una anilla de distinto color en las patas, según el grupo, para los estudios de progresión y regresión:

- **A:** Grupo control con dieta normal durante toda la fase de intervención (n=16).
- **B:** Grupo con dieta hiperlipémica (n=16).
- **C:** Grupo de regresión espontánea, con suspensión de la dieta hiperlipémica pasando a una dieta normal (n=16).
- **D:** Grupo de regresión espontánea y farmacológica (dieta normal y administración de atorvastatina) (n=16).
- **E:** Grupo de progresión farmacológica, (dieta hiperlipémica y atorvastatina) (n=16).

Fig. 5. Fases del estudio experimental



### **6.3. Obtención de muestras**

Tras finalizar el estudio, a los seis meses, se mantenía a los animales en ayuno durante 12 horas, se les pesaba y se extraía 5 ml de sangre de la vena axilar (Fig. 6), dadas las características de esta vena, al ser subcutánea y observable por transparencia a través de la piel, con fácil acceso durante el proceso de inmovilización del animal (Nickel y col., 1997). Tras la extracción de la sangre, se centrifugaba a 3.000 revoluciones por minuto, durante 20 minutos, con lo que se obtenía el plasma para las determinaciones analíticas necesarias.

El sacrificio se realizaba incruentamente mediante la administración intraperitoneal de 150 a 200 mgr de pentobarbital sódico, para conseguir una rápida anestesia e iniciar la disección del animal, mediante una incisión longitudinal desde el cuello a la cloaca, con apertura del peritoneo y esternón, realizando una punción cardíaca previa a la parada cardiorrespiratoria para obtención de una segunda muestra de sangre si con la extracción periférica no se había extraído suficiente cantidad.

Se seccionaba la tráquea para producir la parada cardiorrespiratoria y el esófago, los troncos supra-aórticos y se comenzaba a liberar el árbol vascular en bloque hasta las arterias ilíacas, de todas las vísceras, y de su adherencia a la columna dorsal y lumbar, respetando en todo momento la integridad de la aorta descendente. Una vez diseccionado, se realizaba una incisión sagital del ventrículo izquierdo, y una incisión longitudinal de todo el árbol arterial. Las aortas de los animales de cada grupo eran extendidas y fijadas inmediatamente en unos soportes de corcho, e introducidas en formol al 10% en tampón fosfato salino (PBS), durante 1-2 días y se teñían con Sudán III. Los troncos supra-aórticos se fijaban en formol al 10% para su procesado posterior. El tiempo transcurrido entre la parada cardiorrespiratoria y la obtención de todo el material no superaba los 30 minutos (Fig. 6).



**Fig. 6.** Imágenes del mantenimiento y disección de los animales de experimentación. a y b.- Preparación de la dieta, c y d.-Mantenimiento de los animales periodo de inducción f,g, h, i.- Disección para extraer corazón y troncos supra-aórticos (i).

#### **6.4. Análisis bioquímico del plasma**

Las muestras de plasma fueron procesadas mediante un analizador automático D-2400 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan), y se emplearon reactivos estándar de la casa Boehringer Mannheim (Boehringer, Barcelona, España), para la determinación de lípidos (triglicéridos, colesterol, HDL, LDL) y otros parámetros bioquímicos (urea, glucosa, ácido úrico, aspartato aminotransferasa AST, alanina aminotransferasa ALT, fosfatasa alcalina, albúmina, ferritina, hierro y PCR).

El colesterol se determinó mediante el test color-enzimático (método CHOD-PAP). Los triglicéridos se determinaron por reacción colorimétrica mediante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y determinación enzimática subsiguiente del glicerol formado. La PCR mediante la prueba de Tina-quant de PCR (intensificada con látex), un test inmunoturbidimétrico potenciado con partículas. Se utilizaron los analizadores automáticos Roche/Hitachi y modular P:ACN 019.

#### **6.5. Técnicas histológicas convencionales**

Para el estudio histológico se tomaron los troncos supra-aórticos de los distintos grupos y se procedió a su inmersión en formol al 10 % en PBS 10 horas para su procesado posterior e inclusión en parafina. En el procesamiento de inclusión las muestras son deshidratadas en alcoholes crecientes, tolueno e infiltradas en parafina. Posteriormente se preparaban los bloques y se cortaban en secciones de 5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) en un microtomo de rotación Microm (HM310). Los cortes obtenidos se recogían en portaobjetos impregnados con poli-L-lisina para evitar su desprendimiento, dejándolos secar para después realizar las distintas técnicas histológicas.

Tras desparafinar en xilol e hidratar en alcoholes decrecientes hasta agua, las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina y van Gieson. Posteriormente se deshidrataron en alcoholes crecientes, se aclararon en

xilol y se montaron los cubreobjetos con medio de montaje DPX (material sintético adhesivo con un índice de refracción similar al vidrio).

Las tinciones realizadas de hematoxilina-eosina de los distintos grupos, se observaron al microscopio y se realizó una descripción histológica de los distintos grados de lesión de cada muestra, valorando la conservación del endotelio, la organización de la capa íntima y de la capa media, la celularidad, el incremento de fibras musculares lisas, el depósito de vacuolas de lípidos y su tamaño.

#### **6.6. Valoración semicuantitativa de los grados de lesión. Valoración modificada de los Grados de Stary**

Según las características histológicas observadas en las muestras de los distintos grupos para la tinción de hematoxilina-eosina, van Gieson e inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina, se realizó una clasificación de las lesiones arterioscleróticas de los troncos supra-aórticos con una puntuación desde cero a tres puntos. Estas puntuaciones se asignaban según el grado de intensidad de los hallazgos (grosor de la capa íntima, celularidad de la capa íntima y capa media, presencia de depósitos lipídicos, presencia de fibras musculares lisas y existencia de placa de ateroma). En esta nueva clasificación hemos imitado en lo posible la descripción histológica definida en la clasificación de la American Heart Association, basada en la clasificación de Stary (Stary y col., 1995). Describimos los siguientes estadios y puntuaciones:

- Estadio I o normal: (Puntuación "0"). Capa íntima de tamaño normal, organizada, sin presencia de células vacuoladas. Escasa celularidad.
- Estadio II o discreta afectación: (Puntuación "1"). Capa íntima ligeramente aumentada de tamaño, aumento discreto de celularidad, con presencia de células vacuoladas subendoteliales aisladas (depósitos aislados de lípidos).

- Estadio III o notable afectación: (Puntuación “2”). Capa íntima aumentada de forma moderada en su grosor, con aumento moderado de la celularidad, alguna fibra muscular lisa aislada y depósitos de lípidos de forma moderada.
- Estadio IV o intensa afectación: (Puntuación “3”). Capa íntima con aumento importante en su grosor, con core lipídico (placa de ateroma) que desorganiza la capa íntima, celularidad densa y fibras musculares lisas.
- Estadio V o fibroateroma con importante componente de tejido conectivo, como son las fibras musculares lisas y colágeno, formando un casquete, no incluido en la clasificación semicuantitativa.

Una vez realizada la puntuación en cada grupo, se calculó la media de cada uno de ellos y se realizó el análisis estadístico.

### **6.7. Técnicas inmunocitoquímicas**

Las técnicas inmunocitoquímicas se realizaron para cuantificar el depósito de  $\alpha$ -actina, marcador de las fibras musculares lisas. Los pasos a seguir fueron los siguientes: Tras desparafinar e hidratar las secciones se bloqueó la peroxidasa endógena con 0'3%  $H_2O_2$  en PBS (solución tampón fosfato salino). Posteriormente se realizaron varios lavados en PBS y se incubaron las secciones en cámara húmeda con suero normal de conejo (NRS, 1:20), 30 minutos. Después se incubaron toda la noche a 4° C en anti- $\alpha$ -actina (1:100, Dako) producido en ratón. Tras lavado en PBS se incubó en la segunda capa anti-IgG ratón conjugado con peroxidasa (1:100, Dako) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último tras los lavados en PBS, se reveló la peroxidasa con 0'05% 3,3'diaminobencidina (DAB) y 0'015% (peróxido de hidrógeno)  $H_2O_2$ . Se contrastó con hematoxilina, se deshidrataron, aclararon y montaron en DPX.

Controles: la especificidad de la técnica se realizó sustituyendo el primer anticuerpo contra  $\alpha$ -actina por PBS en secciones seriadas de las anteriores teñidas conjuntamente al resto de secciones. No se obtuvo ningún marcaje.

### **6.8. Valoración mediante análisis de imagen de parámetros morfométricos-densitométricos de los troncos supra-aórticos**

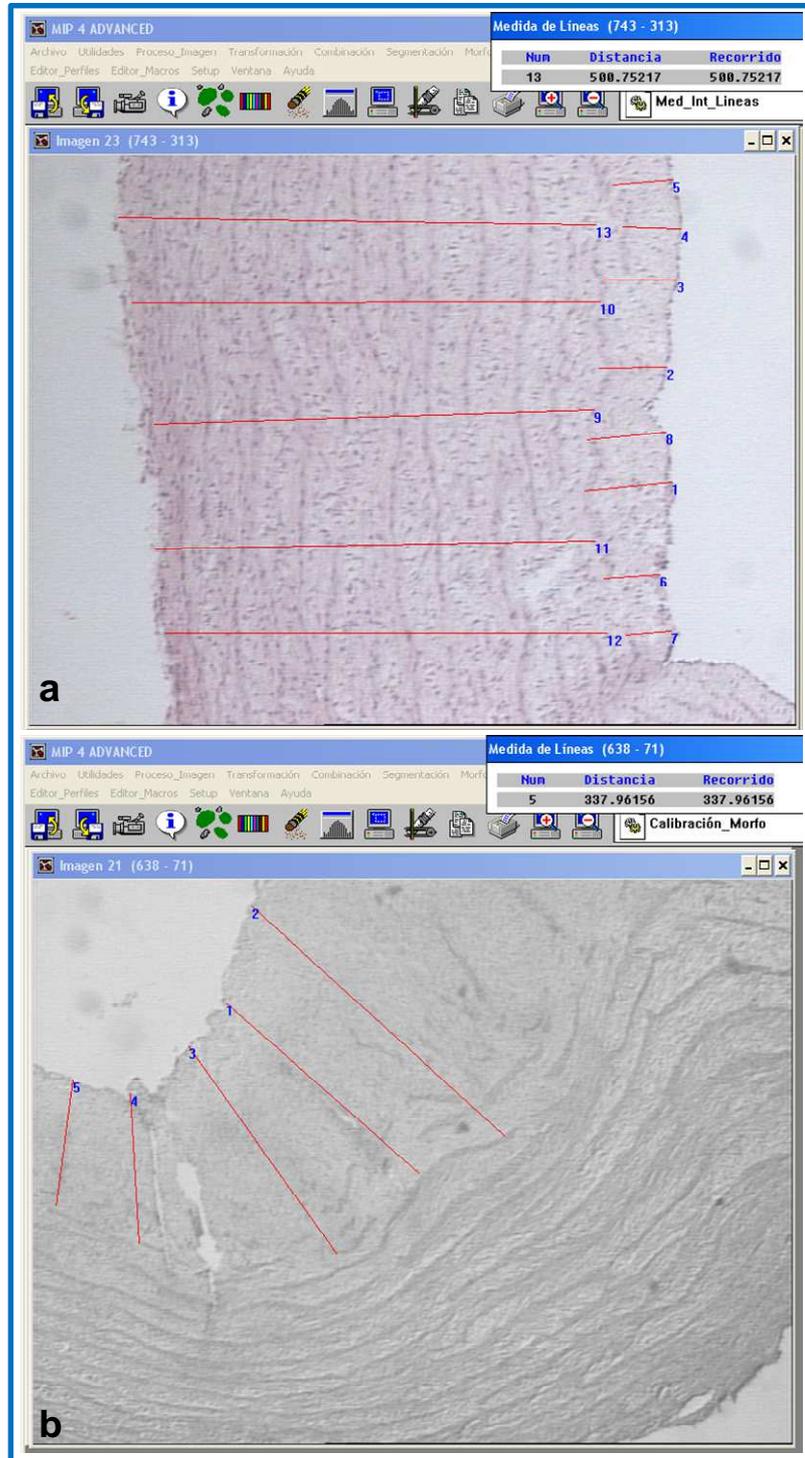
Entre los parámetros morfométricos se valoró en todos los grupos experimentales, el grosor de la capa media, de la capa íntima y de la placa de ateroma. En la neoíntima se valoró el grosor de la  $\alpha$ -actina subendotelial y la densidad de volumen de  $\alpha$ -actina. Además se valoró la intensidad de inmunomarcaje de la  $\alpha$ -actina para cuantificar densitométricamente la cantidad de  $\alpha$ -actina. Otros parámetros evaluados fueron: el área del vaso, diámetro externo del vaso, diámetro de la luz o interno, el grosor de la pared vascular, relación pared/luz y por último el grado de oclusión del vaso.

Todas las medidas se realizaron en un sistema de análisis de imagen empleando el software MIP 4.5 (Microm Image Processing Software, CID, Consulting Image Digital, Barcelona) en la Sección de Análisis de Imagen, Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia.

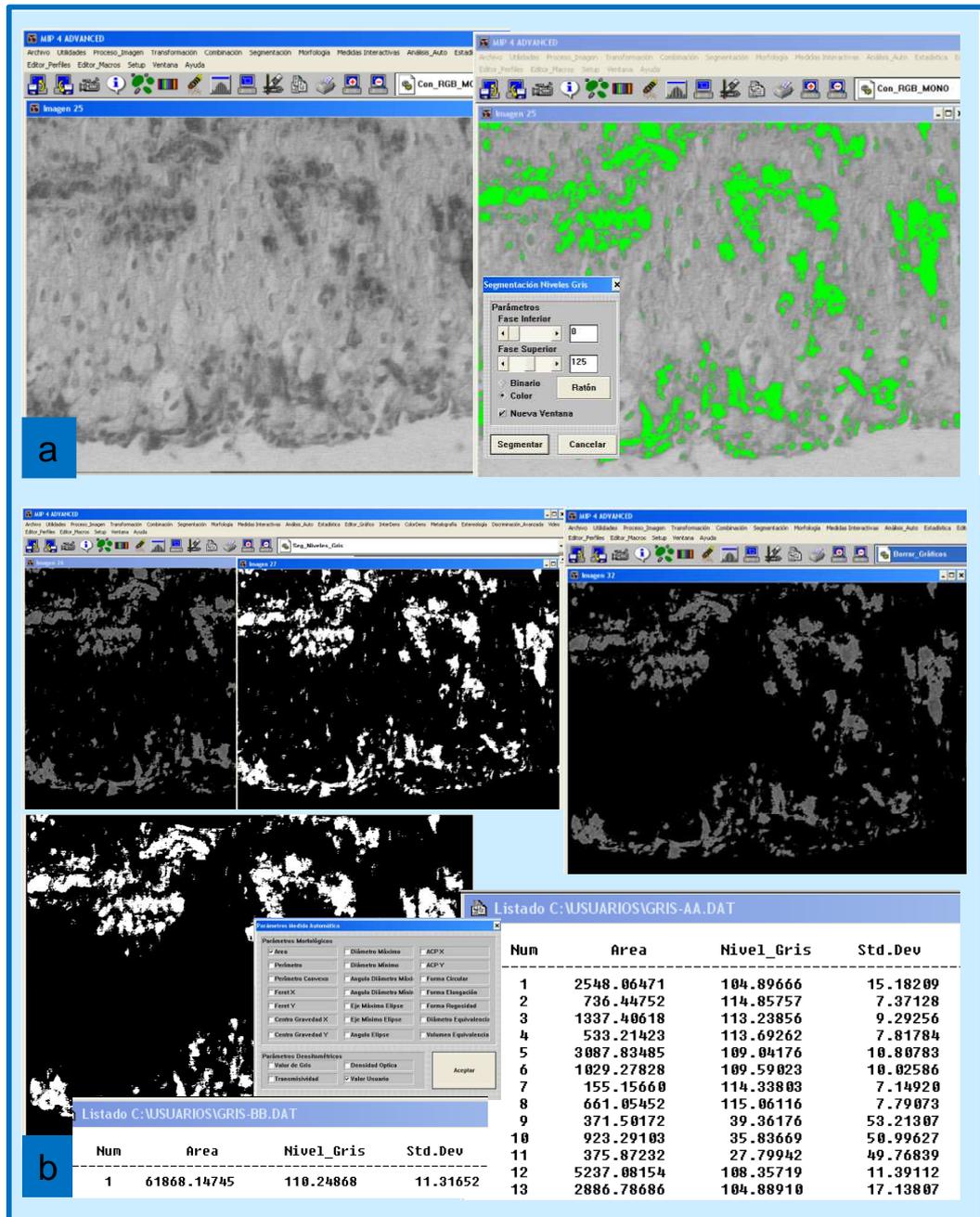
- Grosor de la capa media (n=100): se valoraron las muestras teñidas con H-E en un microscopio de luz con un objetivo 40x (Fig.7).
- Grosor de la capa íntima y de la placa de ateroma (n=100): se valoraron las muestras teñidas con la tinción de van Gieson en un microscopio de luz con un objetivo 10x (Fig.7).
- Valoración de la neoíntima: Se ha llevado a cabo por medio de técnicas inmunocitoquímicas que detectan el depósito de  $\alpha$ -actina, marcador de las fibras musculares lisas. Se han obtenido tres parámetros:

- El grosor de la actina subendotelial (n=40): se ha valorado en un microscopio de luz con un objetivo 40x.
- La densidad de volumen de  $\alpha$ -actina (Vv) (n=20). Siguiendo el principio de Delesse la densidad de volumen es igual a la densidad de área (Aa) y ésta a su vez se calcula con la siguiente expresión en este caso concreto. ( $Vv=Aa=\text{área de actina} / \text{área de referencia de íntima}$ ) (Howard y Reed, 1998). Supone la cuantificación de  $\alpha$ -actina considerando el área inmunorreactiva.
- La cuantificación de  $\alpha$ -actina considerando la densidad de volumen y la intensidad de la inmunorreactividad (n=20). Este parámetro lo hemos denominado densidad integrada de  $\alpha$ -actina (DIA) (Fig. 8). Este parámetro se calcula como el producto de la densidad de área (Aa), por el nivel de gris invertido ( $0=\text{negro}$ ,  $255=\text{blanco}$ , el valor de gris invertido= $255-\text{valor de gris}$ , para que la correlación sea positiva). Un valor más alto de nivel de gris invertido significa más reactividad o mayor presencia de  $\alpha$ -actina.
- El área del vaso (n=20): se utilizaron las muestras teñidas con hematoxilina-eosina o van Gieson. Se obtuvo el área de la íntima incluyendo la luz, el área de la luz y el área de todo el vaso incluyendo la luz. A partir de estos datos se determinó:
  - Área de la íntima: ( $\text{área íntima+luz}$ )-  $\text{área luz}$ .
  - Área de la luz.
  - Área de la pared: ( $\text{área total vaso}$ ) – ( $\text{área de la luz}$ ).
- Diámetro del vaso, máximo o externo (n=50). Se valoraron en secciones teñidas con H-E o van Gieson en un microscopio con el objetivo 40x.
- Diámetro de la luz, mínimo o interno (n=50). Se valoraron en secciones teñidas con H-E o van Gieson en un microscopio con el objetivo 40x.
- Grosor de la pared (n=50): ( $\text{diámetro vaso}$ )-(diámetro luz).

- Grado de oclusión del vaso (n=20): ( $\% \text{ oclusión} = \text{área íntima} / \text{área íntima} + \text{luz} \times 100$ ).
- Relación pared/luz (n=20): Cociente entre el grosor de la pared y el diámetro interno. Este valor es indicativo de remodelado vascular.



**Fig. 7.** Imágenes del proceso de medida interactiva del grosor de las capas íntima y media (a) y placa de ateroma (b).



**Fig 8.** Esquema de los pasos seguidos en el protocolo de cuantificación de la inmunoreactividad mediante análisis de imagen. a.- Selección del nivel de gris correspondiente al inmunomarcaje de actina. b.- Segmentación del inmunomarcaje y área de referencia. Valoración del nivel de gris y área del inmunomarcaje. Con estos datos se calcula la densidad integrada de  $\alpha$ -actina (DIA) en la hoja excel.

## 6.9. Coeficiente aterogénico

Basándonos en la clasificación del índice de la actividad de la EGHNA o “NAFLD Activity Score” (NAS) (Kleiner y col., 2005) con el grado de afectación hepática, a nivel vascular realizamos el sumatorio de algunos de los parámetros anteriores. El objetivo es obtener unos valores que nos permitan calcular el grado de afectación de arteriosclerosis, a este parámetro lo denominamos “coeficiente aterogénico” (CA), el cuál oscila entre 0 y 47 puntos.

Así pues, el coeficiente aterogénico se calculó con algunos parámetros morfométricos o densitométricos. Se indica la asignación de puntos para cada rango de valores, en cada parámetro usado en la estimación de este coeficiente, tabla 8.

**Tabla 8.** Parámetros incluidos para calcular el CA

Parámetro	0 puntos	1 punto	2 puntos	3 puntos	4 puntos	5 puntos	6 puntos
Grado modificado de Stary	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV			
Grosor placa ateroma ( $\mu\text{m}$ )	0-49	50-99	100-199	200-299	300-399	$\geq 400$	
Grosor capa íntima ( $\mu\text{m}$ )	0-49	50-99	100-199	200-299	300-399	$\geq 400$	
Grosor actina subendotelial ( $\mu\text{m}$ )	0-19.9	20-39.9	40-59.9	60-79.9	80-99.9	100-199.9	$\geq 200$
Densidad de volumen de $\alpha$ -actina (%)	0-5	6-10	11-15	16-20	$\geq 21$		
Densidad integrada de $\alpha$ -actina	0-9.9	10-19.9	20-29.9	30-39.9	$\geq 40$		
Grosor capa media ( $\mu\text{m}$ )	$\geq 500$	400-499.9	300-399.9	200-299.9	100-199.9	0-99.9	
Grosor pared ( $\mu\text{m}$ )	1200-1399	1400-1599	1600-1799	1800-1999	2000-2199	$\geq 2200$	
Relación pared/luz	0.45-0.54	0.55-0.64	0.65-0.74	0.75-0.84	0.85-0.94	$\geq 0.95$	
Grado oclusión del vaso (%)	0-14	15-29	30-44	45-59	60-74	$\geq 75$	

## **6.10. Valoración histológica del hígado**

En nuestro grupo de investigación, Martín Castillo, en su tesis doctoral (2008) realizó un estudio de la esteatosis, la inflamación y la lesión hepatocelular del hígado de los mismos animales de experimentación comentados previamente, según la clasificación del índice de la actividad de la EGHNA o “NAFLD Activity Score” (NAS) (Kleiner y col., 2005) tabla 4, tomando una muestra de hígado siempre de la misma zona, del borde interno del lóbulo hepático izquierdo. Estas muestras se fijaron en 10% de formol en tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS) durante 7h y se procesó para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 5µm, que se tiñeron con Verhoeff-van Gieson para valorar la presencia de fibrosis y con hematoxilina-eosina para la realización de una descripción histológica de los hígados de cada animal.

La valoración morfométrica cuantitativa de la esteatosis se llevó a cabo con un equipo de análisis de imagen conectado a un microscopio de luz (Axioskop, Zeiss) y una cámara de vídeo Sony DXC 131-AP, empleando un software MIP 4.5 (Microm Image Processing Software, CID, Consulting Image Digital, Barcelona). Con dicho análisis, se cuantificó el porcentaje de área de esteatosis en el parénquima hepático (zona lobulillar y centrolobulillar) en 10 campos de observación, obteniendo 100 medidas por grupo experimental y zona. Se calculó la media y error estándar de cada grupo y zona realizándose los test diagnósticos para la comparación entre los grupos y zonas mediante el análisis estadístico.

Para la valoración de la inflamación hepática se contabilizó el número de focos inflamatorios por observación directa al microscopio en 10 campos de observación por animal 200x, realizando un total de 100 observaciones por grupo experimental, asignando a cada foco un valor: “1” si el infiltrado era poco denso, “2” si era moderado y “3” si el infiltrado era muy denso. Por otro lado, se cuantificó el área y diámetro máximo de los focos inflamatorios por un equipo de análisis de imagen conectado a un

microscopio de luz (Axioskop, Zeiss) y una cámara de vídeo Sony DXC 151-AP, realizando un total de 100 observaciones por grupo experimental. Y por último, se valoró la densidad inflamatoria mediante la segmentación por análisis de imagen de las áreas correspondientes a células migratorias dividido por el área del campo de referencia.

En la valoración de la lesión hepatocelular se tuvieron en cuenta las siguientes características:

- a) Balonización: Es la única lesión necesaria para el diagnóstico de EHNA. Los hepatocitos se encuentra aumentados de tamaño, con citoplasma pálido en su mayor parte y condensado en la región perinuclear. Según su presencia se les dio una puntuación (“0” si no hay, “1” si es poco frecuente y “2” si son muy numerosos).
- b) Cuerpos acidófilos: Son pequeños fragmentos de citoplasma refringente eosinófilo en el sinusoide, como resultado de la muerte apoptótica de la célula.
- c) Megamitocondrias.
- d) Macrófagos pigmentados: Inclusiones lamelares producidas por el depósito de fosfolípidos dentro de los lisosomas.
- e) Núcleos glucogenados: Aparecen vacuolados con contenido en glucógeno.
- f) Hialina de Mallory: Inclusión intracelular en los hepatocitos como una masa irregular intensamente eosinófila secundario a acumulaciones de filamentos de citoqueratina.

El índice de actividad de la EGHNA o “NAFLD Activity Score” (NAS) viene definido por la suma de la esteatosis, inflamación lobular y de la balonización. Este índice varía en un rango de 0 a 8, no considerándose diagnóstico de .esteatohepatitis a la puntuación de 0 a 2. Así pues, Martín Castillo (2008) aplicó el NAS a las muestras hepáticas de los grupos experimentales (tabla 9).

**Tabla 9.** Resumen del análisis cuantitativo de las características histológicas

Característica	GRUPOS					
	A	B	C	D	E	
<b>Esteatosis (%)</b>						
Depósito Lobulillar	0.0	55.11	7.10	2.92	32.30	
Depósito Centrolobulillar	0.01	53.76	8.99	2.98	20.55	
Tipo de esteatosis	Macrovacuolar	0	40	23	16	27
	Microvacuolar	0	34	14	17	39
	No afectados	100	26	63	67	34
<b>Inflamación</b>						
Nº focos campo	0	3.71	1.4	1.13	1.42	
Área foco inflamatorio ( $\mu\text{m}^2$ )	0	8754.42	4976.90	3031.32	3869.68	
Diámetro máximo del foco ( $\mu\text{m}$ )	0	130.27	104.18	76.86	95.77	
Densidad inflamatoria (%)	0.44	7.88	3.42	2.64	3.76	
Microgranulomas 0-1	0	1	1	1	1	
Lipogranulomas 0-1	0	1	1	1	1	
Inflamación portal 0-1	0	1	1	1	1	
<b>Lesión hepatocitaria</b>						
Balonización	0	1.85	0.43	0.17	1.01	
Cuerpos acidófilos	0	0	0	0	0	
Megamitocondrias	0	0	0	0	0	
Macrófagos pigmentados	0	0	0	0	0	
Hialina de Mallory	0	0	0	0	0	
Núcleos glucogenados	0	0	0	0	0	

Martin Castillo, 2008.

### 6.11. Comparación del coeficiente aterogénico (CA) y el índice de actividad de la enfermedad de esteatohepatitis no alcohólica (NAS)

Una vez obtenido el coeficiente aterogénico de los distintos grupos experimentales, con un menor o mayor grado de afectación vascular por la arteriosclerosis, se comparó con los datos obtenidos tras realizar el NAS a todas las muestras hepáticas, realizándose los test diagnósticos

para la comparación entre todos los grupos mediante el análisis estadístico. Se empleó el paquete estadístico SPSS v15.

Ambos coeficientes se compararon por el coeficiente de correlación de Pearson.

### **6.12. Análisis estadístico de los datos morfométricos**

Los resultados se analizaron utilizando el paquete informático SPSS v15. Para la significación estadística de los resultados cuantitativos, se aplicó el test de ANOVA o el test de Welch según la prueba de homogeneidad de varianzas, y las correspondientes pruebas de comparaciones múltiples dos a dos. Para las pruebas no paramétricas se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones dos a dos por la prueba de Mann-Whitney.



## Capítulo 7

### RESULTADOS



## 7.1. Resultados bioquímicos

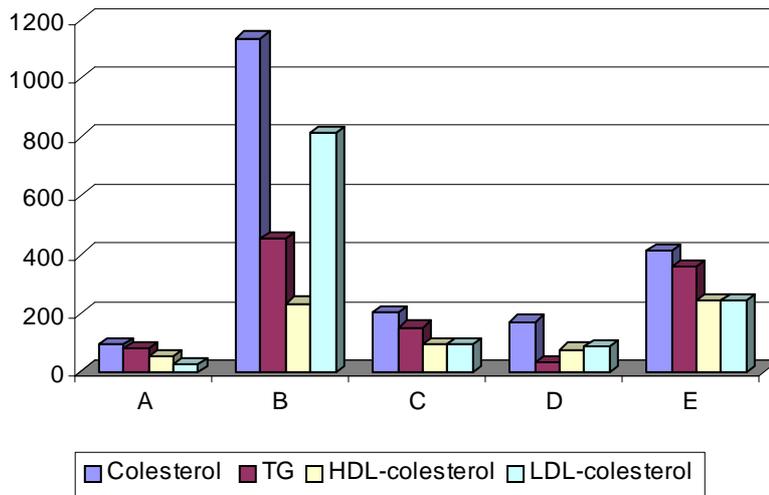
Los valores analíticos obtenidos en los cinco grupos experimentales (colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos) se recogen en la tabla 10 y en la figura 9. Como puede observarse hay una gran diferencia entre el nivel más alto de colesterol y triglicéridos del grupo B, con respecto a los bajos niveles del control sano, grupo A. Ambos niveles analíticos disminuyen en los grupos de supresión de dieta hiperlipémica (regresión espontánea) y/o tratamiento con atorvastatina. Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) tras la prueba de Anova y Bonferroni entre todos los grupos con respecto a las cifras de colesterol, triglicéridos y LDL-colesterol. Para el HDL-colesterol se han obtenido unos mayores niveles en el grupo de dieta hiperlipémica (B) y en el grupo de progresión farmacológica (E) sin diferencia estadística entre ellos, pero sí con el resto de los grupos experimentales; un nivel intermedio de los grupos de regresión espontánea (C) y regresión espontánea y farmacológica (D), y por último el grupo de dieta normal (A).

**Tabla 10.** Perfil lipídico en plasma

Grupo	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)
<b>A</b>	95.11 ± 5.93 <sup>a</sup>	79.55 ± 33.49 <sup>a</sup>	53.11 ± 8.42 <sup>a</sup>	26.00 ± 2.78 <sup>a</sup>
<b>B</b>	1136.00 ± 196.2 <sup>b</sup>	454.00 ± 165.9 <sup>b</sup>	233.80 ± 33.74 <sup>b</sup>	811.3 ± 162.35 <sup>b</sup>
<b>C</b>	204.20 ± 40.87 <sup>c</sup>	153.40 ± 90.92 <sup>c</sup>	95.40 ± 20.24 <sup>c</sup>	95.00 ± 27.79 <sup>c</sup>
<b>D</b>	172.40 ± 44.68 <sup>d</sup>	31.60 ± 7.24 <sup>d</sup>	77.60 ± 26.40 <sup>c</sup>	88.50 ± 19.29 <sup>d</sup>
<b>E</b>	413.75 ± 83.80 <sup>e</sup>	356.88 ± 130.32 <sup>e</sup>	242.88 ± 70.96 <sup>b</sup>	242.80 ± 70.93 <sup>e</sup>

Los valores se expresan como media ± error típico, para  $n = 10$  por grupo experimental. Prueba estadística de Anova y Bonferroni. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos. HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad.

**Fig. 9.** Valores medios del perfil lipídico para cada grupo experimental



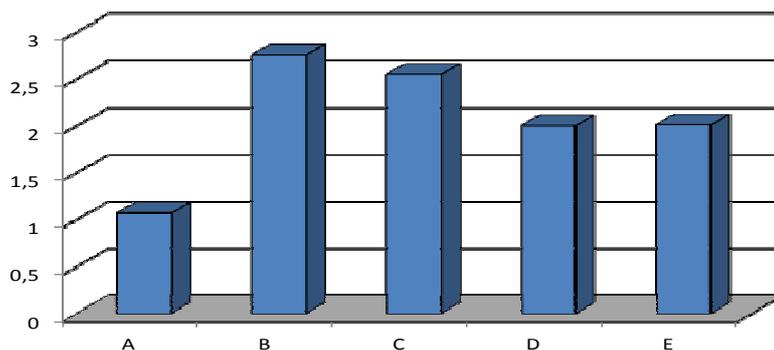
Con respecto a los valores de PCR, tabla 11 y figura 10, puede observarse una diferencia estadísticamente significativa sólo entre el grupo control de dieta normal (A) y el resto de los grupos experimentales.

**Tabla 11.** PCR en plasma

Grupo	PCR (mg/dL)	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	1.07 ± 0.29	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	2.75 ± 0.26	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>b</sup>	2.55 ± 0.91	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>b</sup>	2.00 ± 0.38	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>b</sup>	2.01 ± 0.33	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media ± error típico, para n = 10 por grupo experimental. Prueba estadística de Anova y Bonferroni. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los grupos. PCR: Proteína C reactiva.

**Fig. 10.** Representación de valores medios de PCR en plasma en cada grupo



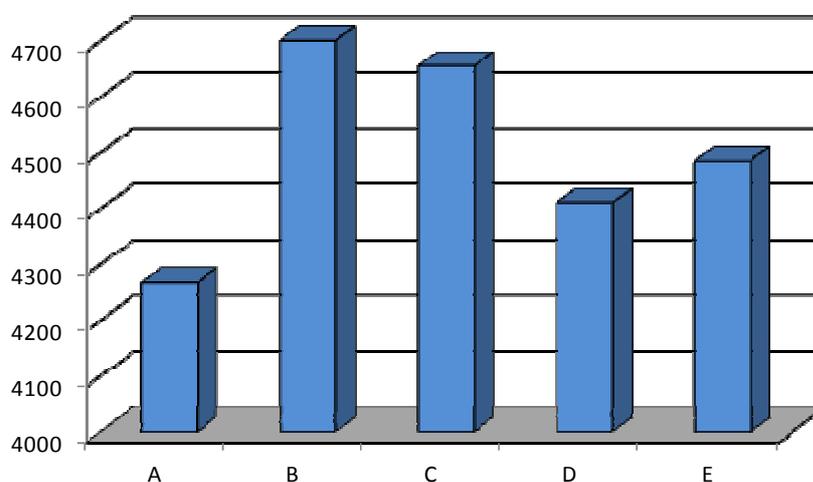
Al finalizar el estudio, previamente a la extracción sanguínea para determinar el perfil bioquímico, se les pesaba de forma rutinaria, con el objeto de determinar si se producía obesidad. En la tabla 12 y figura 11, se recogen los resultados obtenidos.

**Tabla 12.** Peso medio corporal total por grupo experimental

Grupo	Peso corporal (gr)	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	4268 ± 187	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>a</sup>	4700 ± 200	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>a</sup>	4655 ± 168	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>a</sup>	4410 ± 181	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>a</sup>	4485 ± 363	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media ± error típico, para n = 10 por grupo experimental. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice. Tras las pruebas de Games-Howell no se encuentran diferencias significativas entre los grupos.

**Fig. 11.** Representación del peso medio corporal total de cada grupo

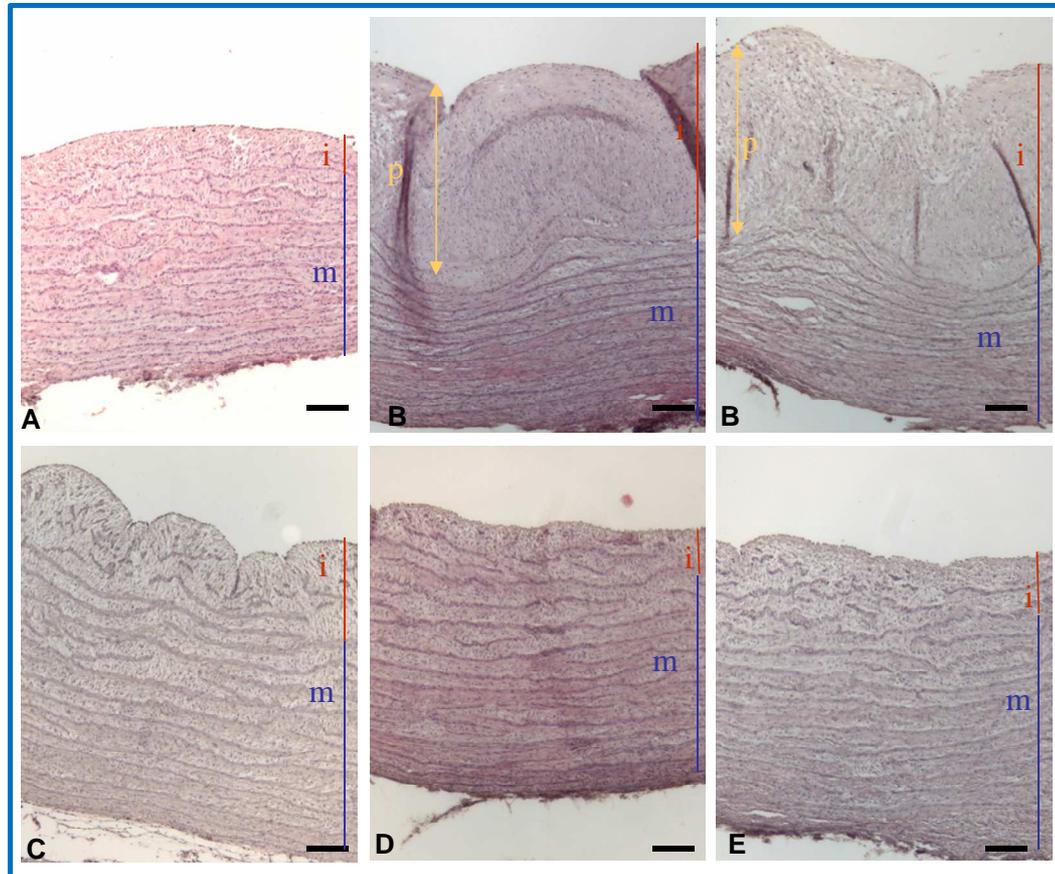


## 7.2. Descripción histológica

Tras observar las muestras de la tinción de hematoxilina-eosina y van Gieson en microscopio de luz, se ha realizado una descripción histológica de los distintos grupos experimentales:

- En el grupo "A", control con dieta normal, se observa un endotelio conservado, con ausencia de fibras musculares lisas en la capa íntima, sin estar ésta aumentada de tamaño, ni la capa media. Se observan fibras musculares lisas en la capa media, de una forma organizada, con poca celularidad.
- En el grupo "B", dieta hiperlipémica, el endotelio está conservado, con la capa íntima muy aumentada de tamaño (10 veces el tamaño del grupo A), muy desorganizada, con aumento de lípidos en placa de ateroma. En ocasiones la placa de ateroma ocupa toda la capa íntima (tejido muy laxo). Se observan depósitos subendoteliales de fibras musculares lisas con distribución homogénea, en el espesor de la capa íntima. Capa media con fibras musculares lisas desorganizadas y mucha celularidad.
- En el grupo "C", regresión espontánea, el endotelio está conservado, con la capa íntima aumentada de tamaño (4-5 veces el tamaño del grupo A), ocupada por grandes placas de ateroma, y depósito de fibras musculares lisas subendoteliales "de gran espesor", más profundas, y algunas fibras musculares lisas dispersas en el espesor de la capa íntima pero de forma más difusa. Desorganización de la capa íntima. Capa media muy laxa, con aumento moderado de la celularidad y del tejido muscular liso.
- En el grupo "D", regresión espontánea y farmacológica, el endotelio está conservado, con la capa íntima de tamaño normal o ligeramente aumentada (2 veces el tamaño del grupo A), con algún depósito aislado de lípidos y aumento ligero de las fibras musculares lisas y de la celularidad. En la mayoría, la capa media se encuentra organizada.
- En el grupo "E", progresión farmacológica, el endotelio está conservado, con aumento moderado de la capa íntima y de las fibras musculares lisas, encontrándose éstas más organizadas en la parte profunda de la capa media. Se observa tejido laxo con vacuolas de lípidos y placas subendoteliales que desorganizan la capa íntima.

En la figura 12, observamos las características histológicas de los distintos grupos experimentales.



**Fig. 12.** Imágenes representativas de los diferentes grupos de tratamiento. A: Control con dieta normal, B: dieta hiperlipémica, C: regresión espontánea, D: regresión espontánea y farmacológica, E: progresión farmacológica. A poco aumento es de destacar el alto grado de desarrollo de la placa de ateroma en el grupo B, ocupando toda la capa íntima, con gran desorganización de la pared arterial. También es patente el aumento del grosor de la capa íntima en el grupo C. i: capa íntima, m: capa media, p: placa de ateroma. Hematoxilina-eosina. Barra: 100  $\mu$ m.

### **7.3. Valoración semicuantitativa modificada de los grados de lesión de Stary**

Según las características histológicas observadas en las muestras de los distintos grupos por microscopía óptica para la tinción de hematoxilina-eosina, van Gieson e inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina, se ha realizado una clasificación imitando en lo posible los estadios de Stary (Stary y col., 1994) según la clasificación de la American Heart Association (Stary y col., 1995). Se ha tenido en cuenta el grosor de la capa íntima, la celularidad de la capa íntima y de la capa media, la presencia de depósitos lipídicos, la presencia de fibras musculares lisas y la existencia de placa de ateroma.

La tabla 13 y la figura 13, muestran el distinto grado de afectación de los cinco grupos. Tras la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Mann-Whitney, el grupo control con dieta normal (A) presenta diferencias estadísticamente significativas con el resto de los grupos.

Observamos un grado intermedio, en cuanto a la afectación de la pared vascular, en el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) sin diferencia significativa con respecto al grupo de progresión farmacológica (E).

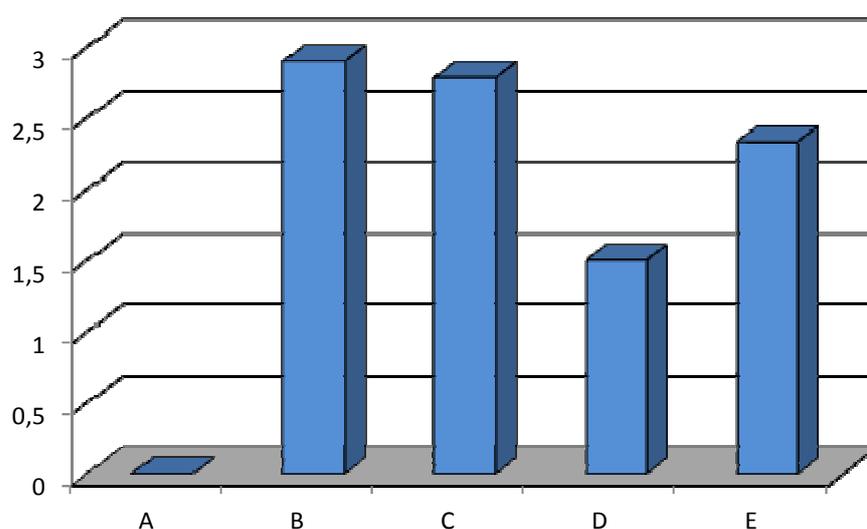
Y por último, llama la atención la apreciación de tres grupos similares en cuanto al grado de afectación (grupos B, C y E). No se observa diferencia significativa entre ellos, siendo el más afectado el grupo con dieta hiperlipémica (B), en segundo lugar el grupo de regresión espontánea (C) y en tercer lugar, el grupo de progresión farmacológica (E).

**Tabla 13.** Valoración semicuantitativa modificada de los grados de lesión de Stary (escala 0-3)

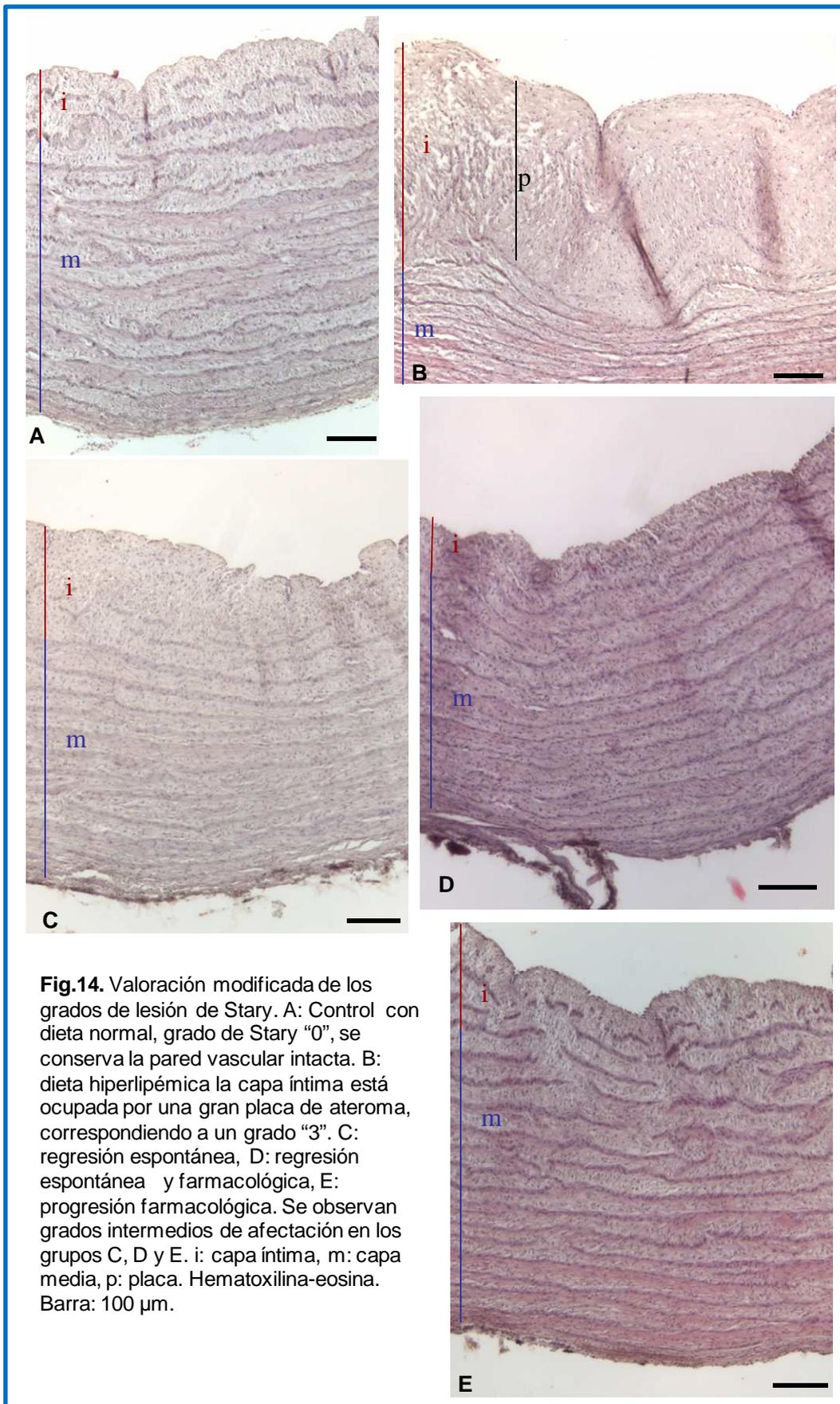
Grupo	Puntuación	
	Grados de Stary	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	2.90 ± 0.10	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>b</sup>	2.78 ± 0.15	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>c</sup>	1.50 ± 0.34	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>b,c</sup>	2.33 ± 0.29	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como rango promedio, para n=10 animales por grupo experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de parejas por la prueba de Mann-Whitney. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 13.** Resultados de la valoración modificada de los grados de lesión de Stary (valores medios de cada grupo experimental)



En la figura 14 se muestra imágenes representativas de los diferentes grupos experimentales aludiendo a su grado de lesión modificado de Stary.



**Fig.14.** Valoración modificada de los grados de lesión de Stary. A: Control con dieta normal, grado de Stary "0", se conserva la pared vascular intacta. B: dieta hiperlipémica la capa íntima está ocupada por una gran placa de ateroma, correspondiendo a un grado "3". C: regresión espontánea, D: regresión espontánea y farmacológica, E: progresión farmacológica. Se observan grados intermedios de afectación en los grupos C, D y E. i: capa íntima, m: capa media, p: placa. Hematoxilina-eosina. Barra: 100  $\mu$ m.

## 7.4. Valoración morfométrica-densitométrica por análisis de imagen

### 7.4.1. Grosor de la capa media

Los resultados se muestran en la tabla 14. Tras aplicar la prueba de homogeneidad de varianzas para valorar el grosor de la capa media del vaso o troncos supra-aórticos, se obtiene una  $p < 0.05$ , por lo que no hay homogeneidad. En estos casos no podemos aplicar el test de ANOVA. Tras aplicar la prueba del estadístico Welch, se obtiene un nivel de significación  $< 0.05$  ( $p < 0.05$ ), por lo que sí hay diferencias entre los grupos. Para precisar dónde en concreto se encuentran las diferencias detectadas, en las comparaciones múltiples en las pruebas post hoc, se ha usado la prueba de Games-Howell, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control de dieta normal, con el resto de los grupos.

**Tabla 14.** Grosor de la capa media

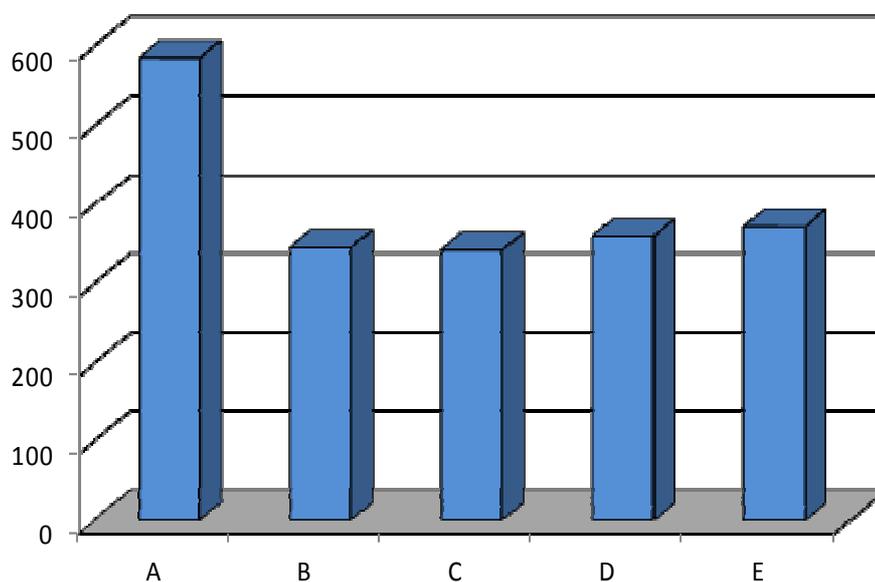
Grupo	Grosor ( $\mu\text{m}$ )	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	585.19 $\pm$ 9.06	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	345.45 $\pm$ 18.21	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>b</sup>	342.26 $\pm$ 18.38	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>b</sup>	359.42 $\pm$ 19.02	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>b</sup>	371.44 $\pm$ 18.18	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para  $n = 100$  por grupo experimental. Prueba de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos. Diferencia significativa entre el grupo A y los demás grupos ( $p < 0.05$ ). No se encuentran diferencias significativas en las demás comparaciones.

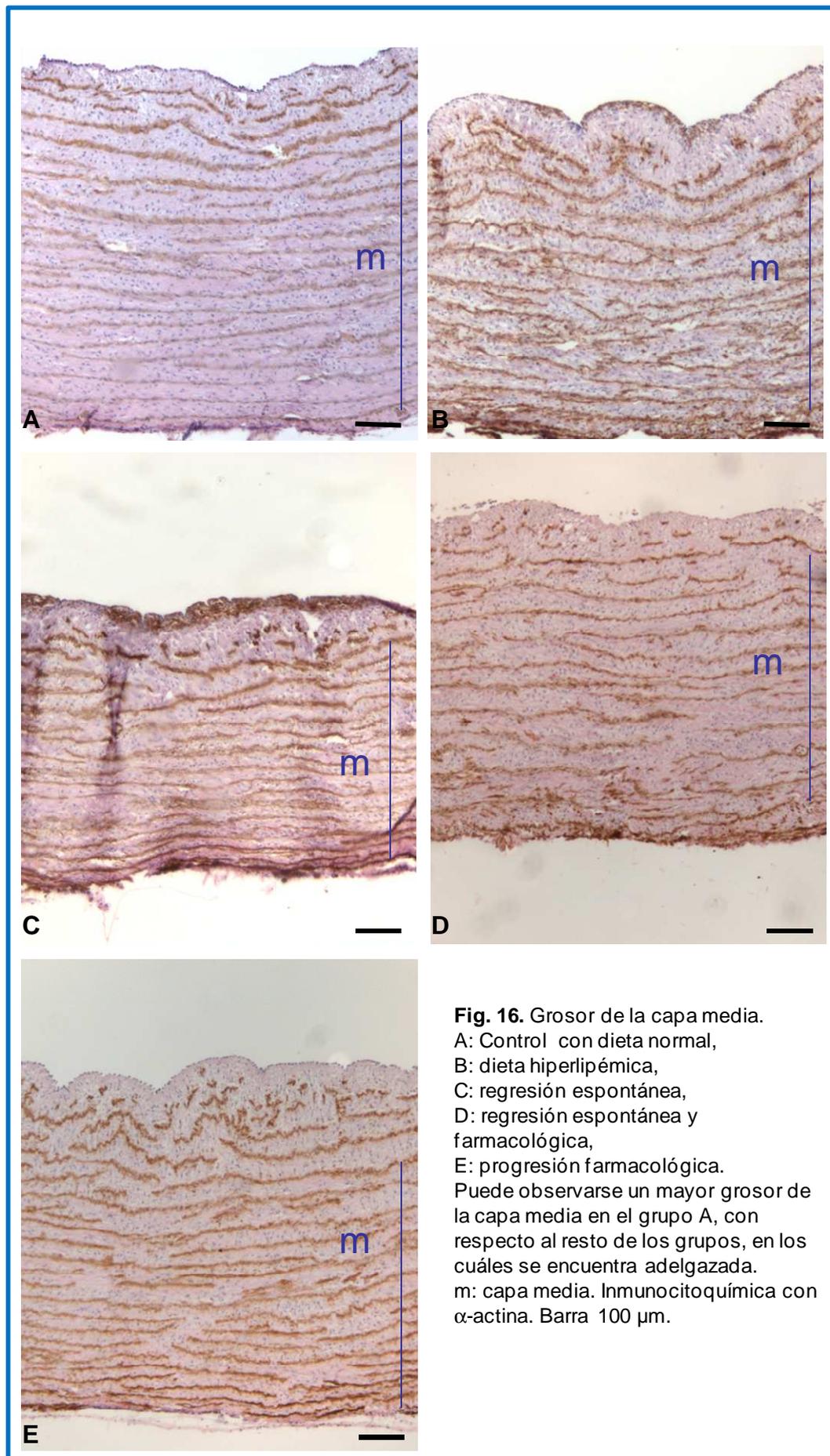
En la figura 15, se comprueba cómo el grupo de pollos alimentados con dieta normal (A), tiene un grosor de la capa media mucho mayor, que el observado en el resto de los grupos. En el grupo de dieta hiperlipémica (B), el de regresión espontánea (C), el de regresión espontánea y

farmacológica (D) y por último, el grupo de progresión farmacológica (E), el grosor de la capa media es en todos ellos similar, y se mantiene en torno a algo más de la mitad (aproximadamente el 60 %) del grosor medio estimado para el grupo de dieta normal (A).

**Fig. 15.** Representación de los valores medios del grosor de la capa media ( $\mu\text{m}$ ) en cada grupo experimental



En la figura 16 podemos observar el grosor de la capa media de los distintos grupos experimentales. Las muestras se han incubado con anticuerpos contra  $\alpha$ -actina (técnica inmunocitoquímica) para emplear esta proteína como marcador de las células musculares lisas.



### 7.4.2. Grosor y área de la capa íntima

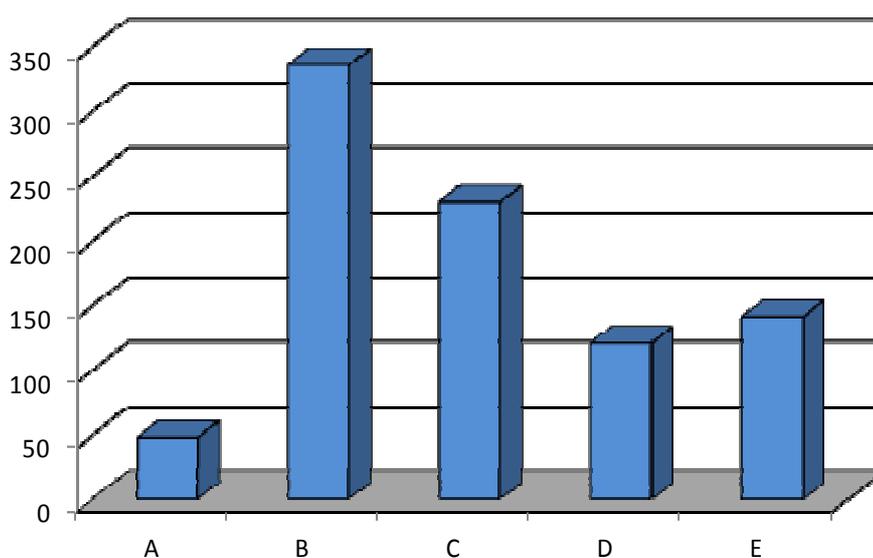
En la tabla 15 y la figura 17, se representan los valores obtenidos en la valoración del grosor de la capa íntima. Tras aplicar las pruebas estadísticas de Welch y Games-Howell, se obtiene una diferencia significativa en todos los grupos, tras su comparación entre ellos.

**Tabla 15.** Grosor de la capa íntima

Grupo	Grosor ( $\mu\text{m}$ )	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	48.66 $\pm$ 2.27	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	336.35 $\pm$ 23.58	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>c</sup>	230.28 $\pm$ 14.51	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>d</sup>	121.45 $\pm$ 4.42	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>e</sup>	141.76 $\pm$ 5.84	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para n = 100 por grupo experimental. Prueba de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos. Diferencia significativa entre todos los grupos ( $p < 0.05$ ), en las comparaciones dos a dos.

**Fig. 17.** Representación de los valores medios del grosor de la capa íntima ( $\mu\text{m}$ )



Se observa un grosor de la capa íntima distinto en cada grupo experimental con una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre todos ellos. El grupo de dieta normal (A) presenta el menor grosor observado y es el que nos sirve de referencia con respecto a los demás. Le sigue el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) con un grosor duplicado, el grupo de progresión farmacológica (E) con un grosor triplicado, el grupo de regresión espontánea (C) con un grosor cinco veces mayor, y por último el grupo de dieta hiperlipémica (B) con un grosor ocho veces superior.

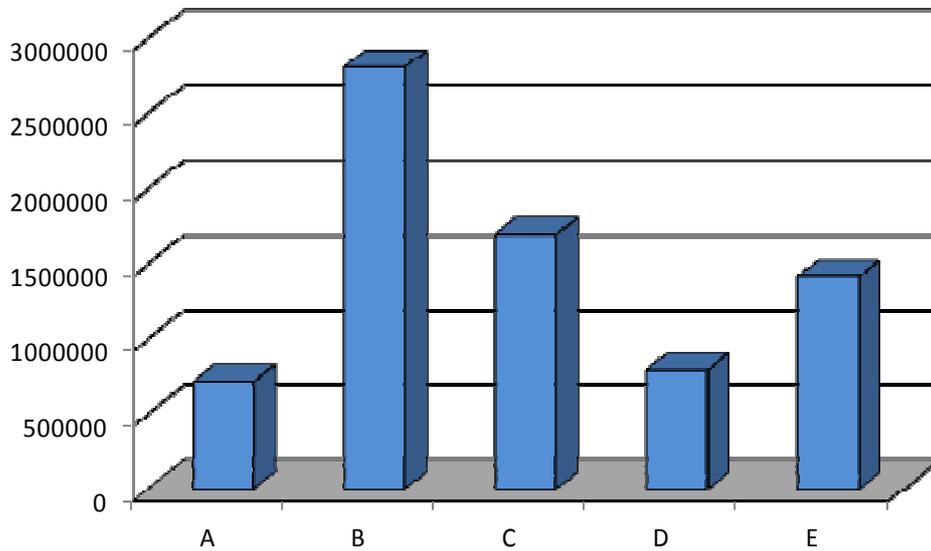
Por otro lado, de forma simultánea, también se ha valorado el área de la capa íntima (tabla 16 y figura 18), con el fin de comprobar si existe o no una correlación paralela con el grosor de la capa íntima. Efectivamente el grupo de dieta normal (A) tiene un menor área, seguido por el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), y en continuidad por el grupo de progresión farmacológica (E), el grupo de regresión espontánea (C) y por último por el grupo de mayor área de la íntima el grupo de dieta hiperlipémica (B), de forma similar al comportamiento del grosor de la capa íntima.

**Tabla 16.** Área de la capa íntima

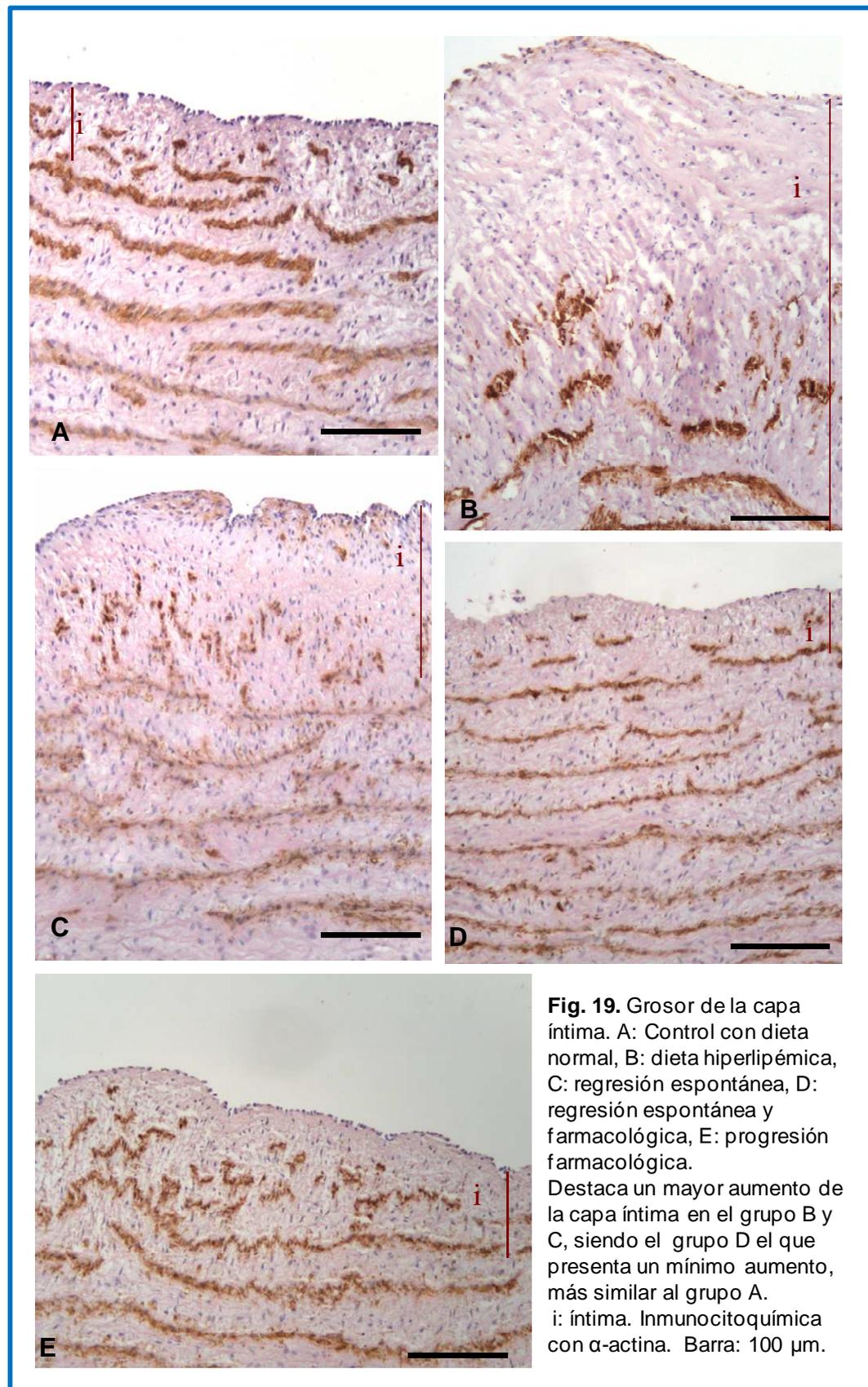
Grupo	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	716044 $\pm$ 202104	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	2805015 $\pm$ 817900	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>c</sup>	1696323 $\pm$ 567454	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>d</sup>	791634 $\pm$ 342919	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>e</sup>	1412740 $\pm$ 743354	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para  $n = 20$  por grupo experimental. Prueba de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 18.** Representación de los valores medios del área de la capa íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) en cada grupo experimental



En la figura 19, podemos observar el grosor de la capa íntima en los distintos grupos de animales de experimentación. Se muestra el marcaje contra  $\alpha$ -actina.



### 7.4.3. Grosor de la placa de ateroma

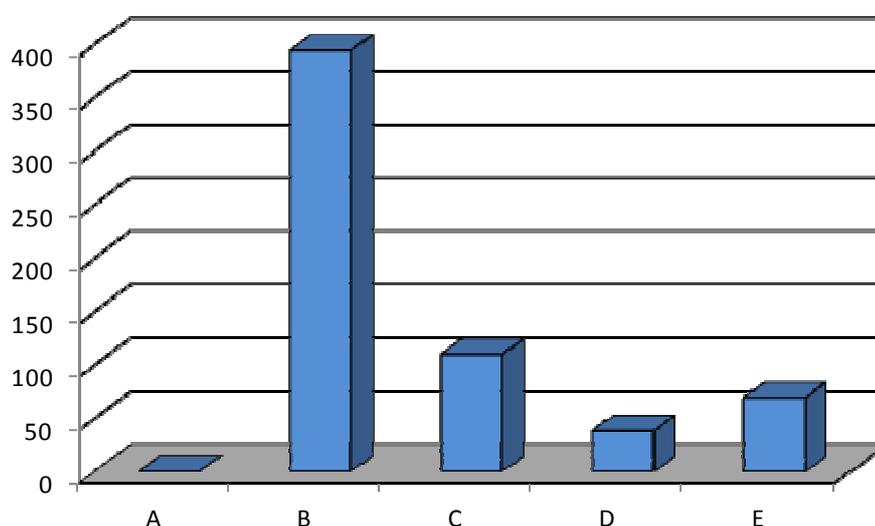
Tras estos datos descriptivos del engrosamiento de la capa íntima, se ha valorado de forma individual la medida del grosor de la placa de ateroma. Se le ha aplicado las pruebas estadísticas de Welch y las comparaciones dos a dos de Games-Howell. En la tabla 17 y en la figura 20, se muestran los resultados obteniéndose una diferencia significativa entre todos los grupos.

**Tabla 17.** Grosor de la placa de ateroma

Grupo	Grosor ( $\mu\text{m}$ )	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	394.51 $\pm$ 34.71	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>c</sup>	110.84 $\pm$ 11.45	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>d</sup>	38.25 $\pm$ 1.82	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>e</sup>	69.64 $\pm$ 6.33	Progresión farmacológica

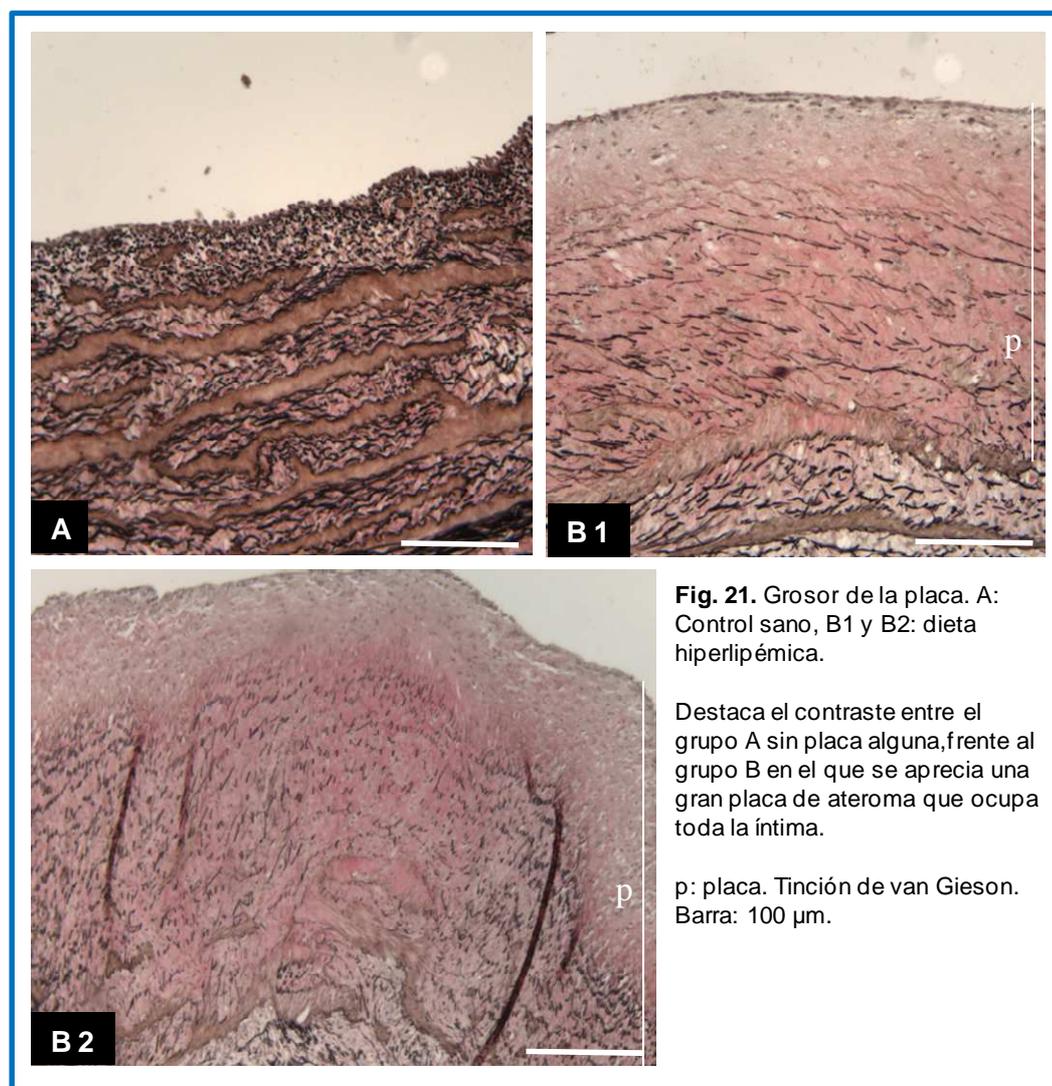
Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para n = 100 por grupo experimental. Prueba de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

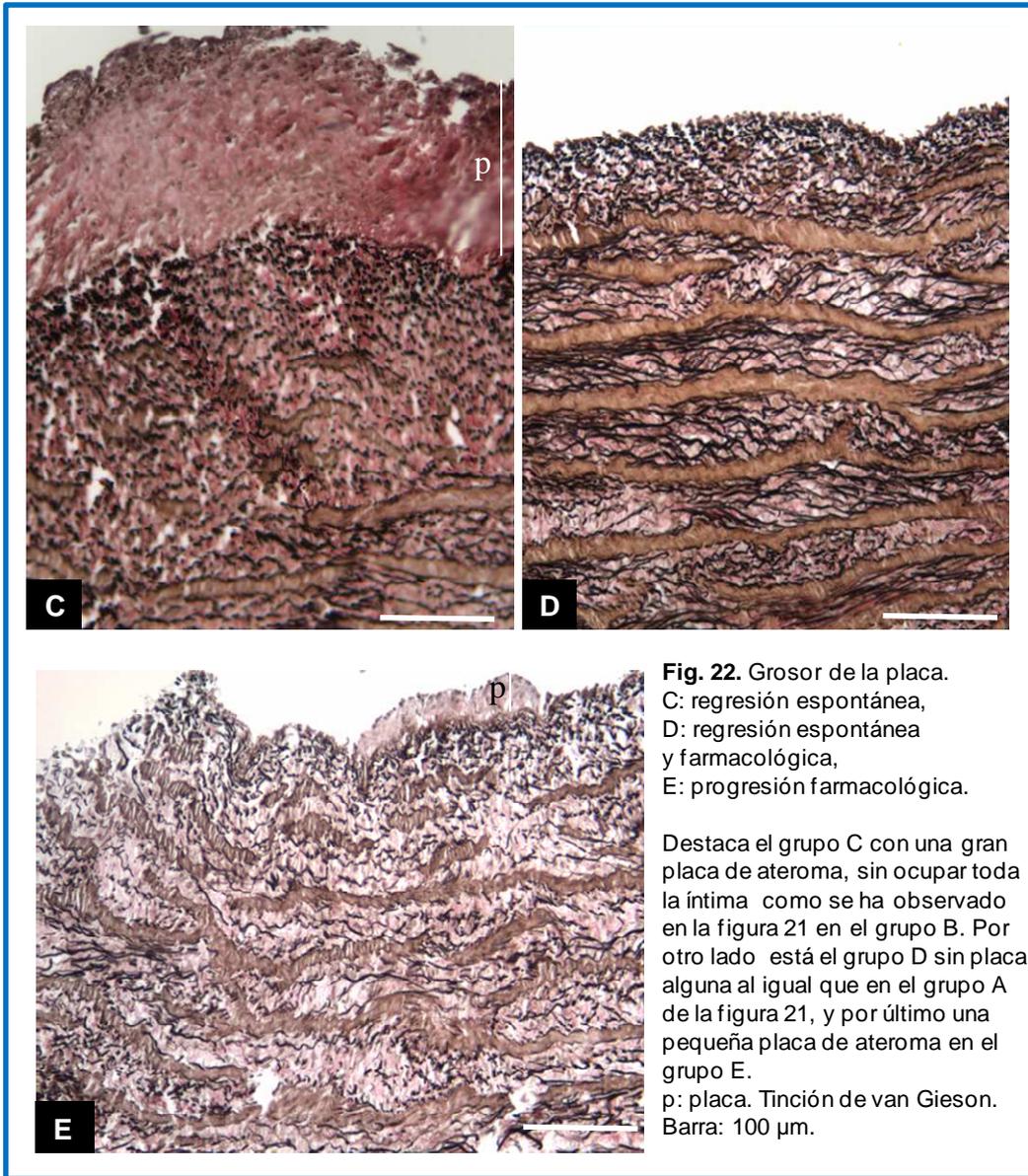
**Fig. 20.** Representación de los valores medios del grosor de la placa de ateroma ( $\mu\text{m}$ ) en cada grupo experimental



Se objetiva una ausencia de placa en el grupo de dieta normal (A), y en contraposición un grupo de progresión con dieta hiperlipémica (B) con las placas de mayor tamaño que ocupan todo el espesor de una capa íntima muy aumentada de grosor, seguido por los grupos de regresión espontánea (C), el grupo de progresión farmacológica (E) y por último, el grupo de regresión espontánea y farmacológica con atorvastatina (D) con pequeñas placas de ateroma en alguna muestra.

En las figuras 21 y 22, se muestran imágenes de las placas de ateroma de los distintos grupos experimentales, llamando la atención la gran placa de ateroma del grupo de dieta hiperlipémica (B).





#### 7.4.4. Valoración de la neoíntima

La valoración de la neoíntima, se ha realizado por medio de la detección de  $\alpha$ -actina mediante técnicas inmunocitoquímicas, con la medida de tres parámetros:

- El grosor del depósito de  $\alpha$ -actina subendotelial.
- La densidad de volumen de  $\alpha$ -actina (Vv).
- La cuantificación de  $\alpha$ -actina considerando densidad de volumen e intensidad de inmunorreactividad.

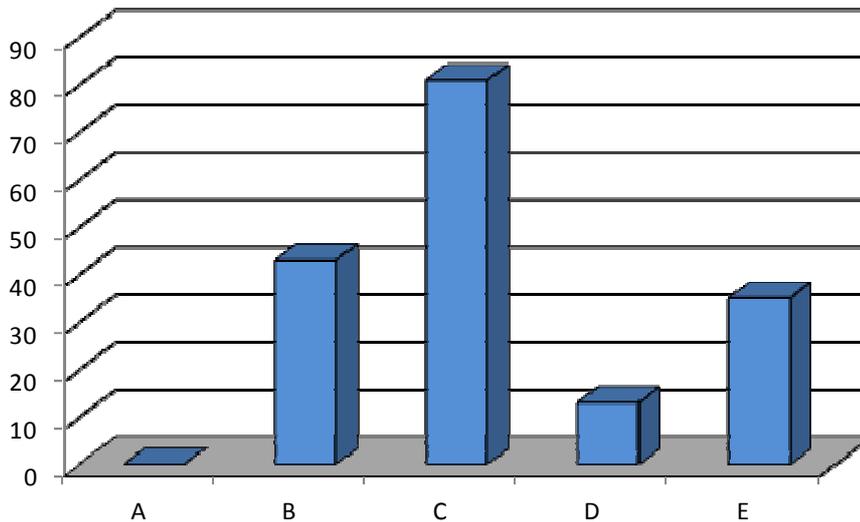
En primer lugar, en cuanto a la valoración del grosor de la  $\alpha$ -actina subendotelial, en la tabla 18 y en la figura 23, se representan los resultados tras aplicar las pruebas de Welch y la prueba de Games-Howell de comparaciones múltiples.

**Tabla 18.** Grosor de la  $\alpha$ -actina subendotelial

Grupo	Grosor ( $\mu\text{m}$ )	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b,d</sup>	43.28 $\pm$ 3.18	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>b</sup>	81.87 $\pm$ 14.99	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>c</sup>	13.24 $\pm$ 2.73	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>d</sup>	35.42 $\pm$ 4.33	Progresión farmacológica

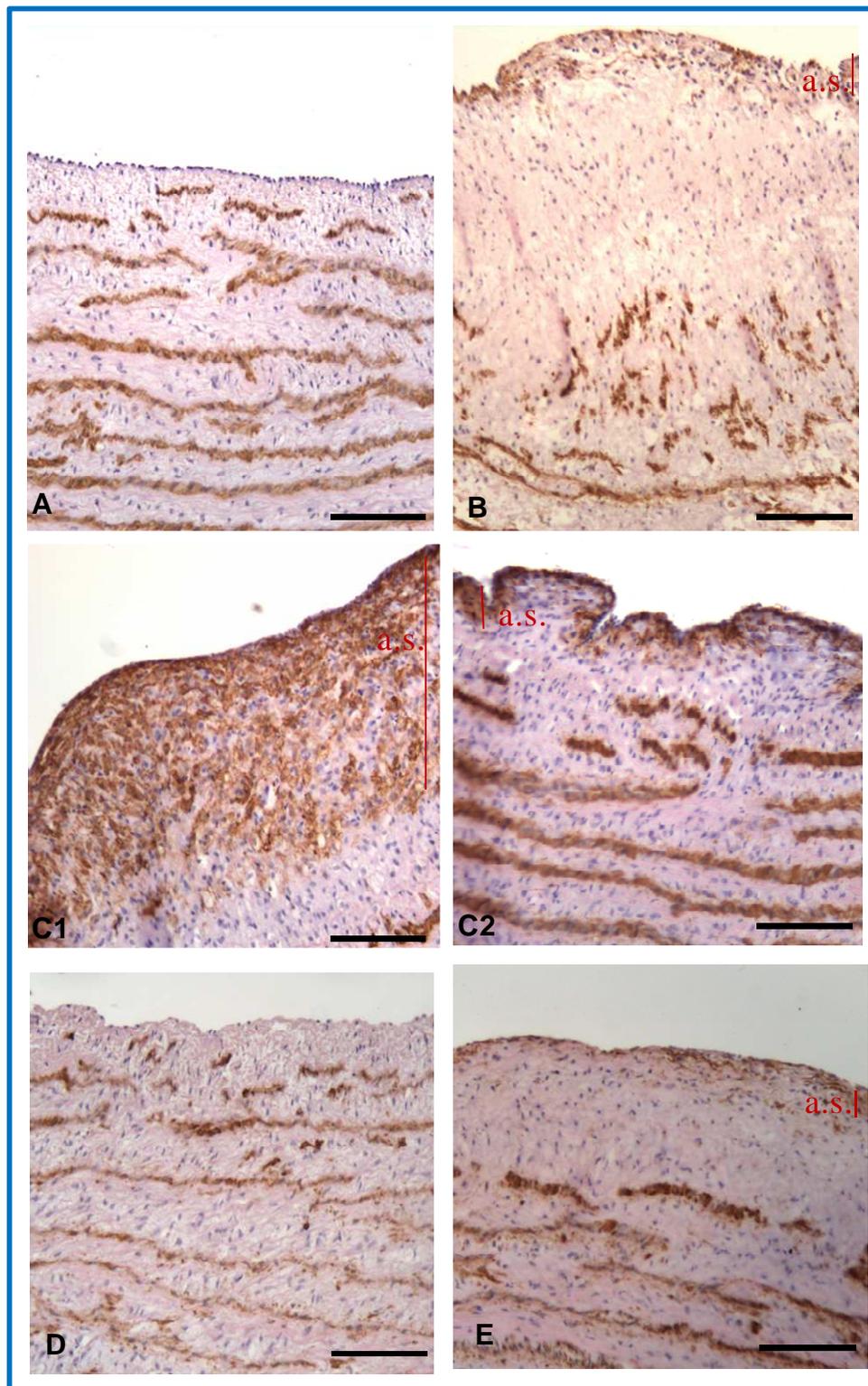
Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para n = 40 por grupo experimental. Prueba estadística de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 23.** Representación de los valores medios del grosor de actina subendotelial ( $\mu\text{m}$ )



Se observa un mayor grosor de la  $\alpha$ -actina subendotelial en el grupo de regresión espontánea (C), seguido por el grupo de dieta hiperlipémica (B) sin diferencia estadísticamente significativa. Posteriormente le siguen el grupo de progresión farmacológica (E), que sí se diferencia estadísticamente con respecto al grupo de regresión espontánea (C) pero no con respecto al grupo de dieta hiperlipémica (B); y por último el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) y el grupo control con dieta normal (A), donde no se observa depósito alguno de actina subendotelial, con diferencia estadísticamente significativa con respecto al resto de los grupos.

Así, en la figura 24 se muestran imágenes del depósito de  $\alpha$ -actina subendotelial en los diferentes grupos de experimentación, con un mayor grosor en el grupo de regresión espontánea (C).



**Fig. 24.** Grosor de  $\alpha$ -actina subendotelial. A: control sano, B: dieta hiperlipémica, C: regresión espontánea, D: regresión espontánea y farmacológica, E: progresión farmacológica. Llama la atención el gran depósito subendotelial de fibras musculares en algunas muestras del grupo C, como se observa en C1. a.s.: actina subendotelial. Inmunocitoquímica con  $\alpha$ -actina. Barra: 100  $\mu$ m.

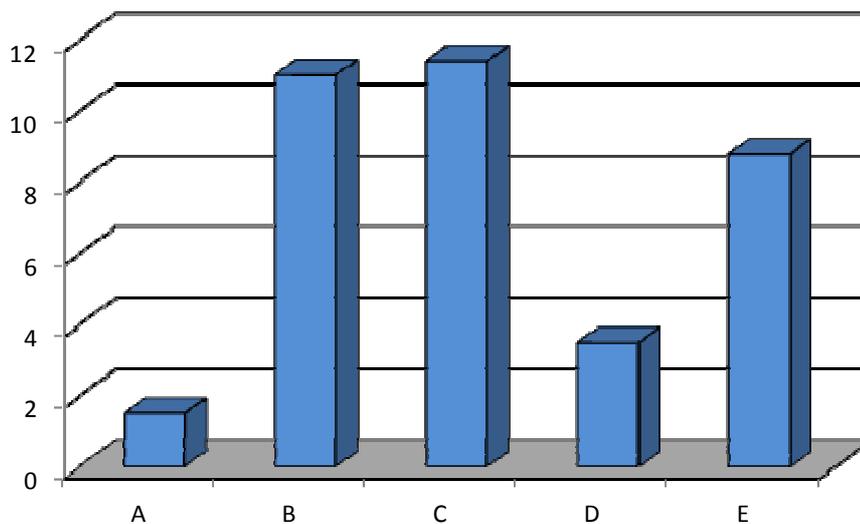
En segundo lugar, se ha obtenido la densidad de volumen de  $\alpha$ -actina "Vv", siendo  $Vv = Aa = \text{área de } \alpha\text{-actina} / \text{área de referencia en la capa íntima}$ . En la tabla 19 y figura 25, se representan los resultados tras aplicar las pruebas de Welch y de Games-Howell de comparaciones múltiples.

**Tabla 19.** Densidad de volumen de  $\alpha$ -actina (Vv)

Grupo	Vv (%)	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	1.50 $\pm$ 0.0	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	11.00 $\pm$ 1.2	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>b</sup>	11.40 $\pm$ 1.7	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>c</sup>	3.50 $\pm$ 0.4	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>b</sup>	8.80 $\pm$ 1.1	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para  $n = 20$  por grupo experimental. Prueba estadística de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 25.** Representación de los valores medios de la densidad de volumen de  $\alpha$ -actina (Vv, %) en cada grupo experimental



Se observa un mayor depósito de  $\alpha$ -actina, y por tanto de fibras musculares lisas en la capa íntima, en los grupos de progresión con dieta hiperlipémica (B), regresión espontánea (C) y progresión farmacológica (E) sin diferencia estadísticamente significativa entre ellos, pero sí con respecto a los dos grupos restantes, el grupo de dieta normal (A) sin apenas depósito de  $\alpha$ -actina y el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) en el que se demuestra una leve presencia de fibras musculares lisas en el espesor de la capa íntima, con una diferencia estadísticamente significativa con todos los grupos.

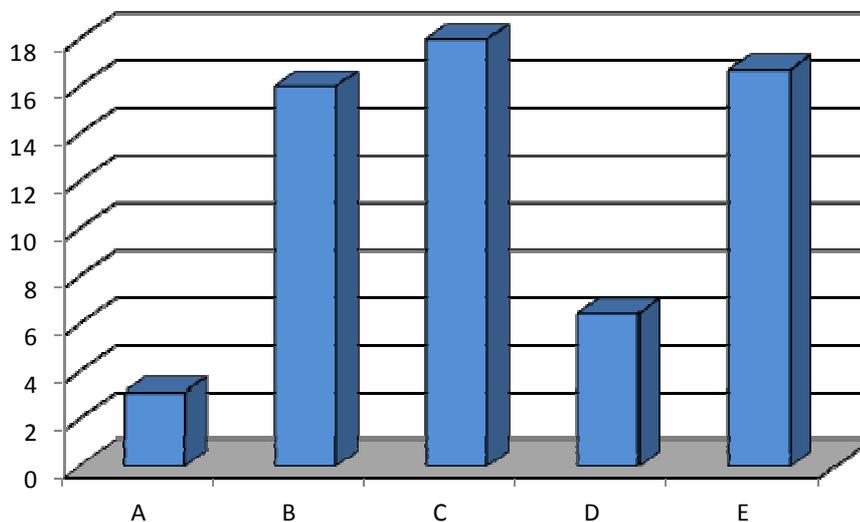
Y por último en tercer lugar, se ha podido cuantificar la cantidad de depósito de fibras musculares lisas, lo que se ha denominado “densidad integrada de  $\alpha$ -actina”, teniendo en cuenta el área y la intensidad del color en el área de la  $\alpha$ -actina en el grosor de la capa íntima (Aa x gris invertido). Los resultados se representan en la tabla 20 y en la figura 26, tras aplicar la prueba de Welch y la prueba de Games-Howell de comparaciones múltiples.

**Tabla 20.** Densidad integrada de  $\alpha$ -actina (DIA=Aa x gris invertido)

Grupo	DIA	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	3.11 ± 0.39	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	16.01 ± 1.78	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>b</sup>	17.99 ± 2.42	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>c</sup>	6.46 ± 0.69	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>b</sup>	16.72 ± 2.13	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media ± error típico, para n = 20 por grupo experimental. Prueba estadística de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los grupos.

**Fig. 26.** Representación de los valores medios de densidad integrada de  $\alpha$ -actina (DIA) para cada grupo experimental



Con la cuantificación de la  $\alpha$ -actina teniendo en cuenta el % de área e intensidad de inmunorreactividad en la capa íntima, se demuestra un mayor depósito de fibras musculares lisas en los grupos de regresión espontánea (C), progresión farmacológica (E) y en el de dieta hiperlipémica (B), sin una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, pero sí con respecto al grupo de dieta normal (A) sin apenas fibras musculares lisas y con respecto al grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) con un valor mínimo.

#### 7.4.5. Área del vaso

En el área del vaso se han realizado tres medidas:

- El área de la luz del vaso.
- El área de la íntima (ya comentada previamente en el apartado 7.4.2)
- El área de la pared (área total del vaso – área de la luz).

Con respecto al área de la luz del vaso, tras obtener los resultados se han aplicado las pruebas estadísticas de Welch sin haber diferencias

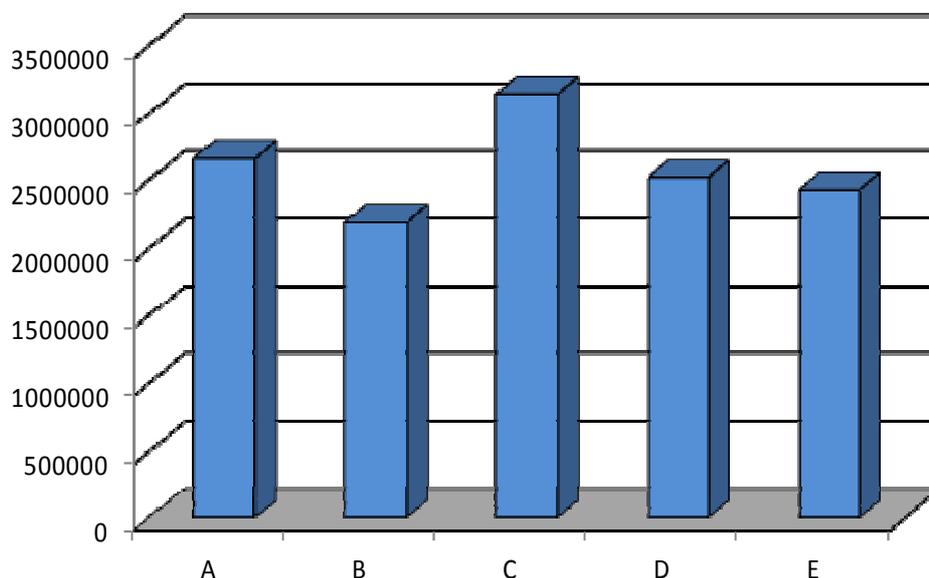
significativas entre los distintos grupos, quedando reflejado en la tabla 21 y figura 27 los resultados.

**Tabla 21.** Área de la luz del vaso

Grupo	Área luz ( $\mu\text{m}^2$ )	Descripción
<b>A<sup>a</sup></b>	2660174.20 $\pm$ 1064291.11	Control con dieta normal
<b>B<sup>a</sup></b>	2191827.07 $\pm$ 1602252.04	Dieta hiperlipémica
<b>C<sup>a</sup></b>	3142808.70 $\pm$ 1239561.18	Regresión espontánea
<b>D<sup>a</sup></b>	2517403.74 $\pm$ 1152778.00	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E<sup>a</sup></b>	2423631.46 $\pm$ 780797.62	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para n = 20 por grupo experimental. Prueba de Welch. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 27.** Representación de los valores medios del área de la luz del vaso ( $\mu\text{m}^2$ ) en cada grupo experimental

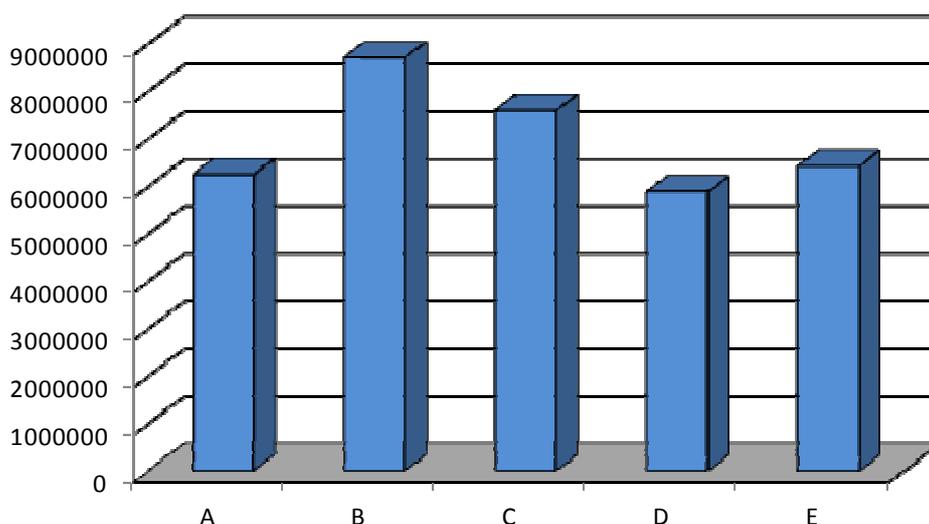


Posteriormente quedan reflejados los resultados del área de la pared del vaso, en la tabla 22 y figura 28, tras aplicar las pruebas de Welch y Games-Howell.

**Tabla 22.** Área de la pared del vaso

Grupo	Área pared ( $\mu\text{m}^2$ )	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	6242367.02 $\pm$ 1398464.85	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	8701470.62 $\pm$ 2286611.75	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>b,c</sup>	7586602.11 $\pm$ 1296653.37	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>a</sup>	5882808.14 $\pm$ 1403334.51	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>a,c</sup>	6415913.90 $\pm$ 1245795.38	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para n = 20 por grupo experimental. Prueba de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 28.** Representación de los valores medios del área de la pared del vaso ( $\mu\text{m}^2$ ) en cada grupo experimental

Los mayores valores del área de la pared del vaso se observan en el grupo de dieta hiperlipémica (B), seguido del grupo de regresión espontánea (C), sin diferencia significativa entre ellos, pero sí con el resto de grupos, a excepción del grupo C con el grupo E. Un valor intermedio lo encontramos en el grupo de progresión farmacológica (E) y por último los menores valores se encuentran en el grupo de dieta normal (A) y regresión espontánea y farmacológica (D).

#### 7.4.6. Diámetro del vaso, máximo o externo

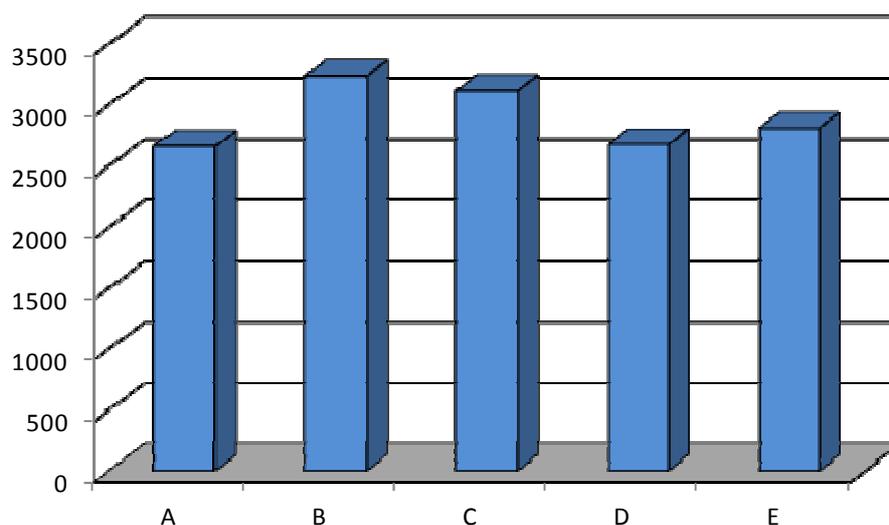
De todos los grupos experimentales se ha medido el diámetro del vaso, correspondiente al diámetro máximo o externo, así en la tabla 23 y figura 29 se representan los resultados tras aplicar las pruebas de Anova y mínimas diferencias significativas (DMS) de comparaciones múltiples.

**Tabla 23.** Diámetro del vaso, máximo o externo

Grupo	Diámetro del vaso ( $\mu\text{m}$ )	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	2660.00 $\pm$ 745.75	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	3235.00 $\pm$ 927.75	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>b,c</sup>	3118.54 $\pm$ 853.30	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>a</sup>	2674.24 $\pm$ 899.11	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>a,c</sup>	2805.82 $\pm$ 855.38	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para n = 50 por grupo experimental. Prueba de Anova y DMS. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 29.** Representación de los valores medios del diámetro del vaso, máximo o externo ( $\mu\text{m}$ ) de cada grupo experimental



Del mismo modo que ocurre con los valores del área de la pared del vaso encontramos el mismo patrón de resultados en el diámetro máximo del vaso.

#### 7.4.7. Diámetro de la luz, mínimo o interno

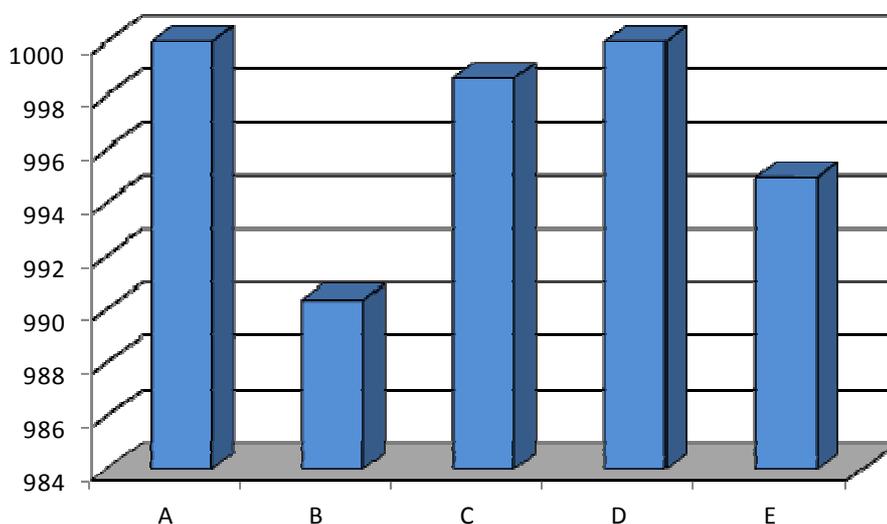
El diámetro de la luz, corresponde al diámetro mínimo o interno, reflejado en la tabla 24 y figura 30 tras analizarlo estadísticamente con la prueba de Welch, sin haber diferencias significativas entre los distintos grupos.

**Tabla 24.** Diámetro de la luz, mínimo o interno

Grupo	Diámetro de la luz ( $\mu\text{m}$ )	Descripción
<b>A<sup>a</sup></b>	1000.00 $\pm$ 0.00	Control con dieta normal
<b>B<sup>a</sup></b>	990.33 $\pm$ 39.53	Dieta hiperlipémica
<b>C<sup>a</sup></b>	998.64 $\pm$ 7.93	Regresión espontánea
<b>D<sup>a</sup></b>	1000.00 $\pm$ 0.00	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E<sup>a</sup></b>	994.93 $\pm$ 26.52	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para  $n = 50$  por grupo experimental. Prueba de Welch. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 30.** Representación de los valores medios del diámetro de la luz, mínimo o interno ( $\mu\text{m}$ ) de cada grupo experimental



#### 7.4.8. Grosor de la pared

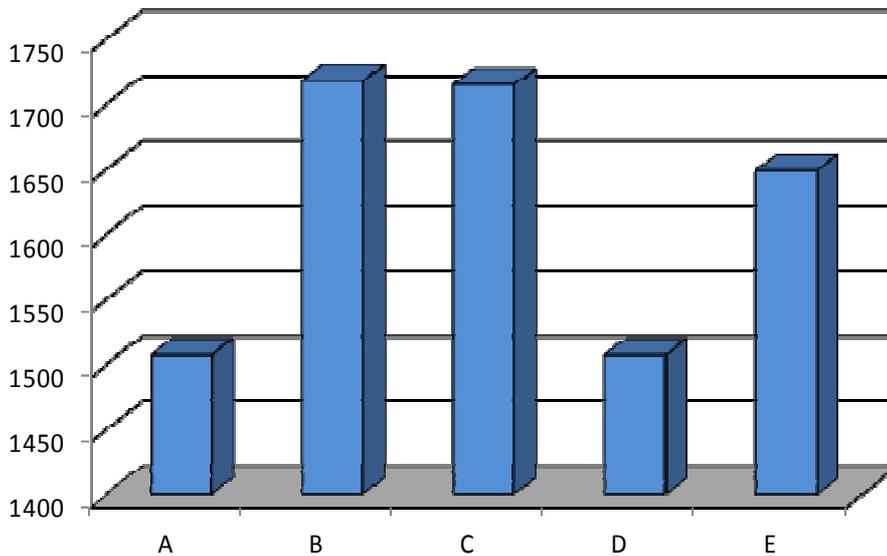
Tras medir el diámetro del vaso y restarle el diámetro de la luz, obtenemos el grosor de la pared de los distintos grupos de experimentación. Se le ha aplicado las pruebas estadísticas de Welch y las comparaciones dos a dos de Games-Howell. En la tabla 25 y figura 31 se representa el resultado. Por un lado se observa un mayor grosor de la pared en los grupos de dieta hiperlipémica (B), regresión espontánea (C) y progresión farmacológica (E), sin diferencia estadística entre ellos, pero a su vez con diferencia estadística en comparación a los grupos de menor grosor, como son el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) y dieta normal (A), que son similares entre ellos y a su vez con el grupo de progresión farmacológica (E), que está en posición intermedia.

**Tabla 25.** Grosor de la pared

<b>Grupo</b>	<b>Grosor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Descripción</b>
<b>A<sup>a</sup></b>	1507 $\pm$ 45.21	Control con dieta normal
<b>B<sup>b</sup></b>	1718 $\pm$ 39.32	Dieta hiperlipémica
<b>C<sup>b</sup></b>	1715 $\pm$ 40.69	Regresión espontánea
<b>D<sup>a</sup></b>	1508 $\pm$ 65.71	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E<sup>b,a</sup></b>	1649 $\pm$ 87.28	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para n = 50 por grupo experimental. Prueba de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**Fig. 31.** Representación de los valores medios del grosor de la pared ( $\mu\text{m}$ ) de cada grupo experimental



#### 7.4.9. Grado de oclusión del vaso

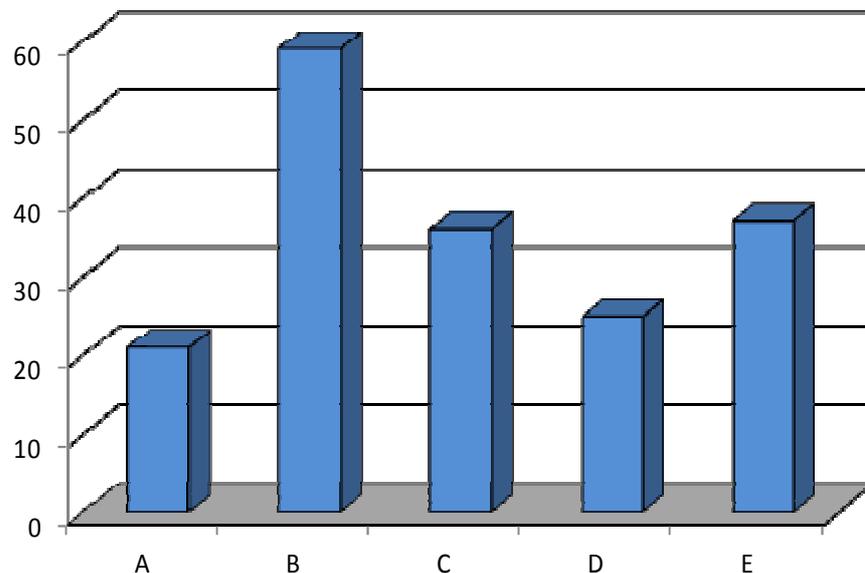
Los resultados se muestran en la tabla 26 y en la figura 32. Se ha aplicado la prueba de Welch y las comparaciones dos a dos de Games-Howell.

**Tabla 26.** Grado de oclusión del vaso

Grupo	Grado oclusión (%)	Descripción
<b>A<sup>a</sup></b>	21 $\pm$ 0.8	Control con dieta normal
<b>B<sup>b</sup></b>	59 $\pm$ 3.5	Dieta hiperlipémica
<b>C<sup>c,d</sup></b>	36 $\pm$ 3.4	Regresión espontánea
<b>D<sup>a,d</sup></b>	25 $\pm$ 2.4	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E<sup>c</sup></b>	37 $\pm$ 3	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para  $n = 20$  por grupo experimental. Prueba estadística de Welch y Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

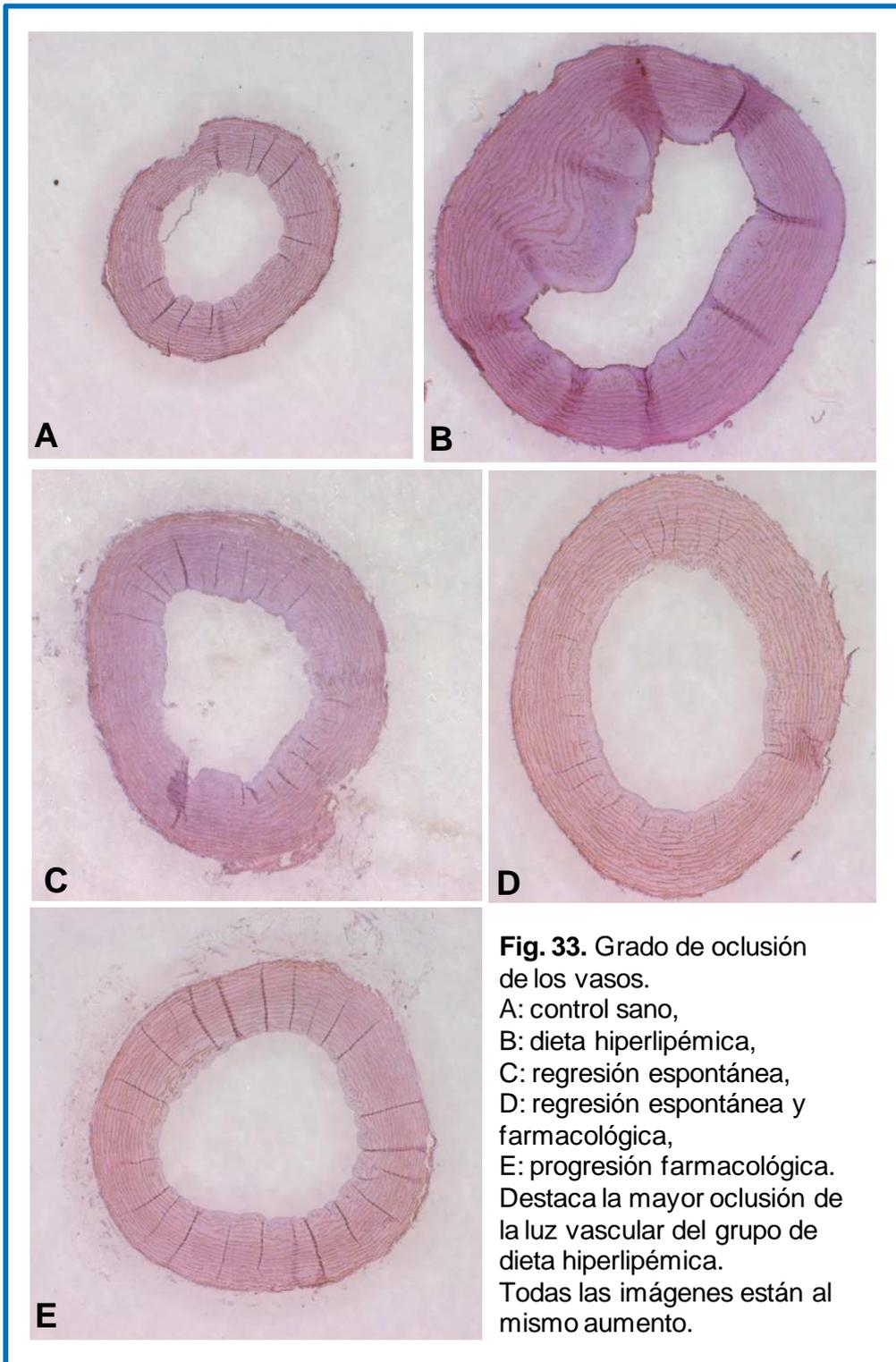
**Fig. 32.** Representación de los valores medios del grado de oclusión del vaso (%) de cada grupo experimental



Destaca el mayor grado de oclusión de la luz arterial en el grupo con dieta hiperlipémica (B), con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al resto de los grupos. En un grado intermedio se encuentran el grupo de regresión espontánea (C) y el grupo de progresión farmacológica (E), sin diferencias significativas entre ambos.

Por último, la menor oclusión observada se encuentra en el grupo con dieta normal (A), sin diferencias con respecto al grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), siendo ambos similares, y éste último a su vez tampoco se diferencia con respecto al grupo C (grupo de regresión espontánea).

En la figura 33 podemos observar las imágenes del grado de oclusión de la luz vascular de los grupos de experimentación, destacando el grupo de dieta hiperlipémica con un mayor grado de oclusión.



**Fig. 33.** Grado de oclusión de los vasos.  
A: control sano,  
B: dieta hiperlipémica,  
C: regresión espontánea,  
D: regresión espontánea y farmacológica,  
E: progresión farmacológica.  
Destaca la mayor oclusión de la luz vascular del grupo de dieta hiperlipémica.  
Todas las imágenes están al mismo aumento.

#### 7.4.10. Relación pared/luz

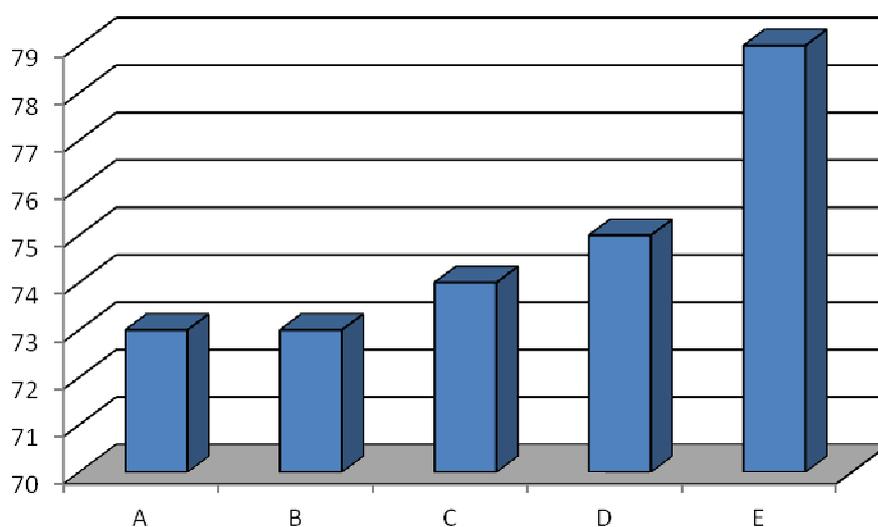
Los datos de la relación pared luz se obtienen con el cociente del grosor de la pared y el diámetro de la luz. Tras aplicar la prueba de homogeneidad de varianzas, se acepta que hay homogeneidad en los resultados obtenidos. En la tabla 27 y en la figura 34 se reflejan los resultados.

**Tabla 27.** Relación pared/luz

Grupo	Relación pared/Luz	Descripción
<b>A<sup>a</sup></b>	0.73 ± 0.03	Control con dieta normal
<b>B<sup>a</sup></b>	0.73 ± 0.05	Dieta hiperlipémica
<b>C<sup>a</sup></b>	0.74 ± 0.03	Regresión espontánea
<b>D<sup>a</sup></b>	0.75 ± 0.04	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E<sup>a</sup></b>	0.79 ± 0.03	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media ± error típico, para n = 20 por grupo experimental. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los grupos.

**Fig. 34.** Representación de los valores medios de la relación pared/luz en cada grupo experimental



Según los datos obtenidos no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos del estudio, la relación pared/luz se mantiene constante tanto en el grupo control con dieta normal (A), como en el de dieta hiperlipémica (B), regresión espontánea (C), regresión espontánea y farmacológica (D), y en el de progresión farmacológica (E).

#### 7.4.11. Coeficiente aterogénico (CA)

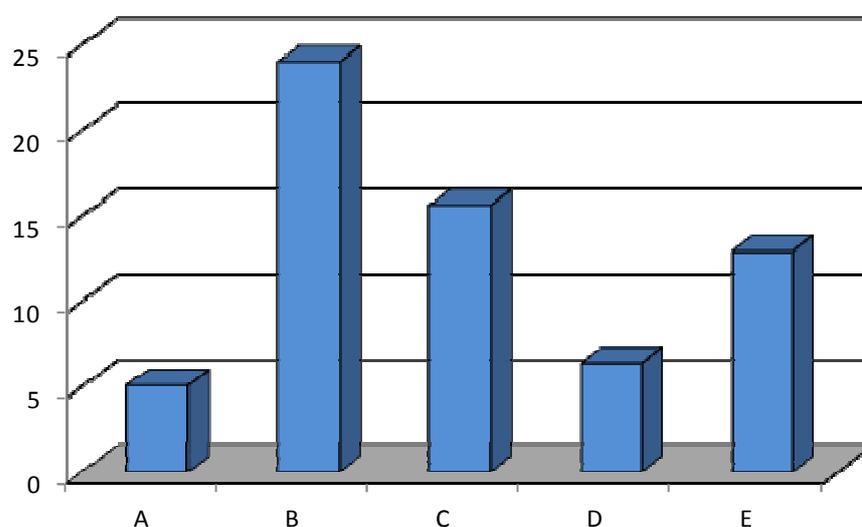
El coeficiente aterogénico se obtuvo a partir del sumatorio de las puntuaciones otorgadas a cada muestra en los siguientes parámetros, según los criterios indicados en material y métodos (apartado 6.9, tabla 8): valor semicuantitativo de los grados modificados de Stary, el grosor de la capa media, el grosor de la capa íntima, el grosor de la placa de ateroma, el grosor de  $\alpha$ -actina subendotelial, la densidad de volumen de  $\alpha$ -actina, la densidad integrada de  $\alpha$ -actina, el grosor de la pared, el grado de oclusión del vaso y la relación pared/luz, obteniendo un índice denominado “coeficiente aterogénico”, medido en los distintos grupos, cuyos resultados se indican en la tabla 28 y figura 35.

**Tabla 28.** Coeficiente aterogénico (CA)

Grupo	CA	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	5.07 ± 0.26	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	24.02 ± 0.63	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>c</sup>	15.62 ± 0.84	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>a</sup>	6.37 ± 0.43	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>c</sup>	12.90 ± 0.56	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media ± error típico, para n = 20 por grupo experimental. Prueba estadística de Games-Howell. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los grupos.

**Fig. 35.** Representación de los valores medios del coeficiente aterogénico en cada grupo experimental



Destaca un menor coeficiente aterogénico en el grupo con dieta normal (A) estadísticamente significativo con respecto al resto de grupos, excepto con el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), el cuál es muy similar al grupo control. Por otro lado, llama la atención en el otro extremo, un mayor coeficiente aterogénico en el grupo con dieta hiperlipémica (B), estadísticamente significativo con respecto a todos los grupos. En un grado intermedio de afectación, se observa a los grupos de regresión espontánea (C) y de progresión farmacológica (E), sin diferencias significativas entre ambos, pero sí con el resto de los grupos.

#### **7.4.12. Comparación del coeficiente aterogénico y el índice de actividad de la esteatohepatitis no alcohólica (NAS)**

Se compara el resultado del coeficiente aterogénico (CA) en los troncos supra-aórticos en los distintos grupos experimentales, con el resultado del índice de actividad de la esteatohepatitis no alcohólica (NAS) obtenido en el estudio del hígado en los mismos grupos experimentales (Martín Castillo A, 2008). El NAS, como se ha comentado previamente en el capítulo dos, tiene una escala con una puntuación que va desde 0 al 8: si

es  $\leq 2$  (no diagnóstico de EHNA), entre 3-4 (dudoso diagnóstico de EHNA) y  $\geq 5$  (EHNA probable o definitiva) (Kleiner y col., 2005).

Así en nuestro grupo de investigación, Martín Castillo (2008), estimó el NAS-cuantitativo de los mismos grupos de animales; cuyos resultados se muestran en la tabla 29.

**Tabla 29.** Resultados de los valores NAS en las muestras hepáticas en cada grupo experimental (Martín Castillo, 2008)

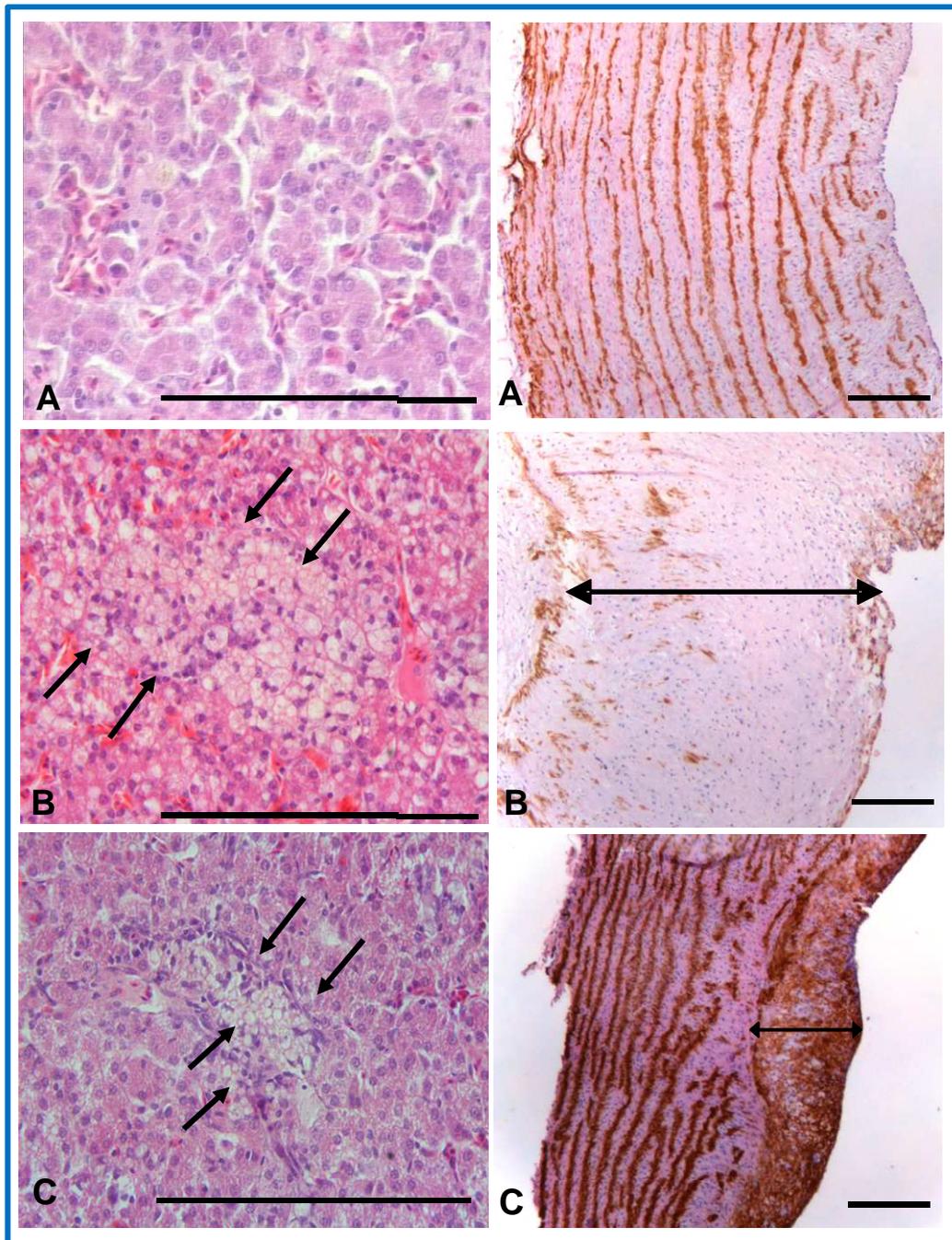
Grupo	NAS-cuantitativo	Descripción
<b>A</b> <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00	Control con dieta normal
<b>B</b> <sup>b</sup>	7.13 $\pm$ 0.12	Dieta hiperlipémica
<b>C</b> <sup>c</sup>	2.90 $\pm$ 0.14	Regresión espontánea
<b>D</b> <sup>d</sup>	1.83 $\pm$ 0.11	Regresión espontánea y farmacológica
<b>E</b> <sup>e</sup>	4.58 $\pm$ 0.16	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media  $\pm$  error típico, para n = 100 por grupo experimental. Pruebas estadísticas de Anova y Bonferroni. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos. Rango de valores 0-8.

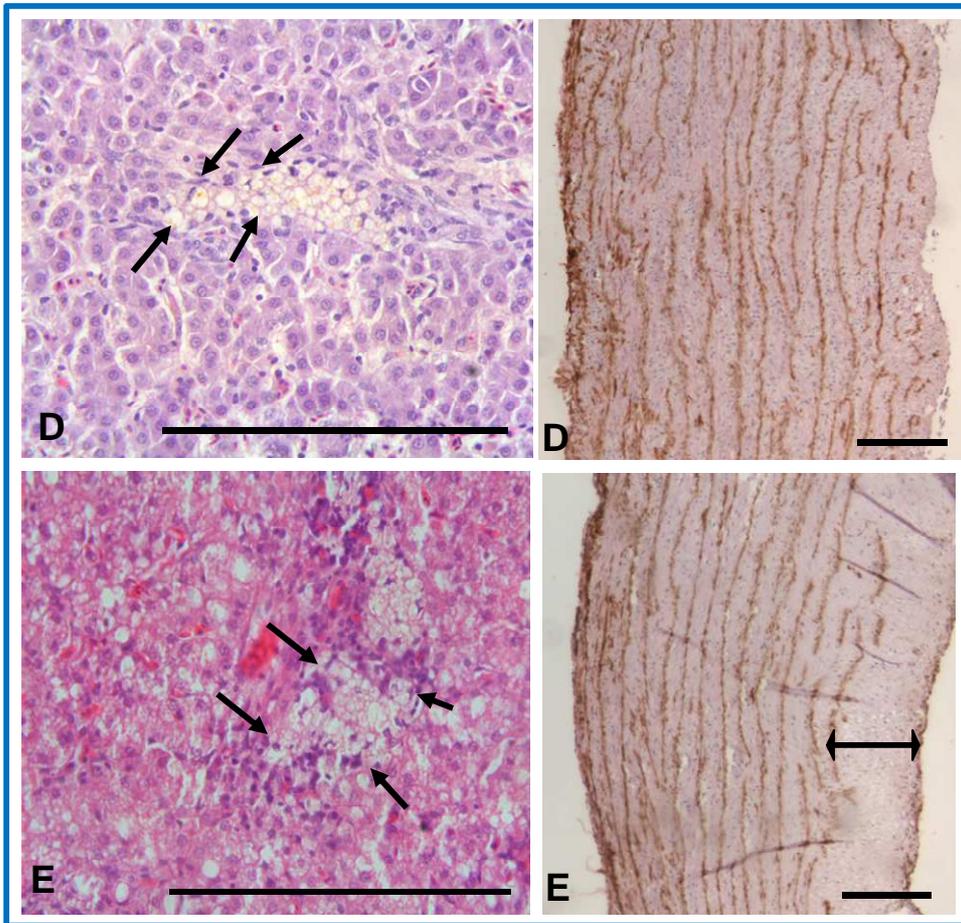
El índice de actividad de la enfermedad o NAS-cuantitativo fue mayor en el grupo de dieta hiperlipémica (B), seguido del grupo de progresión farmacológica (E), del grupo de regresión espontánea (C), del grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) y por último del grupo de dieta normal (A), con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre todos los grupos.

En conjunto, se constata un mayor grado de NAS en los grupos de progresión (B y E) respecto a los de regresión con retirada de la dieta hiperlipémica (C y D).

Las figuras 36 y 37 muestran imágenes representativas de parénquima hepático (Martín Castillo, 2008) y de los troncos supra-aórticos en los diferentes grupos experimentales.



**Fig. 36.** Imágenes representativas de hígado y troncos supra-aórticos en los diferentes grupos experimentales. A: control sano, B: dieta hiperlipémica, C: regresión espontánea. Se observa una histología normal en parénquima hepático y troncos en el grupo A. Destaca el gran tamaño de los depósitos de grasa en el parénquima hepático y se correlaciona con un gran tamaño de placa de ateroma en los troncos en el grupo B. Los depósitos de grasa en el parénquima hepático son de menor tamaño, igual ocurre con el espesor de la placa de ateroma en el grupo C. Hígado: hematoxilina-eosina. Las flechas indican los depósitos grasos. Troncos supra-aórticos: inmunocitoquímica con  $\alpha$ -actina. Las flechas indican la placa de ateroma. Barra: 200  $\mu$ m.



**Fig. 37.** Imágenes representativas de hígado y troncos supra-aórticos en los diferentes grupos experimentales. D: regresión espontánea y farmacológica, E: progresión farmacológica. Se observa una reducción en el tamaño de los depósitos grasos en el parénquima hepático, asimismo los troncos supra-aórticos presenta una menor afectación en el grupo D. En el grupo E, los depósitos de grasa son de mayor tamaño en hígado y la placa de ateroma muestra un espesor menor que en el grupo B. Hígado: hematoxilina-eosina. Las flechas indican los depósitos grasos. Troncos supra-aórticos: inmunocitoquímica con  $\alpha$ -actina. Las flechas indican la placa de ateroma. Barra: 200  $\mu$ m.

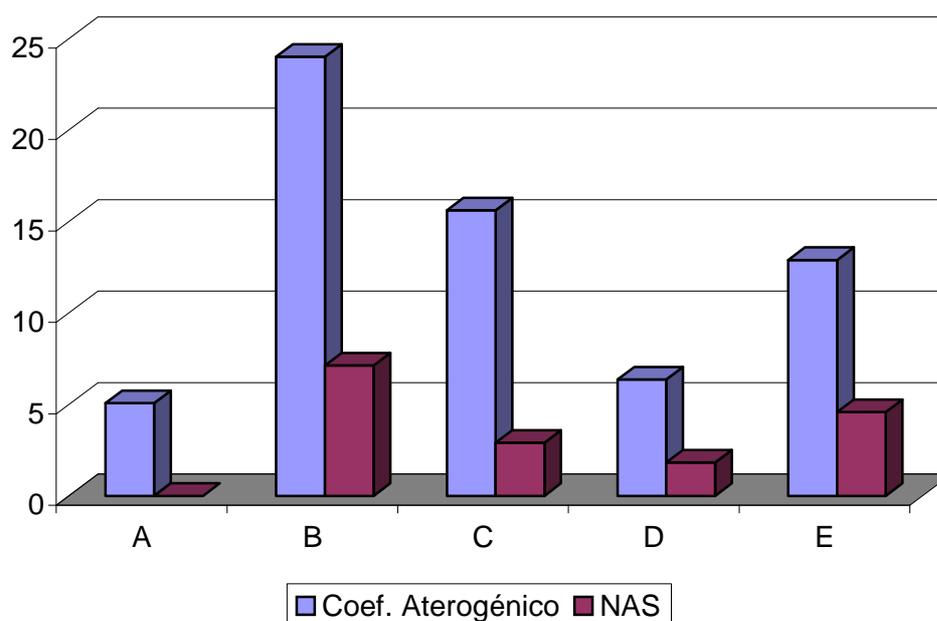
En la tabla 30 y en la figura 38, se comparan ambos parámetros, la afectación de los troncos supra-aórticos con el coeficiente aterogénico (CA) y la afectación hepática con el NAS, entre los distintos grupos experimentales.

**Tabla 30.** Comparación entre los valores medios del CA y el NAS en cada grupo experimental

Grupo	CA	NAS	Descripción
A	5.07 ± 0.26	0.00 ± 0.00	Control con dieta normal
B	24.02 ± 0.63	7.13 ± 0.12	Dieta hiperlipémica
C	15.62 ± 0.84	2.90 ± 0.14	Regresión espontánea
D	6.37 ± 0.43	1.83 ± 0.11	Regresión espontánea y farmacológica
E	12.90 ± 0.56	4.58 ± 0.16	Progresión farmacológica

Los valores se expresan como media ± error típico, para n = 20 por grupo experimental en el coeficiente aterogénico y para n=100 en el NAS (rango de valores 0-8).

**Fig. 38.** Representación de los valores medios del coeficiente aterogénico y NAS



En ambos índices, en el coeficiente aterogénico (afectación vascular) y en el NAS (afectación hepática), los grupos menos afectados son el grupo control con dieta normal (A) y el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D). En el extremo contrario, ambos índices tienen un mayor nivel de afectación en el grupo de dieta hiperlipémica (B).

En un estadio intermedio, se encuentran el grupo de regresión espontánea (C) y el de progresión farmacológica (E), siendo la afectación vascular algo más acusada en el grupo C, mientras que a nivel hepático es el grupo E, grupo en el que se mantiene la dieta de colesterol junto con el fármaco (atorvastatina).

Calculamos el coeficiente de correlación de Pearson a los datos obtenidos de ambas variables cuantitativas, con el fin de medir la posible asociación lineal entre los dos parámetros (CA y NAS) en los distintos grupos experimentales, se analiza cada grupo por separado y en conjunto. Los datos de cada grupo por separado se muestran en la tabla 31.

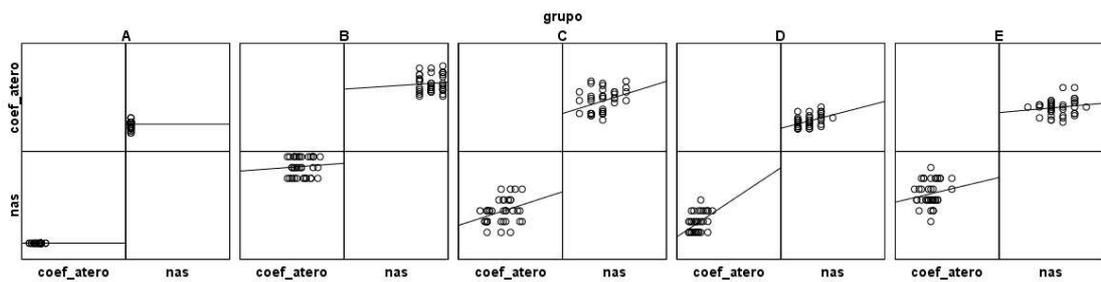
**Tabla 31.** Comparación entre los valores medios del CA y el NAS en cada grupo experimental. Correlación de Pearson (r)

Grupo	B	C	D	E
	NAS	NAS	NAS	NAS
CA	r=0.076 p=0.641	r=0.343 p=0.03 *	r=0.448 p=0.04*	r=0.159 p=0.328

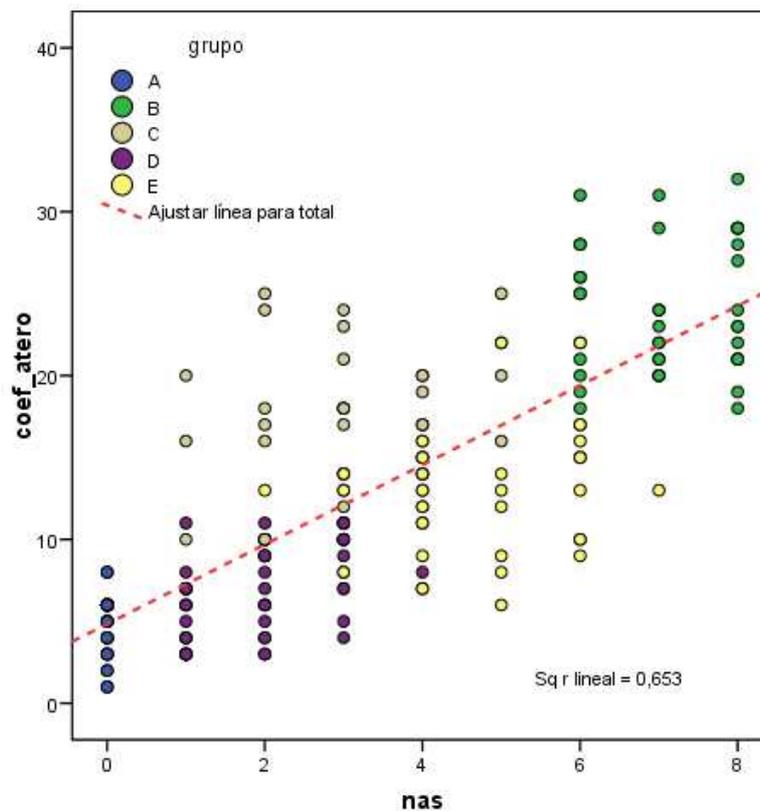
\*Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

No hay correlación en el grupo A dado el valor de NAS constante. No se observa correlación entre CA y NAS en los grupos B ( $p > 0.05$ ) y E ( $p > 0.05$ ). Mientras que sí se encuentra correlación entre ambos parámetros en los grupos C ( $r = 0.343$ ,  $p < 0.05$ ) y D ( $r = 0.448$ ,  $p < 0.05$ ).

La correlación se indica gráficamente por la pendiente de la recta (fig 39). Se observa una pendiente positiva en las representaciones de los grupos C y D. Los grupos B y E, según los datos obtenidos, no presentan diferencia estadísticamente significativa, por tanto no se pueden sacar conclusiones al respecto de su asociación de ambas variables en estos grupos, considerando cada grupo por separado.

**Fig 39.** Diagrama de dispersión (CA, NAS) para cada grupo experimental.

Por otro lado, considerando en conjunto todos los grupos como una misma población se obtiene una correlación de Pearson muy alta ( $r=0.808$ ,  $p<0.01$ ) entre CA y NAS. Su representación gráfica en conjunto se muestra en la figura 40.

**Fig 40.** Diagrama de dispersión de todas las observaciones (CA, NAS) en el conjunto de todos los grupos



## **Capítulo 8**

### **DISCUSIÓN**



### 8.1. Modelo animal

El pollo, al igual que otras aves, es capaz de desarrollar arteriosclerosis aórtica y coronaria de forma natural o espontánea, e inducida por una dieta enriquecida en colesterol, hecho descrito por primera vez de forma detallada por Dauber y Katz (1943). Las aves están pues entre los primeros modelos animales de arteriosclerosis que han sido estudiados con una gran contribución al conocimiento morfológico y bioquímico del proceso de la arteriosclerosis.

Horlick y Katz, en 1949, diseñaron en pollos el primer estudio de regresión de la arteriosclerosis, demostrando que los fenómenos de regresión en los pollos son más rápidos que en el conejo, ya que en éstos se precisan de 3 a 4 meses para una recuperación de los niveles plasmáticos de colesterol tras la retirada de la dieta aterogénica y de 3 a 4 años para la regresión respecto a los 4-6 meses en el pollo.

De todos estos trabajos realizados desde los años cuarenta a los setenta por diversos autores y en concreto por Wong, (1975) en pollos, le permite publicar su clásico trabajo "The cockerel as an animal model for atherosclerosis research" destacando este modelo por ser:

1. Un animal omnívoro.
2. Pequeño, barato y de fácil manejo para la investigación de laboratorio prolongada.
3. Capaz de desarrollar arteriosclerosis espontánea.
4. Capaz de producir arteriosclerosis con dietas hipercolesterolémicas con un ligero pero significativo incremento del colesterol plasmático.
5. Los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos son similares a los humanos.
6. La composición de las lipoproteínas HDL, LDL y quilomicrones son semejantes a las humanas.

7. No hay diferencias esenciales entre las lesiones vasculares inducidas por la dieta y la arteriosclerosis en humanos. Además son bípedos, hipertensos e hiperglucémicos por naturaleza.

Por todo ello, y a trabajos previos de nuestro grupo de investigación (García Pérez, 1992; Ayala y col., 2003; Ortega y col., 2004) en los que se ha conseguido reproducir eficazmente el proceso de arteriosclerosis en la especie que nos ocupa y demostrar el efecto beneficioso de las estatinas en la regresión de la arteriosclerosis, nos parece el modelo animal más adecuado, y puede proporcionar además una herramienta útil para posteriores estudios.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación (Ayala y col., 2004) ha llevado a cabo trabajos con el objetivo de estandarizar los métodos de inducción de la aterogénesis en este biomodelo aviar, de cara a plantear ensayos con diversos principios activos para conseguir la regresión de las lesiones arterioscleróticas. Se ha llegado a la conclusión que resulta más conveniente el uso de colesterol puro añadido a una dieta estándar que la mezcla a base de huevo, junto con un vehículo como el aceite de palma líquido para facilitar la absorción del colesterol a nivel digestivo, y todo ello administrarse ad libitum.

Posteriormente, Adánez (2006) en su tesis doctoral, valoró el estudio de los cambios histológicos del riñón en pollos sometidos a dieta hiperlipémica, utilizando modelos de progresión, regresión e intervención con atorvastatina; y en 2008, Martín Castillo valoró los acúmulos grasos en hígado en un modelo experimental en pollos, reproduciendo las características histológicas de la EGHNA en humanos, realizando una valoración semicuantitativa y cuantitativa por análisis de imagen, con el fin de determinar los cambios en los depósitos lipídicos y la infiltración inflamatoria, en los mismos modelos de progresión, regresión e intervención con atorvastatina, previos, demostrando la eficacia de la atorvastatina en la disminución de los acúmulos grasos en el hígado tanto en el grupo de progresión como en el de regresión. Con ello se ha

conseguido reproducir una esteatohepatitis en el pollo, como animal de investigación, siendo un modelo de fácil manejo y reproducibilidad de dichas lesiones en un período corto de inducción, pues en la mayoría de los modelos de experimentación se produce fácilmente una esteatosis espontánea, pero el llegar a provocar una esteatohepatitis es difícil (Tous y col., 2005).

En el trabajo actual se ha reproducido eficazmente el proceso de arteriosclerosis en pollos, de raza White Leghorn, con dicha dieta, en troncos supra-aórticos y se ha logrado el efecto beneficioso en cuanto a la reducción de la arteriosclerosis valorada con distintos parámetros que se discuten a continuación, observados en la regresión espontánea con la retirada de la dieta hiperlipémica; la regresión espontánea y farmacológica inducida con la retirada de la dieta hiperlipémica y la administración de una estatina (atorvastatina); y por último en la progresión farmacológica, al continuar con dieta hiperlipémica y dar a su vez la estatina (atorvastatina).

Todos estos trabajos de nuestro grupo de investigación, demuestran que el pollo es un modelo eficaz en la valoración renal, hepática y vascular, reproduciendo las lesiones observadas en humanos.

## **8.2. Análisis bioquímico del plasma**

Con la analítica realizada en ayunas en los distintos grupos experimentales, se comprueba el perfil bioquímico inducido, objetivando una hiperliproteinemia tipo IIb con aumento del colesterol-LDL y de los triglicéridos. El grupo en el cuál se ha observado un aumento importante del colesterol, colesterol-LDL y triglicéridos, es el grupo con dieta hiperlipémica (grupo B), con una diferencia significativa con respecto al resto de grupos, lo que se atribuye al efecto de la dieta y de la atorvastatina.

En estudios previos Elkin y col. (1997), observaron en gallinas de la raza Leghorn disminuciones en los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma de un 63 y 71% respectivamente, administrando atorvastatina. La respuesta fue mayor con atorvastatina que con simvastatina y ésta mayor que con lovastatina.

En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación (Ortega y col., 2002) se demostró en los mismos animales de experimentación, que la atorvastatina a dosis de 3 mg/Kg/día administrada a pollos alimentados con una dieta a base de huevos, producía una reducción significativa de los niveles de colesterol sérico y LDL-colesterol asociado a una disminución del 67% del área relativa de placa arteriosclerosa en aorta respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una reducción de los niveles de lípidos plasmáticos mantenida en el tiempo. Se observan unos niveles de colesterol y triglicéridos más elevados en el grupo alimentado con dieta hiperlipémica (B), con diferencia significativa respecto a los demás grupos.

Por otro lado se demuestra el efecto beneficioso de la atorvastatina unido a la retirada de la dieta hiperlipémica, en el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), siendo el grupo con unos niveles de colesterol y triglicéridos más similar al grupo control con dieta normal (grupo A). Sin embargo, el empleo único de la atorvastatina ha sido insuficiente para normalizar los niveles de colesterol en el grupo de progresión farmacológica (E) alimentado con dieta aterogénica, y la dieta por sí sola tampoco normalizó los niveles de colesterol y triglicéridos en el grupo de regresión espontánea (C), existiendo entre todos los grupos una diferencia estadísticamente significativa.

Las estatinas, inhibidores de la hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) no sólo reducen la producción de colesterol-LDL y triglicéridos en plasma, siendo la atorvastatina la más potente en disminuir los

triglicéridos en plasma más que otras estatinas; sino que por otro lado, se ha puesto de manifiesto que incluso en pacientes con valores de colesterol bajos, son beneficiosas, debido a los denominados efectos pleiotrópicos de las estatinas, con actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora (Blanco-Colio y col., 2004; Badimon y Vilahur, 2011).

Por último, comparando el tratamiento intensivo con estatinas con el tratamiento menos intensivo se observa de forma similar un aumento del beneficio con una mayor disminución de los lípidos. Al comparar las mismas estatinas a diferentes dosis o estatinas más potentes (atorvastatina) con menos potentes, se observa que cuanto más se disminuyen los niveles de colesterol-LDL son mejores los resultados sobre la pared del vaso o la placa (Silleesen, 2010).

En cuanto al grado de inflamación reflejado en el nivel de PCR plasmático, ya demostrado en estudios prospectivos como indicador de inflamación sistémica (Ridker y col., 2002), se observa una cifra más baja en el grupo control con dieta normal (A) estadísticamente significativo con respecto al resto de los grupos de experimentación. En éstos se observa un mayor nivel de PCR en el grupo de dieta hiperlipémica (B), seguido por el grupo de regresión espontánea (C), y por último con igual resultado el grupo de progresión farmacológica (E) y el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), pero sin diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

Por tanto en el grupo control de dieta normal no existe un biomarcador de inflamación, estando presente en el resto de los grupos, tanto en la progresión como en la regresión inducida. Sí se observa una tendencia tanto en el grupo de progresión farmacológica (E) y en el de regresión espontánea y farmacológica (D) a ser menor, lo que nos lleva a pensar que sea poco el tiempo empleado en la fase de intervención, y se necesite más tiempo para que desaparezca el estado de inflamación sistémica. Por otro lado, en estudios previos publicados en humanos se ha observado un descenso mayor de LDL y de los niveles de PCR en el

tratamiento intensivo con estatinas (80 mgr de atorvastatina comparados con un tratamiento moderado con 40 mgr de pravastatina) en pacientes con enfermedad coronaria documentada angiográficamente, junto con una menor progresión del volumen de la placa de ateroma, lo que sugiere una relación entre ambos biomarcadores y la progresión de la enfermedad (Nissen y col., 2005).

Recientemente se ha realizado un estudio que describe el mecanismo implicado en la reducción de las cifras de PCR en humanos, llevado a cabo también con dosis máximas de atorvastatina (80 mgr) frente a placebo, llegando a la conclusión que las dosis máxima de atorvastatina reducen la PCR plasmática al disminuir su vida media de 2.94 días a 2 días por un aumento de su catabolismo, sin modificar su producción (Thongtang y col. 2013).

Según estos estudios, en nuestro modelo animal pueden ocurrir las mismas condiciones, que se necesiten dosis intensivas de atorvastatina para llegar a observar un descenso significativo de la PCR plasmática, lo que abre las puertas a una futura investigación en el modelo animal, o bien se necesite más tiempo para que en los dos grupos tratados con atorvastatina se marque la diferencia de una manera importante tanto para el estudio de la arteriosclerosis como de la esteatohepatitis.

### **8.3. Descripción histológica**

La arteriosclerosis es una compleja enfermedad crónica de la pared vascular, que se inicia en las primeras décadas de la vida, y conduce a la formación de la placa fibrosa, que consiste en una acumulación de material lipídico y proteoglicanos, elementos celulares, tejido fibroso y depósitos de calcio. En todo este proceso, la disfunción endotelial constituye el paso patológico más precoz, al estar implicado en la atracción de células inflamatorias hacia la pared vascular, iniciando así la arteriosclerosis (Davignon y Ganz, 2004).

Según la Asociación Americana del Corazón, basada en estudios realizados por Stary y col., (1994, 1995) las lesiones ateroscleróticas humanas se clasificaron en seis tipos en un primer lugar, según su grado de progresión, obteniendo los datos de estudios de arterias coronarias y aortas en localizaciones anatómicas definidas, de 1286 autopsias humanas desde niños a adultos, de distintas edades, con la finalidad de estudiar su progresión.

Primero definen la estría grasa inicial y las lesiones intermedias (tipo I, II, III). Ambas lesiones de los tipos I (lesión inicial) y II, representan pequeños depósitos lipídicos (lipoproteínas y ésteres de colesterol) en la íntima arterial, y el tipo II incluye aquellas lesiones generalmente llamadas “estrías grasas”, siendo visibles por lo general a simple vista como estrías amarillentas sobre la superficie de la íntima. Los cambios en la composición de la matriz y arquitectura de la íntima, son mínimos o ausentes. Las lesiones tipo III, representan una lesión intermedia (pre-ateroma), con las lesiones más avanzadas. En este tipo, hay aislados acúmulos de lípidos extracelulares, por debajo de las capas de macrófagos.

Las lesiones arterioscleróticas son consideradas avanzadas (tipos IV, V y VI) por criterios histológicos, cuando las acumulaciones de lípidos, células y componentes de la matriz, incluyendo minerales, provocan una desorganización estructural, daño y engrosamiento de la íntima, con deformidad de la pared arterial. Por tanto en nuestro trabajo experimental con pollos, se han reproducido las lesiones ateroscleróticas avanzadas, estudiadas en humanos, logrando una gran desestructura y engrosamiento de la capa íntima, al administrar una dieta hiperlipémica.

Según Stary y col. (1994,1995), las lesiones tipo IV (ateroma) presentan una acumulación extensa y bien definida en la íntima de lípidos extracelulares (core lipídico), de tipo excéntrica, con desorganización de la capa íntima. Entre el core lipídico y la superficie endotelial, la íntima contiene macrófagos y aisladas células musculares lisas, con y sin

inclusiones lipídicas, sobre todo en la periferia de la lesión, inmersos en una capa rica en proteoglicanos, con mínimo colágeno, lo que la hace susceptible a la formación de fisuras (tipo VI), de ahí su gran importancia en la clínica.

Debido a la desorganización del core lipídico en las células y en la estructura de la matriz intercelular de la íntima, se forma nuevo tejido conectivo reparador formado por colágeno y células musculares lisas ricas en retículo endoplásmico rugoso, son las lesiones tipo V, con engrosamiento de la lesión. Cuando el nuevo tejido es parte de una lesión con core lipídico se denomina fibroateroma o tipo Va. Si predominan depósitos de minerales, que reemplazan los restos acumulados de células muertas y los lípidos extracelulares, se denomina tipo Vb o lesiones calcificadas. Y si el core lipídico está ausente o es mínimo, se denomina tipo Vc o lesiones fibróticas.

Por último, Stary en el año 2000 ha actualizado la clasificación histológica de las lesiones arterioscleróticas, basándose en los resultados de varios grupos de investigación con animales de experimentación y estudios de regresión. Así las lesiones morfológicas que fueron catalogadas como tipos Vb (lesiones calcificadas) y Vc (lesiones fibróticas), son reemplazados al final de la secuencia como lesiones tipo VII y VIII, pudiendo pasar de unas lesiones a otras al disminuir los niveles de lípidos en sangre.

Según esta clasificación, en nuestro estudio hemos reproducido concretamente las lesiones arterioscleróticas correspondientes al grado IV y V, tras administrar una dieta hiperlipémica, en un periodo corto de tiempo, como son 3-6 meses y a su vez la regresión en tres meses, lo que confirma el papel importante del pollo como animal de investigación.

Por otro lado, Williams y col. (2008), hacen una revisión de la literatura de la regresión de la arteriosclerosis en estudios animales, comenzando en 1920 donde Anichkov en conejos alimentados con colesterol pasando a

una dieta normal baja en grasa durante 2-3 años, observó que las lesiones arteriales comenzaban a ser más fibrosas con un contenido reducido en lípidos, lo que en la actual perspectiva sugiere estabilización de la placa. En los siguientes veinte años se obtuvieron resultados arteriales similares con la inyección de fosfolípidos dispersados en una gran variedad de modelos animales, incluyendo primates, siendo ignorados de forma sorprendente.

El concepto de regresión ganó de nuevo apoyo con un estudio en monos (Maruffo y Portman, 1968) y sobre todo con un estudio más amplio por Armstrong (1976) concluyendo que la respuesta en los monos es clara, con mejoría de todos los grados de lesiones inducidas, con disminución de los lípidos intra y extracelulares, y resolución de las lesiones necróticas. Además otros trabajos de Wissler y Vesselinovich (1976) confirmaron estos hallazgos en conejos tras reversión a una dieta normal junto con la administración de fármacos hipolipemiantes.

La regresión de lesiones avanzadas en cerdos alimentados con colesterol después de administrar una dieta normal de engorde, (Daoud y col., 1981) demostró una importante secuencia de eventos. El examen histológico del ateroma mostró lesiones avanzadas, con necrosis y calcificación. Tras un régimen con dieta baja en colesterol, redujo el colesterol a 70 mg/dl aproximadamente, implicando un descenso del LDL-colesterol. La fase temprana de regresión mostró una pérdida de células espumosas de las lesiones y un incremento de macrófagos no espumosos alrededor de las áreas de necrosis. Más tarde, las áreas necróticas virtualmente desaparecieron, indicando una retirada del material por fagocitos sanos.

Otros estudios realizados en conejos alimentados con colesterol (Badimon y col., 1990) demuestran inhibición del crecimiento de la estría grasa e incluso regresión de las lesiones con la administración de homólogos de HDL.

Después de revisar todos estos estudios, en nuestro trabajo de modelo con pollos, se han confirmado los resultados de investigaciones previas, con una mejoría de los grados de lesiones tras la retirada de la dieta hiperlipémica, y también se ha objetivado una estabilización de la placa con lesiones más fibrosas y disminución del core lipídico. Además, en nuestro trabajo de experimentación con aves, al incluir varios grupos, nos permite comparar la descripción histológica de la arteriosclerosis espontánea, la inducida por dieta aterogénica, la regresión espontánea, la regresión espontánea y farmacológica, y la progresión intervenida al administrar atorvastatina, en las mismas condiciones de estudio y tomados los distintos grupos al azar.

En el grupo control sano (A) se observa una pared vascular normal en los troncos supra-aórticos. En estudios previos de arteriosclerosis espontánea (Dauber y Katz, 1944) las lesiones se observan sobre todo en la aorta abdominal. Puede observarse por tanto, una capa íntima organizada, sin desestructurarse, ni estar aumentada de tamaño.

En el grupo de dieta hiperlipémica (B), es donde la capa íntima se encuentra muy aumentada de tamaño, más que en el resto de los grupos, y a la vez muy desorganizada, con agregados masivos de lípidos de forma extracelular (core lipídico), con aumento de fibras musculares lisas en todo el espesor de la capa íntima, lo que corresponde con una lesión tipo IV (ateroma), según la clasificación de Stary. La capa media a su vez, está desorganizada por aumento de fibras musculares lisas y celularidad.

El siguiente grupo en afectación sería el grupo de regresión espontánea (C) donde es de destacar un depósito de fibras musculares lisas subendoteliales muy importante, de gran espesor, localizado entre el core lipídico y las células endoteliales, lo que corresponde con un grado de Stary tipo V (fibroateroma). El engrosamiento de la capa íntima es menor que en el grupo de dieta hiperlipémica (B), pero con persistencia de grandes placas de ateroma y desorganización de la capa íntima. El

aumento de la capa muscular, sobre todo a nivel subendotelial, consigue una placa más estable tras la retirada de la dieta hiperlipémica.

En el grupo de progresión farmacológica (E) la capa íntima tiene un aumento de espesor más moderado, siendo un tejido más laxo, con menos placas de ateroma, que desorganiza la íntima. Hay un aumento moderado de fibras musculares lisas en la capa íntima. Se observa por tanto, una menor afectación que en el grupo de regresión espontánea (C), al que se le ha retirado la dieta hiperlipémica, por lo que la mejoría se atribuye a los efectos de la atorvastatina.

Por último, en el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), la capa íntima está ligeramente aumentada de tamaño, con depósitos aislados de lípidos y aumento mínimo de células musculares lisas y de la celularidad. Es por tanto, el grupo más parecido al control sano, con mayor regresión de las lesiones, lo que demuestra el efecto beneficioso de la atorvastatina unido a la retirada de la dieta hiperlipémica.

#### **8.4. Valoración semicuantitativa modificada de los grados de lesión de Stary**

Según los componentes de la lesión de arteriosclerosis descrita previamente por Stary (2000), en los animales de nuestro grupo de experimentación, se ha conseguido grados de Stary tipo IV y V, similar a las lesiones encontradas en humanos. Ahora bien, basándonos en la afectación de la pared vascular, según el grado de severidad encontrado, teniendo en cuenta el grosor de la capa íntima, la celularidad de la capa íntima y capa media, la presencia de depósitos lipídicos, las fibras musculares lisas y la placa de ateroma; se ha realizado una escala de 0-3 puntos.

Previamente Wilson y col. (1982), en conejos alimentados con una dieta hiperlipémica con suplemento de colesterol durante cinco años, con un grupo de regresión al retirar la dieta, clasificaron los resultados en una

escala de 0-3, según la cantidad de lípidos, células musculares lisas, colágeno y calcificación, por observación microscópica en la capa íntima, sin conocimiento del grupo al que pertenecía, realizando un test estadístico, a nivel de la aorta abdominal, aorta torácica, arterias coronarias, arterias renales y arterias basílicas. Mostraron también un comportamiento distinto de las lesiones ateroscleróticas asociadas al estímulo aterogénico con altas cifras de colesterol en sangre (>300 mgr/dl), consiguiendo estas cifras a partir de los seis meses de iniciar la dieta hiperlipémica. La proliferación de las células musculares lisas era rápida coincidiendo con cifras altas de colesterol, y la cantidad de monocitos atraídos dentro de la pared vascular era importante, con formación rápida de células espumosas y células musculares lisas con pequeña capacidad para la síntesis de colágeno. Cuando la dieta hipercolesterolémica se retiraba, las células musculares lisas proliferaban más lentamente con pequeña acumulación de macrófagos, y se producía estimulación de las células musculares lisas en la síntesis de colágeno, con lesiones menos sudanófilas y más fibróticas.

Así, en nuestro estudio de experimentación, comparando a los distintos grupos entre ellos, se ha realizado una puntuación en global con una escala, de 0 a 3, observando un menor grado de puntuación en el grupo control con dieta normal (A), el cuál presenta una pared vascular organizada, sin aumento de la celularidad, ni depósitos lipídicos, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al resto de los grupos de experimentación. Un segundo grupo de afectación intermedia, el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) con una diferencia también significativa con respecto al resto de los grupos. Se ha obtenido un resultado fiable, al estar comparado estadísticamente.

Y por último, un tercer bloque de mayor afectación, y por tanto una puntuación mayor, compuesto por el grupo de progresión con dieta hiperlipémica (B), el de regresión espontánea (C) y el de progresión farmacológica (E), sin diferencia estadística entre ellos, con mayor

cantidad de lípidos, placas de ateroma, mayor engrosamiento de la íntima y mayor depósito de células musculares lisas.

En el estudio previo (Wilson y col., 1982) se observaba una diferencia entre el grupo de dieta hiperlipémica y el grupo de regresión espontánea tras la retirada de la dieta, estadísticamente significativa sólo en las arterias coronarias pero no en el resto de arterias, entre las que se incluyen las arterias carótidas y arterias basilares. En los troncos supra-aórticos, objeto de nuestro estudio, al igual que en nuestros resultados, aprecia una mejoría con menos placas ateromatosas y lesiones más fibróticas pero sin significado estadístico. Estos autores sólo estudian la regresión espontánea mientras que en nuestro estudio también valoramos la regresión farmacológica (D). En este último grupo, sí observamos diferencias estadísticamente significativas con el grupo de dieta hiperlipémica.

Esto nos confirma que la dieta sola mejora la afectación de la pared vascular, pero es conjuntamente con una estatina, lo que favorece de forma importante la regresión de la lesión arteriosclerosa, y volver a la fase inicial sin afectación del vaso como el grupo de dieta normal.

Por otro lado, el seguir con una dieta hiperlipémica y a la vez administrar una estatina (atorvastina), como es el caso del grupo de progresión farmacológica (E), mejora también la puntuación en la escala, pero no de forma estadísticamente significativa. Esto demuestra el efecto beneficioso de la atorvastatina unido a la retirada de la dieta hiperlipémica, obteniendo con la administración conjunta unas cifras de colesterol y triglicéridos más similares al grupo de dieta normal (A), como ya se ha comentado en el primer apartado de resultados bioquímicos.

Así nuestro estudio no sólo confirma el resultado de Wilson y col. (1982) a nivel de los troncos supra-aórticos en la regresión espontánea, sino que además, nos aporta el hallazgo de la mejoría importante, con el

tratamiento conjunto de la dieta y el fármaco hipolipemiante y a la vez con efecto pleiotrópico, como es la atorvastatina.

### **8.5. Grosor de la capa media**

En los resultados obtenidos de este parámetro destaca la diferencia estadísticamente significativa, de todos los grupos con respecto al grupo control con dieta normal (A). En todos ellos está disminuido el espesor de esta capa, en torno al 60% del grosor correspondiente al control sano (A). Existe por tanto una atrofia de la capa media en los pollos a los que se les ha introducido la dieta hiperlipémica (B) y posteriormente se ha inducido una regresión, grupo de regresión espontánea (C), grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), y por último el grupo de progresión farmacológica (E).

Estudios previos (Cai y Harrison, 2000) indican que el endotelio disfuncional promueve la proliferación de células musculares lisas (CML), la deposición o proteólisis de matriz extracelular, la inflamación y la activación de las plaquetas. Las CML sufren transformaciones fenotípicas como respuesta a cambios en el entorno biomecánico, como factores de crecimiento/inhibición, influencias mecánicas, interacciones intercelulares y célula-matriz y mediadores de inflamación (Barnes y Farndale, 1999). Las CML de la capa media, con fenotipo “contráctil” (responsables de la vasoactividad arterial) penetran en la capa íntima y adquieren un fenotipo “sintético”. Dicho cambio fenotípico o desdiferenciación confiere a las CML una mayor actividad funcional, por ejemplo, capacidad de migrar, dividirse y sintetizar proteínas de la matriz extracelular como colágeno, proteoglicanos y elastina, lo que conlleva a su vez a un engrosamiento de la capa íntima.

Con ello se llega a varios grados de hipotrofia de la capa media arterial, e incluso a la atrofia, lo que implica una acentuada pérdida de su elasticidad con el aumento de la lesión aterogénica. Y además, en la medida que persiste la acción de los factores inductores del proceso aterosclerótico

hay aumento de la lesión intimal e incluso se propaga hacia la capa media arterial.

Ya en 1983, Malinow en un trabajo de revisión sobre los procesos de regresión en arteriosclerosis, apuntó que cuando se estudiaba la definición de regresión medida angiográficamente según la imagen de la luz, podía simularse o confundirse, por relajación del espasmo, por lisis o recanalización del trombo, por crecimiento arterial o ectasia, o por atrofia de la capa media.

Por tanto, esta disminución del espesor de la capa media coincide con estudios previos, una vez que se produce la arteriosclerosis, pues en nuestros grupos hemos podido comprobar que hay una migración de las CML hacia la íntima en distinta intensidad según el grupo estudiado. Además pone de manifiesto que en la fase de regresión, se mantiene estable en su grosor, tanto en el grupo de regresión espontánea (C) como regresión espontánea y farmacológica (D), lo que nos indica que no se regenera o que precisa más tiempo que el empleado en nuestro trabajo de experimentación, para volver a su tamaño habitual, una vez regenerada la íntima. Lo que sí aporta nuestro estudio, es una ligera tendencia a aumentar el grosor de su capa media, en los dos grupos tratados con atorvastatina, el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), y el grupo de progresión farmacológica (E), sin significado estadístico.

### **8.6. Grosor de la capa íntima**

Desde los primeros estudios clínicos y de animales desde 1920, la noción de la progresión inducida, la regresión rápida y la estabilización de la arteriosclerosis en humanos, ha sido una meta a alcanzar farmacológicamente, incluso en las placas avanzadas. La mayoría de los métodos usados para inducir aterosclerosis previa a la regresión ha sido con dietas que contienen colesterol (dietas hiperlipémicas).

Modelos de regresión se han realizado en distintos animales (pollos, ratas, perros, palomas, cerdos, monos y conejos), quedando en los primeros años ignorada al publicarse un estudio que mostró empeoramiento de las lesiones arteriales en conejos alimentados con colesterol después del retorno de los animales a una dieta normal. Posteriormente se ha comprobado que los conejos mantienen reservorios de colesterol inducida por dieta hipercolesterolémica en el hígado lo que conduce a una hipercolesterolemia persistente a largo tiempo después de retirar dicha dieta (Stein y Stein, 2001). Así pues en 1976 Wissler y Vesselinovitch consiguieron de nuevo regresión en conejos, tras la reversión de la dieta a una normal en combinación con la administración de hipolipemiantes y otros fármacos.

Por otro lado, Wilson y col. (1982) en un estudio a cinco años en conejos, observaron una variación en las lesiones arteriosclerosas con respecto al tiempo de evolución. En los 12 primeros meses vieron lípidos extra e intracelulares, en la capa íntima, seguida de proliferación de células musculares lisas, con rico retículo endoplásmico rugoso, colágeno y elastina, con lo que la capa íntima se encontraba aumentada de tamaño. Estos cambios se intensificaron durante el tercer año con ocupación de la capa media. El grosor de la capa íntima aumentó de forma gradual hasta un valor máximo a los 36 meses ( $547 \pm 304 \mu\text{m}$ ).

A los cuatro años se encontraron discretos ateromas con grandes centros de lípidos y detritos necróticos, rodeados de colágeno y unas pocas células musculares lisas. Un segundo tipo de placas delgadas envueltas en colágeno y células musculares lisas con pequeñas cantidades difusas de lípidos. Y un tercer tipo de numerosos microateromas rodeados de una densa capa de colágeno y unas pocas células musculares lisas. La calcificación de las placas fue una característica después de los 48 meses.

En el grupo de regresión (alimentados durante 2 años con dieta aterogénica y dieta normal durante el tercer año) el porcentaje de área

sudanófila era mucho menor, con lesiones compuestas principalmente por colágeno y lípidos con pocas células musculares lisas normales o degeneradas, con la capa íntima disminuida de tamaño. Observaron que las estrías grasas regresaban y no se formaban placas nuevas de ateroma, pero la fibrosis y ateromas de placas avanzadas, existentes previamente al cambio de la dieta, continuaban iguales.

En humanos, el engrosamiento de las capas íntima-media (GIM) de la pared carotídea evaluados por ecografía son una excelente variable sustitutiva de la evolución de la aterosclerosis y es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular, así Kastelein y col. (2004) demuestran con hipolipemiantes los cambios del GIM de la pared carotídea evaluados por ecografía como variable sustitutiva de la evolución de la aterosclerosis. En el estudio ARBITER (Taylor y col., 2006) se valida el GIM en pacientes con enfermedad arterial coronaria y cifras bajas de HDL, pre y post-tratamiento con estatina y placebo (grupo control) y un segundo grupo tratados con estatina y niacina (con aumento del HDL del 23% comparado con placebo), durante 24 meses. En el grupo de estatina y placebo hay un aumento de GIM carotídeo, y en el grupo de estatina y niacina se objetiva un descenso del GIM carotídeo de 0.041 mm, justificado por la estrategia del descenso del colesterol-LDL y aumento del colesterol-HDL.

En nuestro trabajo de investigación, en un corto tiempo de inducción, se ha comprobado que hay diferencias significativas en el grosor de la capa íntima de todos los grupos experimentales, mientras que en el trabajo de Wilson y col. (1982) con tiempos mucho más largos, sólo observaron diferencias significativas al comparar el control aterogénico y el grupo de regresión espontánea en aorta y coronarias pero no en los troncos supra-aórticos. En nuestro estudio si observamos diferencias estadísticas entre estos grupos en los troncos, por tanto obtenemos resultados más robustos y significativos. Y por otro lado obtenemos resultados significativos de otros grupos no incluidos en el estudio de Wilson como son la regresión y progresión farmacológica.

En nuestros hallazgos, sí que se observa, como previamente se ha citado, una capa íntima más engrosada en el grupo de dieta hiperlipémica (B), con una media de  $336\pm 23$   $\mu\text{m}$ , el cuál presenta mayores niveles de colesterol-LDL, con una mayor afectación. Y el grupo más parecido al control sano con dieta normal (A), es el grupo al que se le ha retirado la dieta hipercolesterolémica y se trata con atorvastatina, el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), con una menor afectación tras la regresión de la arteriosclerosis.

Por otro lado, destacamos que el grupo de progresión farmacológica (E), tiene un menor grosor de la capa íntima, comparado con el grupo de regresión espontánea (C), al que se le retira la dieta con colesterol y sigue una dieta normal. Para justificar dicho resultado, en el grupo de progresión farmacológica (E) se ha alcanzado un mayor nivel de HDL en sangre, con diferencia estadística significativa. Este papel protector frente a la enfermedad aterosclerótica de valores incrementados de HDL se ha demostrado de forma experimental y en estudios de población tanto epidemiológicos como de intervención (Ibáñez, 2010). Mientras que el mecanismo de entrada a la pared vascular está directamente relacionado con los valores de LDL, el reflujo o transporte reverso desde la pared vascular hasta el hígado depende de los valores de HDL.

Badimon y col. (1989) demuestran que el HDL inhibe el crecimiento de la estría grasa y posteriormente en 1990, hacen el primer estudio prospectivo con conejos que evidencia el efecto inhibitor del HDL en estabilizar la arteriosclerosis, al administrar a un grupo de animales con dieta hipercolesterolémica, proteína HDL-VHDL, aislada del plasma de conejos normolipémicos. Sus resultados, lesiones de estrías grasas en el arco aórtico y aorta torácica descendente, presenta una disminución estadísticamente significativa en el grupo que se trata con la proteína HDL-VHDL a pesar de la dieta hiperlipémica; apoyan fuertemente la hipótesis de que la administración de homólogo HDL-VHDL, estimula el transporte reverso de colesterol desde los tejidos extrahepáticos al

hígado, donde puede ser metabolizado y excretado, con disminución del grosor de la capa íntima. Los niveles de lípidos plasmáticos en los grupos control, placebo y tratados con HDL, son iguales, no se modifican con el tratamiento, lo que parece jugar también un papel directo del HDL en el metabolismo del colesterol aórtico, con efecto antiaterogénico y antiinflamatorio generalizado al estimular la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) en la pared aórtica normal y de conejos ateroscleróticos, observando que las prostaglandinas modulan el metabolismo arterial del colesterol esterificado al estimular la enzima hidrolasa-colesterol.

Así nuestro estudio experimental no sólo nos ofrece la posibilidad de observar la reducción del grosor de la capa íntima con la regresión al disminuir la cifra de colesterol con el efecto combinado de dieta y atorvastatina en el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), que es el grupo con mayor beneficio obtenido; sino que también nos brinda la oportunidad de conocer en el grupo que mantiene una cifra elevada de colesterol y LDL, al continuar con dieta hiperlipémica, el grupo de progresión farmacológica (E), cómo presenta ausencia de progresión y experimenta una mejoría del grosor de la capa íntima que es estadísticamente significativa con respecto al grupo de regresión espontánea (C) y el grupo de dieta hiperlipémica (B), al tener un valor elevado de HDL producido por la administración de atorvastatina.

### **8.7. Grosor de la placa de ateroma**

En nuestro grupo de investigación Ortega y col. (2002) demostraron que la atorvastatina a dosis de 3 mg/Kg/día administrada a pollos alimentados con una dieta a base de huevos (García Pérez y col., 2003), producía una reducción significativa de los niveles de colesterol sérico y LDL-colesterol asociado a una disminución del 67% del área relativa de placa arteriosclerosa en aorta respecto al grupo control. Por otro lado, Sukhova y col. (2002) demostraron en monos una reducción de los niveles de colesterol sérico asociado a una disminución en los parámetros inflamatorios en el ateroma (macrófagos, células musculares lisas,

contenido de colágeno) y a una mayor estabilidad de la placa de arteriosclerosis, tras tratamiento con estatinas (atorvastatina).

En el actual estudio se confirman los datos previos, observando una reducción de la placa de ateroma muy importante sobre todo en el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) con un mayor descenso del nivel de LDL, del colesterol total y de los triglicéridos, siendo el más similar al grupo control con dieta normal (A), con ausencia de placa de ateroma.

El grupo de dieta hiperlipémica (B) presenta grandes placas de ateroma que ocupan todo el espesor de la capa íntima, es el grupo de mayor afectación arteriosclerótica y a la vez con el nivel más elevado de LDL-colesterol con una diferencia estadísticamente significativa. En contraposición, en el resto de los grupos no se ha observado una progresión de la arteriosclerosis, sino una reducción progresiva del volumen de las placas de ateroma, todos ellos con un valor estadísticamente significativo.

Así en el grupo de regresión espontánea (C) con retirada de la dieta hiperlipémica ya se aprecia una regresión de la placa, la cuál es aún más acentuada en el grupo de progresión farmacológica (E), a pesar de mantener una dieta hiperlipémica. El hallazgo de este hecho es atribuible al tratamiento concomitante con atorvastatina, que logra un descenso del nivel de LDL-colesterol estadísticamente significativo con respecto al grupo B, junto con un aumento del nivel de HDL que también es estadísticamente significativo con respecto al resto de los grupos. Y por último el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D), comentado previamente por su mayor similitud con el grupo de dieta normal (A), en cuyo grupo, al retirar la dieta hiperlipémica y añadir atorvastatina, la reducción de la placa de ateroma es mucho mayor.

Entre los grupos C, D y E, los niveles de colesterol total, TG y LDL-colesterol, tienen una diferencia estadísticamente significativa, pero el

nivel de HDL-colesterol es el grupo de progresión farmacológica (E) el que tiene una mayor cifra y con diferencia significativa, por lo que la mejoría observada probablemente se deba al efecto pleiotrópico de las estatinas, como es su potencial antiinflamatorio y al aumento de HDL.

Así pues, se ha realizado un estudio completo, con valoración histológica de la pared vascular, con un seguimiento en la iniciación, progresión y regresión de los estadios preclínicos de la arteriosclerosis, incluso de las lesiones avanzadas, en un modelo con cinco grupos diferentes. Se ha cuantificado el grosor de la placa de ateroma en los cortes histológicos de las distintas muestras, a diferencia de otros estudios donde se ha medido la placa de ateroma con otros medios técnicos, como son la ecografía intravascular, la RMN y la TAC multicorte. Incluso en la mayoría de estudios, el método estándar es medir por morfometría el porcentaje de área de la aorta ocupada por lesiones que contienen lípidos respecto al área total de la aorta, en disección longitudinal de este vaso teñido con Sudán III, y valorar el cambio en el tamaño de la lesión y en el número de las lesiones.

En estudios previos en ratones transgénicos que expresaban valores elevados de apolipoproteína A-1 (Apo A-1), principal apolipoproteína en las HDL, se vio que eran resistentes a la aterosclerosis (Walsh y col., 1989). Recientemente, la disponibilidad de Apo A-1 Milano ha permitido tratar a pacientes coronarios agudos, y en un estudio piloto se ha demostrado que se produce una regresión de las placas ateroscleróticas coronarias, evaluados con ecografía intravascular coronaria (Nissen y col., 2003). El HDL Milano es el resultado de una mutación espontánea de Apo A-1 (conocida como Apo A-1 Milano) identificada a finales de los años setenta, que tuvo lugar en el siglo pasado en un pequeño pueblo del norte de Italia. Los sujetos con esta mutación de HDL tienen una tasa muy baja de aterosclerosis, tanto clínica como subclínica (evaluada con ecografía carotídea).

En la revisión de la literatura realizada por Williams y col. (2008), los estudios tanto en animales como en humanos, indican que las lesiones ateroscleróticas en todos sus estadios, incluso las lesiones arteriosclerosas avanzadas, regresan, como también hemos demostrado en nuestro estudio de experimentación. Así Daoud y col. (1981) realizaron un examen histológico del ateroma en lesiones avanzadas en cerdos alimentados con dieta hipercolesterolémica, mostrando placas avanzadas con necrosis y calcificación. El régimen de regresión redujo el colesterol total del plasma a aproximadamente 70 mg/dl, implicando un descenso del nivel de colesterol-LDL. En la fase temprana de la regresión mostraron una disminución del ateroma, con pérdida de las células espumosas de las lesiones y un incremento de macrófagos no espumosos alrededor de las áreas de necrosis. A largo plazo, las áreas necróticas virtualmente desaparecieron, indicando una retirada del material por los macrófagos sanos, sin medir el volumen de las placas de las lesiones avanzadas.

Una década más tarde, Miyazaki y col. (1995) obtuvieron una reducción del ateroma en conejos tras administrarles inyecciones de HDL o apolipoproteína A-HDL. Al principio la regresión se limitó a las estrías grasas, pero tras conseguir disminuir la concentración de lípidos en sangre, pudieron mejorar los factores protrombóticos y proteolíticos en la pared arterial, consiguiendo hallazgos consistentes en un remodelado del ateroma a un fenotipo más estable.

Recientemente se ha publicado un estudio en animales de experimentación en el que se evalúa el efecto de la perfusión aguda de HDL Milano en el volumen y la composición de las placas de ateroma con RMN seriadas (Ibáñez, 2010), junto con estudios de TAC multicorte, observando una regresión significativa de la placa de ateroma, junto con un cambio cualitativo de ésta, sugiriendo una estabilización aguda de la placa de ateroma.

En otro estudio posterior (Sezer y col., 2011) en cuarenta conejos divididos en cuatro grupos (dieta normal, atorvastatina, dieta aterogénica

y por último dieta aterogénica más atorvastatina) valoran histológicamente la afectación del tejido del arco aórtico y la actividad antioxidante de la atorvastatina a través de la enzima paraoxonasa. Esta enzima previene la oxidación de LDL. Sus resultados confirman la presencia de gruesas placas de ateroma en la íntima y en la luz arterial visiblemente obstruida por estas placas, junto con un descenso de la enzima antioxidante, en el grupo hiperlipémico. Sin embargo, en el grupo hiperlipémico más atorvastatina, la placa de ateroma es una placa más delgada y localizada, sin llegar a cuantificar su volumen, con un incremento en la actividad de la enzima antioxidante paraoxonasa. Estos autores atribuyen a la atorvastatina la función de favorecer la inhibición de la oxidación-LDL.

Por otro lado, las estatinas han demostrado de forma consistente que una reducción significativa de las concentraciones de LDL es capaz de reducir la progresión del volumen de placa de ateroma en diferentes territorios vasculares en humanos (Ibáñez, 2010).

En el ensayo REVERSAL (Nissen y col., 2004) se comparó dosis altas de estatina con una dosis convencional, durante 18 meses de tratamiento, los pacientes tratados con un régimen convencional (40 mgr de pravastatina) presentaban una progresión del volumen del ateroma estadísticamente significativo a pesar de alcanzar un nivel de colesterol-LDL de 110 mg/dl dentro de la meta establecida por el Adult Treatment Panel III. Por el contrario, el grupo con dosis altas de estatina (80 mgr de atorvastatina), experimentó una progresión no significativa en el volumen del ateroma con un nivel de colesterol-LDL de 79 mg/dl.

Dos años más tarde, en el ensayo ASTEROID (Nissen y col., 2006) todos los pacientes recibieron la misma dosis de tratamiento con rosuvastatina durante 24 meses, con ecografía intravascular pre y post-tratamiento. Durante el tratamiento el nivel de colesterol-LDL disminuyó a 60.8 mg/dl y el volumen del ateroma disminuyó una media de 6.8%. La mayor eficacia podría explicarse por el mayor descenso del nivel de colesterol-LDL, la

mayor duración del tratamiento y por los niveles más altos de colesterol-HDL alcanzados en este estudio.

Por todo ello, el presente estudio experimental no sólo vuelve a demostrar que el modelo aviar, en el caso actual en el pollo, es un gran modelo donde se reproducen las lesiones arteriosclerosas con dieta hiperlipémica, sino que permite cuantificar, el tamaño de las placas de ateroma en las dos fases, progresión y regresión mediante técnicas histológicas y análisis de imagen en cinco grupos de experimentación, característica no reflejada en otros estudios.

### **8.8. Valoración de la neointima**

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica con manifestaciones clínicas locales que se caracteriza principalmente por un depósito de lípidos en la pared de las arterias de mediano y gran calibre, por lo que se mantiene un estado de inflamación crónica, con cambios en la pared vascular como respuesta a esa inflamación.

En el año 1920 Anichkov publicó que conejos alimentados con una dieta rica en colesterol cambiados a una dieta baja en grasa durante 2-3 años, provocaba lesiones arteriales más fibrosas con un menor contenido lipídico. En estudios posteriores, estos hallazgos sugieren una estabilización de la placa (Wissler y Vesselinovitch, 1976).

En un ensayo a cinco años con conejos alimentados con dieta aterogénica (Wilson y col., 1982), detectaron lípidos extra e intracelulares en la íntima, seguido por la proliferación de células musculares lisas, colágeno y elastina en dicha capa. A los 12 meses la mayoría de las células musculares lisas contenían un prominente retículo endoplásmico rugoso, con gotas lipídicas. Seis meses después, la mayoría de las células musculares lisas contenían numerosas gotas lipídicas (células espumosas). En el grupo de conejos a los que se le retiró la dieta hiperlipémica en el último año, el área de superficie sudanófila (área

lipídica teñida con Sudán) en la aorta era significativamente menor que en el resto del grupo, con menor afectación, y las lesiones presentes consistían primariamente de colágeno y lípidos con pocas células musculares lisas normales o degeneradas.

En estudios con estatinas, Donetti y col. (1997), administraron durante dos semanas 10 mg/Kg de atorvastatina, simvastatina y pravastatina, a conejos normolipémicos e hiperlipémicos observando que existía una reducción con las tres estatinas en cuanto a la migración y a la proliferación de las células musculares lisas, aunque con atorvastatina la ratio íntima/media disminuyó en 44% en normocolesterolémicos y en 56% en hipercolesterolémicos, con lo que se pudo comprobar que las estatinas deben de producir directamente una protección de la pared arterial por mecanismos distintos a la bajada de colesterol y lipoproteínas.

En el mismo año Hernández-Presa y col. (1997), utilizando el modelo arteriosclerótico en conejos durante 4 semanas y administrando atorvastatina a dosis de 5 mgr/Kg, consiguieron disminuciones de colesterol total del 60%, LDL-colesterol del 40% y de triglicéridos del 50%. Además observaron una disminución del 60% del cociente íntima/media de la lesión arteriosclerosa con una disminución de la infiltración macrofágica de dicha lesión con la reducción de la formación de neoíntima. Posteriormente, Xu y col. (2002) demostraron el efecto de la atorvastatina y mevastatina en la reducción de la proliferación de células musculares lisas y la expresión del receptor de la endotelina A en cultivos celulares de aorta y arterias cerebrales de ratas.

Por otro lado, en humanos en grandes ensayos llevados a cabo, con el fin de disminuir el perfil lipídico, mostraban evidencias angiográficas de regresión de la placa, con resultados clínicos sorprendentemente poco beneficiosos, particularmente en la reducción de eventos clínicos. Esta paradoja clínica es debida al papel que juega en los síndromes coronarios agudos las placas vulnerables que son normalmente pequeñas en tamaño causando una oclusión menor del 50%, pero ricas en lípidos intracelulares

y extracelulares, en macrófagos y en factor tisular, con pequeñas concentraciones de células musculares lisas y frecuentemente con una capa fibrosa delgada en contacto con la capa endotelial (Williams y col., 2008). Su ruptura provoca la oclusión de los vasos con infarto agudo. El descenso de los lípidos sanguíneos, disminuye el riesgo de estos eventos clínicos, por el remodelado y estabilización de estas lesiones propensas a la ruptura, al ser más fibrosas y disminuir su contenido lipídico.

Nuestro estudio como novedad, ha valorado la neoíntima con la medida de la  $\alpha$ -actina, marcador de las fibras musculares lisas, con tres modalidades distintas, lo que aumenta el grado de precisión en su determinación. Esto se ha llevado a cabo por medio de tres parámetros: el grosor de la  $\alpha$ -actina subendotelial, que nos evalúa la estabilidad de la placa de ateroma; la densidad de volumen de  $\alpha$ -actina; y con una cuantificación más precisa del depósito de  $\alpha$ -actina teniendo en cuenta la intensidad de inmunorreactividad y la densidad de volumen de  $\alpha$ -actina, término denominado densidad integrada de  $\alpha$ -actina, parámetro de mayor resolución y sensibilidad.

Coincidiendo con estudios previos, puede observarse una proliferación muy marcada de las células musculares lisas de la capa media, que emigran a la capa íntima en los grupos de pollos alimentados con dieta aterogénica con aumento del tamaño de la capa íntima y con células espumosas, en un intento junto con los macrófagos de eliminar los depósitos lipídicos. Comparando todos los grupos, se obtiene una menor cantidad de fibras musculares lisas en la íntima con diferencia estadísticamente significativa por un lado entre el grupo de dieta normal (A) con mínimas fibras musculares lisas, y el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) cuyos efectos de la dieta más atorvastina hacen que disminuyan. A su vez, ambos grupos se diferencian estadísticamente con el resto de los grupos, donde puede verse una distribución importante de fibras musculares lisas por toda la capa íntima.

Sin embargo, si nos centramos en las fibras musculares lisas subendoteliales, llama la atención el grupo de regresión espontánea (C) donde se observa una tendencia al acúmulo de la mayoría de las fibras musculares lisas especialmente localizado a nivel subendotelial, sin diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de dieta hiperlipémica (B), pero sí es estadísticamente significativo con respecto al resto de grupos, entre ellos el grupo de progresión farmacológica (E).

Así pues, sólo con la retirada de la dieta hiperlipémica se observa una tendencia hacia el depósito subendotelial, entre la luz vascular y la placa de ateroma. Quizás con un tiempo superior a los tres meses empleados en el estudio experimental, puede que el resultado obtenido sea también estadísticamente significativo con respecto al grupo de dieta hiperlipémica (B).

Este depósito subendotelial de fibras musculares lisas proporcionaría una estabilidad a la placa de ateroma (Fayad y Fuster, 2001) en comparación con las placas de mayor afectación del grupo de dieta hiperlipémica (B).

Con estos resultados de la cuantificación de fibras musculares lisas, en cinco grupos de comparación al mismo tiempo, podemos afirmar que la atorvastatina junto con la retirada de la dieta hiperlipémica, tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las fibras musculares lisas, mostrando una regresión de la arteriosclerosis. Y por el contrario, a mayor densidad de volumen y mayor densidad integrada de  $\alpha$ -actina, en un intento de restaurar el daño de la pared vascular, se observa un mayor grado de enfermedad.

### **8.9. Grado de oclusión del vaso**

Si consideramos el grosor de la placa de ateroma, como se ha mencionado previamente en el apartado 8.7, tanto en nuestro trabajo como en estudios previos ya comentados, con respecto a la luz del vaso, se demuestra un mayor grado de oclusión en el grupo de dieta

hiperlipémica (B) al ser el más afectado y presentar placas de ateroma de mayores dimensiones. En un grado intermedio estarían el grupo de regresión espontánea (C) y el grupo de progresión farmacológica (E). Y por último, los grupos de dieta normal (A) y el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) pues presenta una reducción muy importante de la placa de ateroma, siendo muy similar al grupo control, sirviendo como base para evaluar la luz del vaso normal. Se observa pues, un efecto beneficioso con la dieta normal y al administrar atorvastatina.

Sin embargo, a pesar del mayor grosor de la placa en el grupo de dieta hiperlipémica (B), el grado de obstrucción es del 59%, relativamente pequeño el grado de estenosis para la afectación que presenta la íntima con una gran placa de ateroma y su desestructuración. El resto de grupos experimentales presenta un menor grado de afectación.

Esto confirma lo que ya Glagov y col. (1987) en estudios de autopsia demostraron por primera vez. Propusieron un proceso de remodelado positivo, originalmente descrito por ellos, durante los estadios iniciales de la formación del ateroma, con expansión de la lámina elástica externa (LEE), así las lesiones ateroscleróticas pueden progresar sin comprometer la luz debido a la dilatación compensadora del calibre vascular. Las lesiones con lípidos abundantes como las observadas en el grupo de mayor afectación, grupo con dieta hiperlipémica (B), causan síndromes coronarios agudos y suelen ser ligeramente estenóticas, debido a una remodelación positiva significativa, por lo que no se detectan mediante angiografía. Es la rotura de la placa y la consiguiente formación del trombo las responsables de la aparición de la clínica, vivimos pues con arteriosclerosis y morimos de trombosis. Así las técnicas de imagen que miden la dimensión de la luz no proporcionan resultados reales, no coincide la mejoría de la clínica con la mejoría de las imágenes tras aplicar tratamientos que disminuyan los niveles de LDL.

En un metaanálisis realizado por Williams y col., (2008) es lo que denominan “paradoja angiográfica”. Las placas vulnerables son frecuentemente pequeñas en tamaño y causan el 50% o menos de oclusión de la luz vascular. Están generalmente llenas de lípidos intra y extracelulares, ricas en macrófagos y factor tisular, con bajas concentraciones de células musculares lisas y frecuentemente con sólo una delgada capa fibrosa bajo la capa endotelial intacta. La ruptura de estas placas provoca la formación de un coágulo y la consiguiente oclusión del vaso. Así es posible que la pared arterial presente una cantidad sustancial de ateroma antes de que se produzca una obstrucción detectable en la coronariografía.

Por ello, en nuestro trabajo es importante y beneficioso, el poder comparar las mediciones de las dimensiones de las placas de ateroma de los distintos grupos experimentales, conjuntamente con el grado de oclusión del vaso, coincidiendo los resultados. Se observa un paralelismo, y se demuestra a la vez que en el grupo de mayor afectación de placa ateromatosa, el grupo de dieta hiperlipémica (B), no hay un porcentaje alto de oclusión, sólo un 59%. La medición realizada es bastante precisa y fiable, lo que aumenta la validez del estudio. Además se obtiene una mayor resolución y regresión de las lesiones, al asociar la dieta normal junto con atorvastatina en el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D).

#### **8.10. Relación pared/luz**

En estudios posteriores al remodelado positivo (Glagov y col., 1987), se ha determinado la relación entre la regresión del ateroma y el remodelado de la pared arterial.

Por medio del ultrasonido intravascular, se han definido los cambios realizados en la pared arterial tras incrementar las cifras de HDL a través de la infusión de HDL reconstituido que contiene apolipoproteína A-I Milano, en 47 pacientes después de un síndrome coronario agudo durante

cinco infusiones semanales (Nicholls y col., 2006). Mediante esta técnica de planimetría es posible determinar el área ocupada por la LEE y por la luz, calculando posteriormente el área de la placa como la diferencia entre las áreas de la LEE y de la luz. Los hallazgos demostraron por primera vez que la regresión de la placa después de la infusión de HDL sintético se caracterizaba por una reducción concomitante de la LEE. El tamaño de la luz no variaba, disminuía el área total de la arteria sin afectarse el área luminal, lo que sugiere un mecanismo regular exquisitamente sensible. Esto permite mantener un tamaño de luz vascular constante durante la regresión de la arteriosclerosis por una reducción compensadora de las dimensiones en la LEE. Es pues, un fenómeno inverso al proceso del remodelado positivo.

El examen de diferentes subsegmentos permite el análisis de la relación entre la reducción de la LEE y la regresión de la placa. En los segmentos que no han presentado regresión, no se ha presenciado el remodelado inverso, mientras que en segmentos con reducción en las dimensiones del ateroma, hay una reducción compensadora en el volumen de la LEE. Estos hallazgos representan un fenómeno focal y no una respuesta generalizada al tratamiento. Además en dicho estudio se demuestra que el cambio en el área de la LEE puede ocurrir en sólo unas pocas semanas.

Otros autores (Corti y col., 2002) han publicado que la regresión de la placa de ateroma aórtico después de realizar un tratamiento crónico con estatinas en humanos, no se acompaña tampoco de un cambio en las dimensiones de la luz vascular, valorada la pared arterial por resonancia magnética.

Estudios experimentales en animales (Wilson y col., 1982) alimentando conejos durante cinco años con dieta hiperlipémica, y un grupo control con dieta de laboratorio, en las arterias carótidas y renales, el área de la luz vascular libre era similar en los dos grupos. Por otro lado, recientemente se ha publicado un estudio en animales de

experimentación en el que se evalúa el efecto de la perfusión aguda de HDL Milano en el volumen y la composición de las placas de ateroma con RMN, con regresión significativa del volumen de la placa de ateroma sin observarse cambios en el tamaño de la luz del vaso, se asoció pues a un remodelado positivo inverso (Ibáñez y col., 2008).

En nuestro estudio, de forma interesante, los resultados confirman los datos obtenidos en investigaciones previas tanto en humanos como en animales. En los cinco grupos de experimentación se obtiene una relación pared/luz similar, sin cambios estadísticamente significativos. El diámetro interno medido, correspondiente a la luz vascular, ha sido constante, variando poco el grosor de la pared, pues como se ha podido comprobar en los grupos más afectados con aumento de la íntima, la capa media ha disminuido.

El grupo de progresión con dieta hiperlipémica (grupo B) ha experimentado una remodelación positiva con aumento del diámetro de la LEE para compensar el gran volumen de la placa de ateroma y no verse afectada el área total de la luz vascular. En el resto de los grupos, según se ha ido produciendo una regresión del volumen de la placa de ateroma, bien con dieta o con atorvastatina, se ha producido un remodelado positivo inverso, con disminución del diámetro de la LEE para seguir conservando el mismo tamaño de la luz arterial. Este estudio también demuestra que los cambios en la pared vascular ocurren en sólo unas pocas semanas, así pues la pared arterial juega un papel dinámico en la progresión y regresión de la placa arteriosclerótica.

### **8.11. Coeficiente aterogénico (CA)**

Revisando la literatura (Stary y col., 1994, 1995; Stary, 2000) hacen una clasificación y definición histológica de las lesiones arterioscleróticas, pero no hay un coeficiente previo publicado que nos de un grado de severidad

en la afectación de la pared vascular, según unos parámetros de afectación.

En un nuestro estudio, hemos establecido un sistema de puntuación considerando un rango de puntos para los siguientes parámetros: valoración semicuantitativa modificada de los grados de lesión de Stary, el grosor de la capa media, el grosor de la placa de ateroma, el grosor de la capa íntima, el grosor de la  $\alpha$ -actina subendotelial, la densidad de volumen de  $\alpha$ -actina y la densidad integrada de  $\alpha$ -actina en la capa íntima, el grosor de la pared, la relación pared/luz y el grado de oclusión de la luz en los vasos de los troncos supra-aórticos; y se ha realizado una escala de valores. La media de su sumatorio nos da un índice denominado “coeficiente aterogénico”, cuyo valor nos da una idea del grado de afectación y severidad de cada grupo experimental.

El grupo de progresión con dieta hiperlipémica (B), es el de mayor coeficiente aterogénico, y como en estudios previos ya comentados anteriormente, al interferir bien con la dieta o con fármacos, en este caso con atorvastatina, se produce una mejoría de la arteriosclerosis, objetivando en nuestros grupos de experimentación una mejoría paralela del coeficiente aterogénico, constatando el beneficio de la regresión espontánea e inducida con atorvastatina, sobre todo en el grupo donde se aplican ambas, el grupo de regresión espontánea y farmacológica (grupo D).

Basándonos en la clasificación de NAS (Kleiner y col., 2005) para la enfermedad hepática grasa no alcohólica, el cuál permite dar un índice de actividad histológica de la enfermedad en el hígado, nuestro coeficiente aterogénico nos informa de igual manera del índice de afectación histológica en los vasos vasculares, cuya puntuación se detalla a continuación, según los datos obtenidos.

“Coeficiente aterogénico”:

≥ 10	Afectación aterogénica
8 - 9	Afectación dudosa
< 8	Sano, no aterogénico

Según dicho coeficiente aterogénico, el grupo con regresión espontánea y farmacológica (D), con un CA de 6.37 pertenecería al “no aterogénico”, revierte hasta quedar la afectación de los troncos supra-aórticos como un vaso sano.

Hemos descrito por primera vez este coeficiente aterogénico. Incluye características histológicas muy detalladas en cuanto a la afectación de todas las partes involucradas de la anatomía de la pared vascular, por lo que supone un sistema de puntuación muy concreto. Este coeficiente es muy sensible a la lesión y permite realizar la comparación de los cinco grupos de experimentación, donde se ha reproducido tanto la progresión como la regresión de la arteriosclerosis, obteniendo un índice de comparación entre los grupos. Es por tanto, un coeficiente innovador y minucioso en cuanto a su valoración, y a la vez dinámico, que nos informa de la afectación del vaso como proceso en continuo cambio si actuamos sobre la dieta y con tratamiento farmacológico, como son las estatinas, con un poder hipolipemiante e intrínseco, o mejor dicho, con propiedades pleiotrópicas, como en nuestro caso, con atorvastatina.

### **8.12. Correlación hígado - troncos supra-aórticos (NAS-CA)**

Revisando la literatura de los trabajos publicados, no hay previamente estudios en experimentación animal que comparen simultáneamente por métodos histológicos, la afectación a nivel hepático con la reproducción de esteatohepatitis y la afectación vascular de arteriosclerosis, tanto en fase de progresión como en fase de regresión inducida, espontánea y farmacológica. De ello, la aportación original del presente estudio de investigación.

En personas se han realizado comparaciones y asociaciones entre esteatosis hepática con un incremento del riesgo de aterosclerosis carotídea, medidos por ecografía hepática y ecografía carotídea (Targher y col., 2004; Brea y col., 2005 y Volzke y col., 2005).

Más tarde se realiza por primera vez una comparación histológica del hígado con ecografía carotídea (Targher y col., 2005). No sólo se confirman los resultados anteriores que documentan que los pacientes con EGHNA, diagnosticados por ecografía tienen un GIM en arteria carótida más marcado con incremento de la prevalencia de placas carotídeas, sino que al realizarse biopsia hepática en un estudio piloto de 50 pacientes con EGHNA comparados con 40 personas sanas con ecografía hepática y transaminasas normales, se observa que hay una fuerte asociación entre el grado de fibrosis hepática y el engrosamiento carotídeo (GIM), después de ajustarlo para la edad, sexo, resistencia a la insulina y síndrome metabólico.

Después de estos resultados el estudio se amplió a 85 pacientes con EGHNA con transaminasas elevadas y esteatosis hepática detectada por ecografía (Targher y col., 2006). Se les realizó biopsia hepática tras excluir otras causas de enfermedad hepática crónica (ingesta etílica mayor o igual a 20 gr/día, hepatitis viral, autoinmune y administración de fármacos hepatotóxicos), sin evidencia de enfermedad hepática o renal avanzada, eventos cardiovasculares o historia reciente de enfermedad aguda. El grupo control consistió en 160 personas sanas con ecografía y transaminasas normales, comparadas por edad, sexo e IMC. En los resultados se demostró nuevamente que los pacientes con EGHNA demostrada por biopsia tienen un mayor grado de engrosamiento carotídeo, sin diferencias entre hombres y mujeres, y una mayor prevalencia de placas carotídeas definidas como un engrosamiento focal mayor o igual a 1.2 mm. A su vez, este engrosamiento carotídeo muestra una diferencia significativa entre los pacientes con esteatohepatitis, los pacientes con esteatosis simple y los pacientes control, siendo menor en

éste último grupo, intermedio en los pacientes con esteatosis y mayor en los que presenta esteatohepatitis.

Por último, la severidad en la histología de la EGHNA predice de forma independiente el GIM carotídeo después de ajustarlo para un amplio espectro de variables, incluyendo el síndrome metabólico, una condición altamente aterogénica que está fuertemente relacionada con la EGHNA. Así, la EGHNA en su forma más avanzada podría ser un estímulo para un mayor incremento de la resistencia a la insulina y dislipemia, conduciendo a una arteriosclerosis acelerada, lo cuál podría ser representado por un incremento del estrés oxidativo y una inflamación subclínica.

En ese mismo año, se llevó a cabo otro estudio que demuestra una asociación significativa entre la histología hepática y la disfunción endotelial (Villanova y col., 2005). En pacientes con EGHNA demostrada por biopsia hepática, se midió la disfunción endotelial por vasodilatación mediada por flujo, viendo que la severidad de la histología hepática se correlacionaba con un menor flujo, independientemente de la edad, sexo, IMC y resistencia a la insulina. E incluso, la probabilidad estimada de eventos cardiovasculares era moderadamente más alta en los pacientes con EGHNA.

Posteriormente se ha realizado un metaanálisis (Sookoian y Pirola, 2008) evaluando siete estudios con un total de 3497 personas. En todos ellos el GIM de la carótida fue medido por ecografía por una persona que desconocía las características clínicas de los pacientes, realizando medidas bilateralmente a nivel de la arteria carótida común. El diagnóstico de EGHNA fue realizado en todos los estudios por ecografía abdominal referido como “hígado brillante” o incremento difuso de la ecogenicidad comparado con el riñón, y en algunos estudios la grasa hepática fue confirmada por biopsia hepática. Dicho metaanálisis mostró una fuerte asociación entre EGHNA y el GIM carotídeo, mostrando que los pacientes con esteatosis hepática tienen un incremento del 13% de GIM en comparación con individuos sin hígado graso. También demostró una

fuerte asociación entre los niveles de transaminasas con el GIM y la presencia de placas carotídeas. Sólo en un estudio de los incluidos se objetivaba una asociación del GIM carotídeo según la severidad de la histología hepática (Targher y col. 2006), pues en el resto de los estudios como se ha comentado previamente no se realizaron biopsias del hígado.

Moreno Sánchez (2009) en una puesta al día sobre hígado graso no alcohólico, en la esteatosis hepática refiere una acumulación progresiva de triglicéridos en el hígado, con deterioro creciente de la sensibilidad a la insulina en el propio hígado, en el músculo esquelético y en el tejido adiposo. El estudio se llevó a cabo en individuos obesos no diabéticos, lo que avala la hipótesis de que la EGHNA es parte de una alteración multiorgánica de sensibilidad a la insulina.

En este contexto de resistencia a la insulina, el perfil de citoquinas sintetizadas en el tejido adiposo es proinflamatorio, protrombótico y profibrogénico, por lo que se asocia de manera independiente a una disfunción endotelial y a placas ateromatosas, así como a un engrosamiento de la capa íntima de las carótidas.

En una encuesta norteamericana correspondiente al período de 1999 a 2002 (Iannou y col., 2006), la prevalencia de elevación de GPT mayor de 43 U/l en la población fue del 8.95, casi el doble de la del período de 1988 a 1994 y en asociación estrecha a factores de riesgo para EGHNA (obesidad, DM tipo 2, HTA e hipertrigliceridemia). Según la escala de Framingham se estimó el riesgo a 10 años de enfermedad coronaria, y fue mayor en los individuos con GPT elevada que en el grupo control, tanto en varones como en mujeres.

Por tanto, queda claramente demostrado que existe una asociación entre la EGHNA y la arteriosclerosis carotídea. En animales, existen múltiples estudios de progresión y regresión de arteriosclerosis, y por otro lado de EGHNA de forma individualizada, siendo pocos los trabajos en los que se combinan ambos aspectos de forma conjunta.

En la mayoría de estudios animales de forma espontánea desarrollan esteatosis, siendo más difícil la progresión a esteatohepatitis (Tous y col., 2005). En ratones Apo E<sup>-/-</sup> tras dieta rica en colesterol y dieta enriquecida con grasa realizan una correlación cronológica entre las alteraciones hepáticas, la aterosclerosis y el aumento de colesterol sanguíneo, consiguiendo esteatohepatitis. En el hígado valoran la esteatosis, el grado de inflamación y los macrófagos, comparados con la cuantificación de las lesiones arteriosclerosas en la región aórtica proximal por medio de la tinción con Sudán rojo IV B y la tinción de hematoxilina-eosina. En el resultado llegan a la conclusión de la existencia de una correlación cronológica y cuantitativa entre el daño hepático y la formación de las lesiones ateromatosas. Esto apoya la existencia de factores circulantes comunes que induzcan reacciones inflamatorias en estos tejidos distantes, coincidiendo el grado de las lesiones con incrementos importantes de colesterol plasmático asociado a lipoproteínas aterogénicas (LDL y VLDL).

También en ratones Apo E<sup>-/-</sup> (Lohmann y col., 2009) en un estudio de progresión con dieta hipercolesterolémica, muestran un incremento de macrófagos, células T y algunos mediadores inflamatorios en la raíz de la aorta, tejido adiposo mesentérico y periaórtico (periadventicial), hígado e islotes pancreáticos sin alteración en la homeostasis de la glucosa. Realizan el estudio a través del examen histológico del tamaño y composición de la placa de ateroma en la raíz de la aorta, y con técnicas de inmunohistoquímica para macrófagos (CD68) y células T (CD3) en todos los tejidos examinados, junto con la medida plasmática de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres. Todo ello proporciona un fenotipo proinflamatorio con unos efectos sistémicos y locales en la arteriosclerosis experimental sin obesidad, en contraposición con estudios que describen una inflamación sistémica en la obesidad o una inflamación local perivascular en la aterosclerosis.

Por último, Bieghs y col. (2012) revisan el conocimiento actual sobre la similitud en epidemiología, patofisiología, diagnóstico y tratamiento de la arteriosclerosis y el NASH, proponiendo la hipótesis de que son dos aspectos de una enfermedad compartida, con una etiología común que involucra la presencia local de macrófagos activados. La lipotoxicidad crónica por los efectos tóxicos del colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres, contribuye a la patogénesis de la arteriosclerosis y del NASH, pudiendo la esteatohepatitis no alcohólica contribuir y acelerar la patogénesis de la aterosclerosis.

Nuestro trabajo, avala estos resultados, y además con la salvedad de ser el primer estudio experimental donde se coteja a la vez la afectación histológica en el hígado con la afectación histológica de los troncos supra-aórticos, y el resultado tras la retirada de la dieta y el tratamiento con atorvastatina.

Por un lado, Martín Castillo (2008), estimó el NAS-cuantitativo de los mismos grupos de animales de experimentación, obteniendo una puntuación según el grado de severidad, y por otro lado se ha obtenido el coeficiente aterogénico, el cuál refleja el grado de afectación a nivel de los vasos supra-aórticos. Según los resultados obtenidos, se demuestra un comportamiento similar comparando ambos parámetros, tienen una evolución en paralelo, una asociación positiva.

Tanto en el NAS hepático como en el coeficiente aterogénico de los troncos supra-aórticos, es el grupo con mayor afectación de forma estadísticamente significativa, el grupo de dieta hiperlipémica durante seis meses (B). El grupo de animales alimentados con dieta normal (A) y el grupo de regresión espontánea y farmacológica (D) muestran un valor muchísimo menor que el resto de los grupos de experimentación. Y los animales que tras tres meses volvieron a una dieta normal, regresión espontánea (C), junto con los animales que siguen una dieta hiperlipémica más atorvastatina, el grupo de progresión farmacológica (E) tienen una afectación intermedia, en los cuáles se observa que ha

revertido parcialmente la afectación. Se demuestra pues, que a mayor afectación hepática hay una asociación positiva con una mayor afectación en troncos supra-aórticos, como en estudios previos realizados en personas, junto con una mejoría tras la dieta y la administración de atorvastatina.

En los dos grupos de afectación intermedia, el de regresión espontánea (C) y el de progresión farmacológica (E), sí se observa una diferencia entre ambos parámetros o coeficientes. El coeficiente aterogénico es menor en el grupo E, y el NAS sin embargo, tiene un valor más alto en el grupo E comparado con el grupo C.

Si nos centramos en el conjunto global de la fisiopatología de la arteriosclerosis, ésta es una enfermedad sistémica que se caracteriza principalmente por un depósito de lípidos en la pared de las arterias de mediano y gran calibre. El acúmulo de lípidos en la pared arterial es un proceso dinámico y bidireccional en el que hay mecanismos naturales de extracción del colesterol acumulado en la pared del vaso, y la arteriosclerosis es consecuencia de un desbalance entre la salida y entrada de colesterol.

El “transporte reverso de colesterol” (TRC) es la mejor ruta para la retirada del colesterol depositado en los tejidos y que no se metaboliza, y su transporte hacia el hígado para su metabolización y eventual excreción intestinal con los ácidos biliares (Reichl y Miller, 1986). El concepto del papel que juega la HDL en el TRC, como partícula que sirve de basurero del colesterol tisular, es decir, en la extracción de colesterol de las lesiones ateroscleróticas y en su transporte hasta el hígado para su eliminación junto con las heces, ha sido ampliamente aceptado desde que fue postulado hace más de treinta años (Glomset, 1968).

El primer estudio in vivo, experimental que evidencia el efecto de HDL exógeno, con remisión de las lesiones ateromatosas en un modelo animal realizado con conejos (Badimon y col., 1990) apoya fuertemente estudios

previos donde la HDL estimula el TRC de los tejidos extrahepáticos hasta el hígado, donde puede ser metabolizado y excretado, y miden la acumulación de colesterol en el hígado, pero sin realizar una valoración histológica de la afectación hepática. Recientemente se ha hecho referencia a varios estudios tanto en animales como en modelos humanos, donde la perfusión exógena de HDL Milano es capaz de disminuir el volumen de la placa (Ibáñez, 2010), cuyos efectos beneficiosos se deben a un incremento importante del TRC como a un efecto antiinflamatorio generalizado, promoviendo un rescate del estado inflamatorio global asociado con la enfermedad aterotrombótica.

Nuestros resultados del coeficiente aterogénico y NAS en los grupos C y E estarían de acuerdo con la teoría de un TRC, que supondría la retirada del colesterol del vaso supra-aórtico y su transporte hacia el hígado. Además también ayudaría a estos valores de coeficiente aterogénico y NAS del grupo E, la acción antiinflamatoria de la atorvastatina.

Demostramos que hay asociación o correlación en la afectación de ambas lesiones en hígado y vasos arteriales histológicamente. Esta es una correlación positiva con los mismos tratamientos de regresión espontánea y farmacológica, tras comparar los cinco grupos de experimentación como una única población. Sin embargo si estrictamente comparamos cada grupo por separado, la correlación entre NAS y CA sólo es significativa en los grupos de regresión espontánea (C) y regresión espontánea y farmacológica (D).

Previamente no hay estudios similares en regresión y progresión de arteriosclerosis con una correlación tan completa y detallada en cuanto a su afectación, de troncos supra-aórticos e hígado, por microscopía óptica. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo común en ambas enfermedades, o mejor dicho un factor común sistémico que produzca dos aspectos distintos de una misma enfermedad.

Por último, con los datos obtenidos, observamos que son procesos que se producen en paralelo en hígado y vasculatura arterial, por lo que no se puede concluir que sea la EHGNA la que contribuya y acelere la arteriosclerosis. La afectación progresa y regresa simultáneamente al mejorar el estado proinflamatorio, sin poder concluir si hay una dependencia entre ambos.



## Capítulo 9

### CONCLUSIONES



Las conclusiones del presente trabajo experimental son las siguientes:

1. El diseño experimental empleado con dieta aterogénica (pienso estándar con 2% de colesterol y 20% de aceite de palma) ha reproducido en los pollos de la raza White Leghorn las características histológicas de arteriosclerosis en troncos supra-aórticos en un periodo corto de tiempo. Así pues, el pollo es un biomodelo experimental adecuado para reproducir las lesiones arteriosclerosas humanas y estudiar los procesos de regresión espontánea, farmacológica y progresión farmacológica.
2. Se ha demostrado una atrofia de la capa media, al proliferar las células musculares lisas y migrar hacia la capa íntima, con un aumento importante del grosor de ésta, en todos los grupos experimentales, en comparación con respecto al grupo de dieta normal.
3. El grosor de la capa íntima tanto en los grupos de progresión como regresión juega un papel importante en la valoración de la afectación de la arteriosclerosis, al mantenerse constante el grosor de la capa media atrofiada.
4. Se ha descrito por primera vez un “coeficiente aterogénico” (CA) elaborado a partir de un conjunto de parámetros medidos en los troncos supra-aórticos. Se trata de un coeficiente altamente sensible para valorar el grado de severidad de la arteriosclerosis.
5. En los dos grupos experimentales tratados con una estatina, atorvastatina, se obtiene un menor coeficiente aterogénico, lo que indica una menor afectación vascular de la arteriosclerosis. Se deduce que la atorvastatina juega un papel importante tanto en la mejoría del perfil lipídico como en sus posibles efectos pleiotrópicos.
6. La regresión espontánea presenta una tendencia a promover placas de ateroma más estables al tener un mayor grosor de fibras musculares lisas

subendoteliales. Por tanto, la retirada por sí sola de la dieta hiperlipémica, confiere un beneficio clínico.

7. Los valores intermedios del coeficiente aterogénico en el grupo de regresión espontánea y en el de progresión farmacológica muestran que ni sólo la dieta ni el tratamiento con atorvastina respectivamente, resultan completamente efectivos en disminuir la progresión de la enfermedad. Así la combinación conjunta de retirada de la dieta hiperlipémica unida a la terapia simultánea con atorvastatina, sería la más beneficiosa para la prevención primaria y secundaria de eventos cardiovasculares en humanos.
8. Tanto en la arteriosclerosis avanzada con grandes placas de ateroma en el grupo de dieta hiperlipémica, donde se observa una estenosis mínima, menor del 60% de oclusión vascular, como en el resto de los grupos donde se ha producido una regresión de la placa de ateroma, la luz del vaso permanece inalterada. Sugerimos un remodelado vascular en ambos sentidos (positivo e inverso, es decir dilatación y contracción) para mantenerse constante. Por tanto nos indica, que existe un proceso continuo, dinámico, de la pared vascular en respuesta a un estímulo sistémico y/o local.
9. Es el primer estudio, donde se correlaciona histológicamente la afectación en hígado “valor de NAS” y en troncos supra-aórticos mediante el “coeficiente aterogénico”, en los mismos diseños experimentales, en progresión y regresión espontánea e inducida farmacológicamente. El resultado nos muestra un comportamiento similar, con una fuerte asociación positiva. Esto supone un argumento más, a favor de la hipótesis de que se trata de dos manifestaciones de una misma enfermedad, producida por un mecanismo en común a nivel sistémico, pues se afectan dos tejidos distantes, que a su vez provoca una inflamación local, como es la hipercolesterolemia con aumento del LDL.

10. Comparando los valores de coeficiente aterogénico y NAS en cada grupo se demuestra que en la afectación vascular hay una mayor lesión en el grupo de regresión espontánea con respecto al grupo de progresión farmacológica. Sin embargo las lesiones en el hígado siguen un patrón inverso. Sugerimos que estos resultados posiblemente se deban a que la atorvastatina, al elevar el nivel de HDL, aumenta el transporte reverso de colesterol de los tejidos extrahepáticos hacia el hígado, mejorando a nivel vascular y empeorando a nivel hepático en un intento de eliminar y expulsar el colesterol.



## **Capítulo 10**

### **BIBLIOGRAFÍA**



- Adánez Martínez G. Estudio microscópico e inmunocitoquímico en riñones de pollo sometidos a dieta hiperlipémica. Efecto de la atorvastatina sobre el modelo aviario de regresión-progresión. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, 2006.
- Adánez G, Martín Castillo, Sánchez Polo MT, Ayala I, García Pérez B, Castells MT. Hiperlipidemia y lesiones renales en un modelo aviar: estudio inmunocitoquímico. *Clin Invest Arterioscl* 2005; 17: 57.
- Alfón J, Pueyo Palazón C, Royo T, Badimon L. Effects of statins in thrombosis and aortic lesion development in a dyslipemic rabbit model. *Thromb Haemost* 1999; 81:822-827.
- Álvarez De Sotomayor M, Herrera MD, Pérez-Guerrero C, Marhuenda E. Interés terapéutico de las estatinas en el tratamiento de la aterosclerosis. *Ars Pharmaceutica* 1999; 40:217-231.
- Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Burgianesi E, George J, Farrell GC. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver disease. *Hepatology* 2007; 45:846-854.
- Armstrong ML. Evidence of regression of atherosclerosis in primates and man. *Postgrad Med J* 1976; 52:456-461.
- Asakura M, Ueda Y, Yamaguchi O, Adachi T, Hirayama A, Hori M, Kodama K. Extensive development of vulnerable plaques as a pan-coronary process in patients with myocardial infarction: an angioscopic study. *JACC* 2001; 37:1284-1288.
- Ayala I, García Pérez B, Doménech G, Castells M.T, Valdés M. Use of the chicken as experimental animal model in atherosclerosis. *Avian and Poultry Biology Reviews* 2005; 16:151-159.
- Ayala I, García Pérez B, Doménech G, Montes AM, Ortega N, Ortega JV, Sánchez Polo MT. Uso del pollo como biomodelo experimental en arteriosclerosis. *Anales de Veterinaria de Murcia* 2003; 19:99-108.

- Ayala I, García Pérez B, Doménech G, Sánchez Polo MT, Ortega JV, Castells MT. Estudio comparativo de diversos métodos de inducción de aterogénesis experimental en el pollo. *Anales de Veterinaria de Murcia* 2004; 20:123-127.
- Badimon L. Estatinas, función endotelial y disminución de la morbimortalidad cardiovascular. *Rev Clin Esp* 2004; 204(Extr1):2-10.
- Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J. Clin Invest* 1990; 85:1234-1241.
- Badimon JJ, Badimon L, Galvez A, Fuster V. High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty streak lesions in cholesterol-fed rabbits. *Lab Invest* 1989; 60:455-461.
- Badimon L, Vilahur G. Beneficio clínico de las estatinas: ¿hemos cubierto todo el espectro? *Rev Esp Cardiol* 2011; 11:3-13.
- Baptista A, Bianchi L, de Groote J. Alcoholic liver disease: morphological manifestations. Review by an international group. *Lancet* 1981; 1:707-711.
- Bar RS. Interactions of insulin and insulin-like growth factors (IGF) with endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 401:150-162.
- Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol* 1999; 34:513-525.
- Becker U, Deis A, Sørensen TI, Grønbaek M, Borch-Johnsen K, Müller CF, Schnohr P, Jensen G. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study. *Hepatology* 1996; 23:1025-1029.
- Beeuwkes R III, Barger AC, Silverman KJ, Lainey LL. Cinemicrographic studies of the vasa vasorum of human coronary arteries. *Pathobiology of the Human Atherosclerotic Plaque*. New York, NY: Springer-Verlag; 1990: 425-432.
- Behrendt D, Ganz P. Endothelial function from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90:40L-48L.

- Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96:939-949.
- Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990; 85:1260-1266.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:9238-9242.
- Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuffi AG, Buffon A. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99:855-860.
- Bieghs V, Rensen PCN, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R. NASH and atherosclerosis are two aspects of a shared disease: Central role for macrophages. *Atherosclerosis* 2012; 220:287-293.
- Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Gómez-Hernández A, Tuñón J y Egido J. Estatinas. Nuevos efectos pleiotrópicos: antiinflamatorio e inmunomodulador. *Clin Invest Arterioscl* 2004; 16:40-44.
- Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1045-1500.
- Brea A, Puzo J. Enfermedad del hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular. *Clin Invest Arterioscl* 2010; 22:259-271.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2467-2474.
- Burke JN, Ross R. Synthesis of connective tissue macromolecules by smooth muscle. *Int Rev Connect Tissue Res* 1979; 8:119-153.
- Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15:246-258.

- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.
- Chitturi S, Farrell G. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21:27-41.
- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122:1649-1657.
- Clemente Ricote G, García Monzón C. Estado actual de la esteatohepatitis no alcohólica. *Med Clin (Barc)* 2003; 121:102-108.
- Coates RA, Halliday ML, Rankin JG, Feinman SV, Fisher MM. Risk of fatty liver infiltration of cirrhosis of the liver in relation to ethanol consumption: a case-control study. *Clin Invest Med* 1986; 9:26-32.
- Contreas-Leal EA, Santiago-García J. Obesidad, síndrome metabólico y su impacto en las enfermedades cardiovasculares. *Rev Biomed* 2011; 22:103-115.
- Corti R, Fuster V, Badimon JJ, Hutter R, Fayad ZA. New understanding of atherosclerosis (clinically and experimentally) with evolving MRI technology in vivo. *Ann NY Acad Sci* 2001; 947:181-195.
- Corti R, Fuster V, Fayad ZA, Worthley SG, Helft G, Smith D. Lipid lowering by simvastatin induces regression of human atherosclerotic lesions two years follow-up by high-resolution noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation* 2002; 106:2884-2887.
- Daoud AS, Walsh A, Ito Y, Breslow JL. Sequential morphologic studies of regression of advanced atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1981; 105:233-239.
- Datillo AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a metaanalysis. *Am J Clin Nutr* 1992; 56:320-328.
- Dauber DV, Katz LN. Experimental atherosclerosis in the chick. *AMA Arch Pathol* 1943; 36:473-492.

- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:27-32.
- De Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart JC. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker of atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:33-38.
- De Taeye B, Smith LH, Vaughan DE. Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5:149-154.
- Donetti E, Piliego T, Raule G, Mewton R, Calore M, Paoletti R, Fumagalli R, Soma MR. Pharmacological modulation of neointimal hyperplasia in hyper and normocholesterolemic rabbits: A comparison among different HMG-Coa reductase inhibitors. 11th International Symposium on Atherosclerosis, Paris, 1997: 34-48.
- Egawa T, Toda K, Nemoto Y, Ono M, Akisaw N, Saibara T, Hayashi Y, Hiori M, Enzan H, Onishi S. Pitavastatin ameliorates severe hepatic steatosis in aromatase-deficient (Ar<sup>-/-</sup>) mice. *Lipids* 2003; 85:19-23.
- Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Statins in non-alcoholic fatty liver disease and chronically elevated liver enzymes: A histopathological follow-up study. *J Hepatol* 2007; 47:135-141.
- Elkin RG, Yan Z, Buhman KK, Story JA, Turek JJ, Anderson M, Homan R, Newton RS. Reduction of egg yolk cholesterol content through inhibition of hepatic cholesterol biosynthesis and alteration of plasma VLDL composition in laying hens: comparative effects of atorvastatin, lovastatin, and simvastatin. *Atherosclerosis* 1997; 134:123-132.
- Escudero I, Martínez-González J, Alonso R, Mata P, Badimon L. Experimental and interventional dietary study in humans on the role of HDL fatty acid composition in PGI<sub>2</sub> release and Cox-2 expression by VSMC. *Eur J Clin Invest* 2003; 33:779-786.

- Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate, part I: changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1984; 4:323-340.
- Fayad ZA, Fuster V. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circulation Research* 2001; 89:305-316.
- Fayad ZA, Nahar T, Fallon JT. In vivo magnetic resonance evaluation of atherosclerotic plaques in the human thoracic aorta: a comparison with transesophageal echocardiography. *Circulation* 2000; 101:2503-2509.
- Ferreira IJ, Laclaustra M, Casasnovas JA y del Río A. Síndrome metabólico. Concepto. Su relación con la aterosclerosis. *Manual de cardiología preventiva. Sociedad Española de Cardiología*; 2005: 131-144.
- Fogelman AM, Berliner JA, Van Lenten BJ, Navab M, Territo M. Lipoprotein receptors and endothelial cells. *Semin Thromb Hemost* 1988; 14:206-209.
- Franklin SS, Larson MG, Khan SA, Wong ND, Leip EP, Kannel WB. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. *Circulation* 2001; 103:1245-1249.
- Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill C, Enomoto M, Hirouchi Y. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of WHHL rabbits. *Circulation* 2001; 103:993-999.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
- Fuster V. Enfermedad crónica multivazo: ayer, hoy y mañana. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61:2-9.
- Fuster V. Epidemic of cardiovascular disease and stroke: the three main challenges. *Circulation* 1999; 99:1132-1137.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. Parts 1 and 2. *N Engl J Med* 1992; 326:242-250, 310-318.

- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodelling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Cir Res* 2002; 90:251-262.
- García Pérez B. Efecto del nifedipino, verapamilo y diltiazem sobre la placa arteriosclerosa inducida experimentalmente en pollos alimentados con huevos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, 1992.
- García Pérez B, Ayala I, Castells MT, Doménech G, Sánchez Polo MT, García-Partida P, Valdés M. Effects of nifedipine, verapamil and diltiazem on serum biochemical parameters and aortic composition of atherosclerotic chickens. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2005; 59:1-7.
- García Pérez B, Ayala I, Castells MT, Madrid JF, Ortega MR, Ortega JV, Ballesta J, Fernández Pardo J, Valdés M. Planimetric and histological study of the aortae in atherosclerotic chickens treated with nifedipine, verapamil and diltiazem. *Histol Histopathol* 2003; 18:1027-1033.
- Georgescu E, Georgescu M. Therapeutic options in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Are all agents alike? Results of a preliminary study. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007; 16:39-46.
- Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis, II: migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1981; 103:191-200.
- Ghesquiere Stijn AI. Anatomy overview of a human artery. PhD project Maastricht, November 2005.
- Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 1999; 155:1-5.
- Giménez M, Nicolau J, Conget I. Síndrome metabólico. Definición y epidemiología. *Rev Clin Esp* 2006; 206:3-6.
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316:1371-1375.
- Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112:1018-1031.

- Glomset JA. The plasma leacithin-cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968; 9:155-167.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-430.
- Gómez E, Mendoza J, Rubio S, Moreno JA, García L, Moreno R. Eficacia de la atorvastatina en el tratamiento del hígado graso no alcohólico. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29:172-173.
- González Albarrán O. Etiopatogenia del síndrome metabólico. *Rev Clin Esp* 2006; 206:7-13.
- Guidelines Subcommittee. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens* 1999; 17:151-183.
- Hajjar I, Kotchen TA. Trends in Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA* 2003; 290:199-206.
- Hatzitolios A, Savopoulos C, Lazaraki G, Sidiropoulos I, Haritanti P, Lefkopoulos A, Karagiannopoulou G, Tzioufa V, Dimitrios K. Efficacy of omega-3 fatty acids, atorvastatin and orlistat in non-alcoholic fatty liver disease with dyslipidemia. *Indian J Gastroenterol* 2004; 23:131-134.
- Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20.536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2002; 360:7-22.
- Hernández-Presa MA, Martín-Ventura JL, Ortego M, Gómez-Hernández A, Tuñón J, Hernández-Vargas P. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002; 160:49-58.
- Horlander JC, Kwo PY, Cummings OW, Kouloulis G. Atorvastatin for the treatment of NASH. *Gastroenterology* 2001; 120:A544.

- Horlick L, Katz LN. Retrogression of atherosclerotic lesions on cessation of cholesterol feeding in the chick. *J Lab Clin Med* 1949; 34:1427-1472.
- Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Oxford: BIOS scientific published; 1998.
- Hutter R, Valdivieso C, Sauter BV, Savontaus M, Chereshev I, Carrick FE. Caspase-3 and tissue factor expression in lipid-rich plaque macrophages. *Circulation* 2004; 109:2001-2008.
- Hüttner I, Boutet M, More RH. Studies on protein passage through arterial endothelium: II. Regional differences in permeability to fine structural protein tracers in arterial endothelium of normotensive rat. *Lab Invest* 1973; 28:678-685.
- Hüttner I, Boutet M, Rona G, More RH. Studies of protein passage through arterial endothelium: III. Effect of blood pressure levels on the passage of fine structural protein tracers through rat arterial endothelium. *Lab Invest* 1973; 29:536-546.
- Ibáñez B. Lipoproteínas de alta densidad y regresión de la arteriosclerosis: desde la teoría hasta la imagen. *Clin Invest Arterioscl* 2010; 22:26-30.
- Ibáñez B, Vilahur G, Cimmino G, Speidl WS, Pinero A, Choi BG. Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:1104-1109.
- Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999-2002. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:76-82.
- Ishak K. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:696-699.

- Jaranta E, Mateo-Gallego R, Bea A, Burillo E, Calmarza P, Civeira F. Grosor íntima-media carotídeo en sujetos sin factores de riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 2010; 63:97-102.
- Juan-Babot J, Martínez-González J, Berrozpe M, Badimon L. Neovascularization in human coronary arteries with lesions of different severity. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56:978-986.
- Junyent, M., Gilabert R, Núñez I, Corbella E, Vela M, Zambón D, Ros E. Ecografía carotídea en la evaluación de aterosclerosis preclínica. Distribución de valores del grosor íntima-media y frecuencia de placas de ateroma en una cohorte comunitaria española. *Med Clin (Barc)* 2005; 125:770-774.
- Kastelein JJP, De Groot E, Sakatsing R. Atherosclerosis measured by B-mode ultrasonography: effects of statin therapy on disease progression. *Am J Med* 2004; 116:31S-36S.
- Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. VEGF stimulates expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin through nuclear factor-kappaB activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276:7614-7620.
- Kiyici M, Gulden M, Gurel S, Nalk SG, Dolar E, Savci G, Adim SB, Yerci O, Memik F. Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol* 2003; 17:713-718.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW. The Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41:1313-1321.
- Kockx MM, Cromheeke KM, Knaapen MW, Bosmans JM, De Meyer GR, Herman AG. Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:440-446.
- Kon V, Jabs K. Angiotensin in atherosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13:291-297.

- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5:834-842.
- Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation: positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* 1985; 5:293-302.
- Lahoz C, Mostaza JM. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60:185-195.
- Landmesser U, Horning B, Drexler H. Endothelial function. A critical determinant in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:27-33.
- La Rosa JC. Reduction of serum LDL-C levels: a relationship to clinical benefits. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003; 3:271-281.
- Leone A. Relationship between cigarette smoking and other coronary risk factors in atherosclerosis: risk of cardiovascular disease and preventive measures. *Curr Pharm Des* 2003; 9:2417-2423.
- Levin EG, Loskutoff DJ. Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators. *J Cell Biol* 1982; 94:631-636.
- Lewis JC, Taylor RG, Jerome WG. Foam cell characteristics in coronary arteries and aortas of White Carneau pigeons with moderate hypercholesterolemia. *Ann NY Acad Sci* 1985; 454: 91-100.
- Lindstedt KA, Kovanen PT. Mast cells in vulnerable coronary plaques: potential mechanisms linking mast cell activation to plaque erosion and rupture. *Current Opinion in Lipidology* 2004; 15:567-573.
- Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Current Opinion Lipidology* 2003; 14:469-475.
- Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Camino-López S, Llampayas O, Badimon L. Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane

- tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004; 110:452-459.
- Llyons TJ. Lipoproteins glycation and its metabolic consequences. *Diabetes* 1992; 41:67-73.
  - Lohmann C, Schäfer N, von Lukowicz T, Sokrates Stein MA, Borén J, Rütli S, Wahli W, Donath MY, Lüscher T, Matter CM. Atherosclerotic mice exhibit systemic inflammation in periaortic and visceral adipose tissue, liver, and pancreatic islets. *Atherosclerosis* 2009; 207:360-367.
  - Lorenz MW, Von Kegler S, Steinmetz H, Markus HS, Sitzer M. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke* 2006; 37:87-92.
  - Ludwig J, Mc Gill DB, Lindor KD. Review: non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12:398-403.
  - Malinow MR. Experimental Models of Atherosclerosis Regression. *Atherosclerosis* 1983; 48:105-118.
  - Maresca G, Di Blasio A, Marchioli R, Di Minno G. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction. An update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1368-1377.
  - Martín Castillo A. Efecto de la atorvastatina sobre la enfermedad grasa del hígado no alcohólica (EGHNA) inducida en pollos mediante una dieta hiperlipémica. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, 2008.
  - Martín Castillo A, Adánez G, Sánchez Polo MT, Ayala I, García Pérez B, Castells MT. Valoración cuantitativa de los acúmulos grasos en esteatosis hepática aviar mediante análisis de imagen. *Clin Invest Arterioscl* 2005; 17:64.
  - Martín Castillo A, García Pérez B, Ayala I, Adánez G, Ortega JV, Sánchez Polo MT, Castells MT. Evaluación macroscópica y microscópica del efecto de la atorvastatina sobre la progresión-regresión de la esteatosis hepática en un modelo aviar. *Clin Invest Arterioscl* 2005; 17:270-276.

- Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Pulain P, Fruchart JC. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR $\alpha$  and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* 2001; 1107:1423-1432.
- Martínez-González J, Alfón J, Berrozpe M, Badimon L. HMG-CoA reductase inhibitors reduce vascular MCP-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2001; 159:27-33.
- Maruffo CA, Portman OW. Nutritional control of coronary artery atherosclerosis in the squirrel monkey. *J Atheroscler Res* 1968; 8:237-247.
- Matsumoto A, Naito M, Itakura H, Ikemoto S, Asaoka H, Hayakawa I, Kanamori H, Aburatani H, Takaku F, Suzuki H. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9133-9137.
- McDermott MM, Greenland P, Liu K. Leg symptoms in peripheral arterial disease: associated clinical characteristics and functional impairment. *JAMA* 2001; 286:1599-1606.
- Mendelsohn ME, Karas RM. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340:1801-1811.
- Miana M, Sanz-Rosa D, de las Heras N, Aragoncillo P, Martín B, Ballestros S. Efecto de la atorvastatina sobre la expresión vascular de los PPAR en conejos hiperlipémicos. *Clin Invest Arterioscl* 2007; 19:166-173.
- Michaud CM, Murray CJL, Bloom BR. Burden of disease-implications for future research. *JAMA* 2001; 285:535-539.
- Miettinen H, Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Proteinuria predicts stroke and other atherosclerotic vascular disease events in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Stroke* 1996; 27:2033-2039.
- Miyazaki A, Sakuma S, Morikawa W, Takiue T, Miake F, Terano T, Sakai M, Hakamata H, Sakamoto Y, Natio M. Intravenous injection of rabbit

- apolipoproteína A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1882-1888.
- Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGI<sub>2</sub> or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall: An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 1977; 11:323-344.
  - Moncada S, Palmer RMJ, Higgs AE. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988; 12:365-372.
  - Morel DW, Di Corleto PC, Chilsom GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis* 1984; 4:357-364.
  - Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* 2004; 110:2032-2038.
  - Moreno Sánchez D. Avances en hígado graso no alcohólico. *Medicina Clinica* 2009; 133:258-260.
  - Mostaza JM. Nuevas dianas terapéuticas en el metabolismo lipoproteico. *Clin Invest Arterioscl* 2004; 16:33-39.
  - Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. Excess weight as a risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 1997; 25:108-111.
  - Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37:1202-1219.
  - Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, Schoenhagen P, Crowe T, Kapadia S. Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I Milano. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:992-997.

- Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Anatomy of the domestic birds. Verlag Paul Parey. Berlin, Hamburg 1997.
- Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, Libby P, Raichlen JS, Ballantyne CM. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006; 295:1556-1565.
- Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M. Effect of recombinant ApoA-1 Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomised controlled trial. *JAMA* 2003; 290:2292-2300.
- Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291:1071-1080.
- Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Orazem J, Magorien RD, O'Shaughnessy C, Ganz P, for the Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering (REVERSAL) Investigators. Statin Therapy, LDL Cholesterol, C-Reactive Protein, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2005; 352:29-38.
- Nobuyoshi M, Tanaka M, Nosaka H, Kimura T, Yokoi H, Hamasaki N, Kim K, Shindo T, Kimura K. Progression of coronary atherosclerosis: is coronary spasm related to progression? *J Am Coll Cardiol* 1991; 18:904-910.
- Nordt TK, Peter K, Ruef J, Kübler W, Bode C. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and its role in cardiovascular disease. *Thromb Haemos* 1999; 82:14-18.
- Orbe J, Fernández L, Rodríguez JA, Rábago G, Belzunce M, Monasterio A. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis* 2003; 170:269-276.

- Ortega JV, Ayala I, García Pérez B, Sánchez Polo MT, Castells MT. Uso de estatinas en biomodelos experimentales de arteriosclerosis. *Anales de Veterinaria de Murcia* 2004; 20:49-57.
- Ortega JV, García Pérez B, Fernández Pardo J, Castells MT, Escobar S, Valdés M. Efecto antiaterogénico de la atorvastatina en pollos alimentados con una dieta rica en colesterol. *Clin Invest Arterioscl* 2002; 14: 225-229.
- Ortega Liarte JV. Efecto de la atorvastatina en pollos aterogénicos alimentados con una dieta rica en huevos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, 2002.
- Ouriel K. Peripheral arterial disease. *Lancet* 2001; 358:1257-1264.
- Owen WG, Esmon CT. Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 1981; 256:5532-5535.
- Páramo JA, Montero I, Rodríguez JA, Orbe J. Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Clin Invest Arterioscl* 2005; 17:133-141.
- Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall. A direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986; 74:1399-1406.
- Pollak OJ. Mast cells in the circulatory system of man. *Circulation* 1957; 16:1084-1089.
- Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O. A lipidomic analysis of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007; 46:1081-1090.
- Rangaswamy S, Penn MS, Saidel GM, Chilsolm GM. Exogenous oxidized low density lipoprotein injuries and alters the barrier junction of endothelium in rats in vivo. *Circ Res* 1997; 80:37-44.

- Ratziu V, de Ledinghen V, Oberti F. A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 2011; 54:1011-1019.
- Rauch U, Osende JI, Chesebro JH, Fuster V, Vorcheeinar DA, Harris K. Statins and cardiovascular disease: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins. *Atherosclerosis* 2000; 153:181-189.
- Rauch U, Osende JI, Fuster V. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001; 134:224-238.
- Reichl D, Miller NE. The anatomy and physiology of reverse cholesterol transport. *Clin Sci (Lond)* 1986; 70:221-231.
- Richardson M, Hatton MW, Moore S. Proteoglycan distribution in the intima and media of the aortas of young and aging rabbits: An ultrastructural study. *Atherosclerosis* 1988; 71:243-256.
- Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989; 2: 941-944.
- Ridker PM. Rosuvastatin in the primary prevention of cardiovascular disease among patients with low levels of low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein: rationale and design of the JUPITER trial. *Circulation* 2003; 108:2292-2297.
- Ridker PM, Cannon CP, Morrow K, Rifai N, Rose LM, McCabe CH. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005; 52:20-28.
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJ. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet* 2009; 373:1171-1182.
- Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and

- risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351:88-92.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moyer LA, Goldman S. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) investigators. *Circulation* 1998; 98:839-844.
  - Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347:1557-1565.
  - Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R. Fatty streak initiation in the Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1987; 7:9-23.
  - Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986; 137:1270-1274.
  - Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, Mullen KD, Cooper JN, Sheridan MJ. The utility of radiological imaging in non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123:754-750.
  - Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:1245-1249.
  - Sambola A, Osende J, Hathcock J. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 2003; 107:973-977.
  - Sanguino E, Roglans N, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Atorvastatin reverses age-related reduction of rat hepatic PPAR $\alpha$  and HNF-4. *Br J Pharmacol* 2005; 145:853-861.

- Santos LF, Hernández G, Varón A, Beltrán O, Claudino R, Mejía G. Non alcoholic fatty liver disease. The new millenium pandemia. *Rev Col Gastroenterol* 2010; 25:380-398.
- Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43:682-689.
- Schwart GG, Olson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomised controlled trial. *JAMA* 2001; 285:1711-1718.
- Serruys PW, de Feyter P, Macaya C, Kokott N, Puel J, Vrolix M. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention. A randomised controlled trial. *JAMA* 2002; 287:3215-3222.
- Sezer ED, Sozmen EY, Nart K, Onat T. Effect of atorvastatina therapy on oxideant-antioxidant status and atherosclerotic plaque formation. *Vasc Health Risk Mang* 2011; 7:333-343.
- Sillesen Henrik, MD, DMSc. Estatinas y su uso en la prevención de la enfermedad carotídea. *Current Reports* 2010; 1:35-40.
- Simionescu N, Heltianu C, Antohe F, Simionescu M. Endothelial cell receptors for histamine: *Ann N Y Acad Sci* 1982; 401:132-149.
- Soejima H, Ogawa H, Yasue H. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* 1999; 99:2908-2913.
- Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatology* 2008; 49:600-607.
- Spector AA. Lipid and lipoprotein effects on endothelial eicosanoid formation. *Semin Thromb Hemost* 1988; 14:196-201.

- Sary HC. Atlas of Atherosclerosis Progression and Regression. New York/London; Parthenon Publishing 1999.
- Sary HC. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis* 1987; 64:91-108.
- Sary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1177-1178.
- Sary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life: *Eur Heart J* 1990; 11:3-19.
- Sary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special Report. *Circulation* 1992; 85:391-405.
- Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special Report. *Circulation* 1995; 92:1355-1374.
- Sary HC, Chandler AB, Glagov S. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89:2462-2478.
- Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer A, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis,

American Heart Association. Special Report. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:840-856.

- Stein Y, Stein O. Does therapeutic intervention achieve slowing of progression or bona fide regression of atherosclerotic lesions? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:183-188.
- Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts. *JAMA* 1990; 264:3047-3052.
- Sukhova GK, Willians JK, Libby P. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1452-1458.
- Sundberg M. On the mast cells in the human vascular wall: A quantitative study on changes at different ages. *APMIS* 1955; 107:1-81.
- Svendsen OL, Hassager C, Christiansen C, Nielsen JD, Winther K. Plasminogen activator, and fibrinogen: Effect of dieting with or without exercise in overweight postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:381-385.
- Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Cigolini M, Falezza G, Arcaro G. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006; 29:1325-1330.
- Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Zoppini G, Falezza G. Relation of non-alcoholic hepatic steatosis to early carotid atherosclerosis in healthy men: role of visceral fat accumulation. *Diabetes Care* 2004; 7:1498-1500.
- Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zoppini G, Zenari L, Falezza G. Associations between liver histology and carotid intima-media thickness in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2687-2688.

- Targher G, Christopher P, Day MD, Enzo Bonora MD. Risk of cardiovascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med* 2010; 363:1341-1350.
- Taylor AJ, Lee HJ, Sullenberger LE. The effect of 24 months of combination statin and extended-release niacin on carotid intima-media thickness: ARBITER 3. *Curr Med Res Opin* 2006; 22:2243-2250.
- Thongtang N, Diffenderfer MR, Ooi EM, Asztalos BF, Dolnikowski GG, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. Effects of atorvastatina on human C-reactive protein metabolism. *Atherosclerosis* 2013; 226:466-470.
- Thorgeirsson G, Robertson AL Jr. The vascular endothelium-pathobiologic significance. *Am J Pathol* 1978; 93:804-848.
- Tous M, Ferré N, Camps J, Riu F, Joven J. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 268:53-58.
- Tozer EC, Carew TE. Residence time low-density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circulation* 1997; 80:208-218.
- Tracy RE, Devaney K, Kissling G. Characteristics of the plaque under a coronary thrombus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 405:411-427.
- Ueland PM, Refsum H, Beresford SAA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:324-332.
- Van Der Wal AC, Becker AE, Van Der Loos CM. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89:36-44.
- Van Der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992; 141:1427-1433.

- Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103:2885-2890.
- Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105:546-549.
- Viles-González JF, Fuster V, Badimon JJ. Aterotrombosis: una enfermedad generalizada con consecuencias impredecibles y potencialmente mortales. *European Heart Journal* 2004; 25:1197-1207.
- Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E. Endotelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42:473-478.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb SA, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1262-1275.
- Volzke H, Robinson DM, Kleine V, Deutscher R, Hoffmann W, Ludemann J, Schminke U, Kessler C, John U. Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:1848-1853.
- Walsh A, Ito Y, Breslow JL. High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. *J Biol Chem* 1989; 264:6488-6494.
- Walther C, Gielen S, Hambrecht R. The effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans. *Exerc Sport Sci Rev* 2004; 32:129-134.
- Weiss N, Keller C, Hoffmann U. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2002; 7:227-239.

- Wight TN, Ross R. Proteoglycans in primate arteries: I. Ultrastructural localization and distribution in the intima. *J Cell Biol* 1975; 67:660-674.
- Williams KJ, Feig JE, Fisher EA. Rapid regression of atherosclerosis: insights from the clinical and experimental literature. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2008; 5:91-102.
- Wilson RB, Miller RA, Middleton CC, Dinden D. Atherosclerosis in rabbits fed a low cholesterol diet for five years. *Arteriosclerosis* 1982; 2:228-241.
- Wissler RW, Vesselinovitch D. Studies of regression of advanced atherosclerosis in experimental animals and man. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 275:363-378.
- Wong HY. The cockerel as an animal model for atherosclerosis research. *Avd Exp Med Biol* 1975; 63:381-391.
- Worthley SG, Helft G, Fuster V, Fayad ZA, Rodríguez OJ, Zaman AG. Noninvasive in vivo magnetic resonance imaging of experimental coronary artery lesions in a porcine model. *Circulation* 2000; 101:2956-2961.
- Xu CB, Stenman E, Edvinsson L. Reduction of bFGF-induced smooth muscle cells proliferation and endothelin receptor mRNA expression by mevastatin and atorvastatin. *Biochem Pharmacol* 2002; 1:64-72.
- Yassue H, Matsuyama K, Okumura K, Morikami Y, Ogawa H. Responses of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection to acetylcholine by age and segment: Possible role of early coronary atherosclerosis. *Circulation* 1990; 81:482-490.
- Ylä-Herttua S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Sigal E, Särkioja T, Witztum JL, Steinberg D. Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions: 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* 1991; 87:1146-1152.
- Yuan C, Zhang SX, Polissar NL. Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke. *Circulation* 2002; 105:181-185.

- Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001; 104:2746-2753.

