

Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana
Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

ESTUDIO DE LA LESIÓN ATEROSCLERÓTICA Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS

*Dr. Manuel Chaple La Hoz, Dra. Ela María Céspedes Miranda, Dr. José Castillo Herrera, Dr. Carlos Alfonso Labatier
y Est. José Carlos Castillo Núñez*

RESUMEN

Se analizaron 20 aortas de ratas Wistar comprendidas entre 330-370 g de peso, procedentes del Bioterio del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" con el objetivo de identificar y caracterizar la lesión aterosclerótica, y relacionarla con indicadores de estrés oxidativo como la malonildialdehído. Para el estudio anatomopatológico y morfométrico de las arterias, se utilizó el sistema aterométrico. Se tomaron, además, muestras de sangre para medir los niveles de malonildialdehído. Los resultados más relevantes fueron que las estrías adiposas estuvieron presentes en los distintos pesos y su mayor presentación se observó entre los 330-345 g; las placas fibrosas empezaron su aparición lentamente en el segundo grupo, y la placa grave fue mayor su presentación en el grupo de peso comprendido entre 363-370 g. Con respecto a los niveles de malonildialdehído, se observó un incremento significativo en los grupos de mayor peso, relacionado con la gravedad de la placa de ateroma.

Palabras clave: Lesión aterosclerótica, estrés oxidativo; sistema aterométrico.

La aterosclerosis puede interpretarse como la respuesta defensiva obligada del tejido conectivo de la pared arterial ante una agresión permanente de carácter exponencial. El orden biológico de la pared se ve alterado por los agentes agresores como consecuencia obligada de la biología de los seres vivientes, en la zona agredida se produce la correspondiente respuesta tisular defensiva caracterizada por los fenómenos de la respuesta inflamatoria de la inmunidad.

El aumento de la expectativa de vida en cualquier país viene acompañado de un incremento notable de la mortalidad y morbilidad por aterosclerosis, siendo esta la causa fundamental de investigación dentro del grupo de las enfermedades crónicas no transmisibles.^{1,2}

En 1958 uno de los grupos dirigido por *Holman*,¹ definió 4 tipos o variedades de lesiones ateroscleróticas: estrías adiposas (EA), placas fibrosas (PF), placas complicadas y placas calcificadas.

Pero, posteriormente en 1960, *Holman* y otros en *Un reporte del Comité de Lesiones de la Sociedad Americana para el Estudio de la Aterosclerosis*, publican que la calcificación de cualquier lesión aterosclerótica es uno de los procesos que contribuye a su complicación (placa). Esos autores consideran que ambas, las placas complicadas y las calcificadas, tienen el mismo valor de gravedad para la vida del paciente y por lo tanto deciden reunirlos en una sola variedad y darles el nombre de placa grave o complicada.³

Las fuerzas hemodinámicas como el *shear stress* (SS) ejercen sus influencias sobre las células endoteliales, de forma diferente de acuerdo con las características e intensidad de este.⁴⁻⁶

La idea de que la hiperlipidemia produce lesiones a través de un estrés oxidativo sobre el endotelio es compatible con los estudios experimentales y clínicos, los cuales demuestran que las vitaminas antioxidantes (betacarotenos y vitamina E) y los fármacos que reducen la formación de oxidantes ejercen un efecto protector sobre la aterosclerosis.^{7,8}

El aumento local de las concentraciones de las especies reactivas de oxígeno puede conducir a daño tisular por varios mecanismos. Una consecuencia de la modificación oxidativa directa de los componentes celulares es la alteración de la estructura y función celular. En relación con los lípidos, cuando estos se oxidan, se generan radicales que traen como consecuencia la peroxidación lipídica.^{7,8}

Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, se realizó esta investigación con el objetivo de identificar y caracterizar la lesión aterosclerótica, y relacionarla con indicadores de estrés oxidativo como la malonildialdehído (MDA).

MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo de corte transversal durante el período de tiempo de octubre de 2002-mayo de 2003, donde el universo estuvo constituido por 14 ratas Wistar, con un peso comprendido entre 350 ± 20 g que fueron obtenidas del Bioterio del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", donde se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio. Ciclo luz-oscuridad 12:12, agua y comida *ad libitum*. Las ratas fueron divididas según sexo y peso.

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y decapitación, obteniéndose, además, muestras de sangre para determinar los niveles de MDA por el método de Ohkawa.⁷ Se tomaron muestras de la aorta descendente que fueron conservadas a -20 °C hasta el momento del procesamiento.

PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

Cada arteria se abrió longitudinalmente por su cara ventral y se extendió sobre un cartón poroso previamente humedecido por su adventicia de manera que la íntima arterial quedó expuesta para ser analizada. Ese procedimiento fue el sugerido y adoptado por un grupo de expertos de la OMS desde 1957.^{9,10} La preparación se cubrió con un algodón, se identificaron las arterias de acuerdo con el número correspondiente de cada rata y se fijaron en formalina neutra *bufferada* por más de 72 h. Posteriormente se procedió a la coloración utilizando el método de *Holman*¹¹ (Sudan IV), para poder destacar las lesiones adiposas en color rojo intenso y delimitar mejor los bordes de las otras lesiones. Una vez preparadas las arterias de esa manera se procedió a los análisis cualitativo y cuantitativo.

Análisis cuantitativo y cualitativo

El análisis cualitativo consistió en la identificación de cada tipo de lesión aterosclerótica (LA), estría adiposa (EA), placa fibrosa (PF) y placa grave (PG) (complicada y calcificada). Se calcó en un acetato transparente el área total de la arteria (en mm²) y su longitud (en milímetros).

Cada tipo de lesión aterosclerótica se calcó también dentro de la arteria ya representada, previa adecuada identificación de su variedad lesional. Se identificó cada arteria con la numeración correspondiente a la autopsia.

Para realizar el análisis cuantitativo se midió con un digitalizador (Digitizer KD 4300) acoplado a una PC-486 DX4-100 MH, el área total de la arteria, el área total de cada tipo de lesión aterosclerótica y la longitud de la arteria. A partir de estas mediciones se elaboraron las variables del sistema atermétrico (SA).

El tratamiento automatizado de la información se realizó en una PC-486, DX4-100 MHZ-32 MB RAM, utilizando los software Atherosoft I-IV y el paquete estadístico comercial NCSS (*Number Cruncher Statistical System*) versión 5.4. Para la aterometría de esta investigación se utilizó la metodología denominada sistema atermétrico (SA), el cual se define como un conjunto de métodos y procedimientos que crea variables interdependientes útiles para la caracterización de la lesión aterosclerótica en cualquier arteria, sector arterial o grupo de pacientes.¹²

En este trabajo se utilizaron las variables arteriales del SA, las cuales se dividen en descriptivas y ponderativas o de estimación de la gravedad.

Variables arteriales descriptivas: variables primarias

S = Área total de superficie endarterial expresada en mm²

l = Longitud del vaso en estudio expresada en mm

x = Área total de superficie endarterial afectada por estrías adiposas, expresada en mm²

y = Área total de superficie endarterial afectada por placas fibrosas, expresada en mm²

z = Área total de superficie endarterial afectada por placas graves, expresada en mm²

s = Área total de superficie endarterial afectada por cualquier tipo de lesión aterosclerótica, expresada en mm²

s' = Área total de superficie endarterial libre de lesión aterosclerótica, expresada en mm²

Dada la posibilidad de que las ratas tuvieran la misma cantidad total de aterosclerosis, pero distribuida de manera diferente de acuerdo con las distintas lesiones (ver ejemplo), se pudo inferir que la rata A estaba mucho más severamente afectada que la B, por su mayor contenido de placas fibrosas y graves. Para darle solución a esta probabilidad se procedió a elaborar variables vectoriales, de manera que solo se representarán igual en el mismo espacio mediante el vector resultante aquellas ratas que tengan la misma cantidad de aterosclerosis en cada tipo de lesión.

Variable	Rata A	Rata B
X	0,10	0,80
Y	0,45	0,10
Z	0,40	0,05
S	0,95	0,95

Variables vectoriales

V = X² + Y² + Z² módulo del vector estado lesional

- Cos a = X/V componente de estrías adiposas del total de lesiones
 Cos B = Y/V componente de placas fibrosas del total de lesiones
 Cos g = Z/V componente de placas graves del total de lesiones

Variables ponderativas (índices)

- W = 2Y + 3Z Índice de obstrucción. Representa el volumen de obstrucción promedio de todas las lesiones ateroscleróticas distribuidas en cada arteria.
 P = 4W/r Índice de estenosis. Se define en relación con el aumento de la resistencia por la obstrucción y el tamaño de la arteria expresado mediante su radio (r = radio de la arteria).
 B = S + X donde (s = S- s/S) Índice de benignidad. Es la suma de la superficie relativa de endarteria no afectada por algún tipo de lesión (sana) y la superficie relativa de estrías adiposas, o sea, la superficie relativa de endarteria que no emerge o protruye hacia la luz.

RESULTADOS

La distribución, según sexo y peso, de la población de 14 aortas se presenta en la

tabla 1. El mayor número de ratas correspondió al grupo de peso comprendido entre 363-370 g; la distribución por sexo guardó igual proporción.

TABLA 1. Distribución según peso y sexo

Grupo según peso	Aorta		Total
	Macho	Hembras	
330 - 345	3	2	5
346 - 362	2	4	6
363 - 370	5	4	9
Total	10	10	20

Como puede observarse en la tabla 2, el porcentaje de ratas afectadas por estrías adiposas se comportó en los 2 sexos de igual manera, mientras que en ratas machos la placa fibrosa (PF) tuvo un mayor número de aparición y se comportó en perfecta concordancia con los resultados del porcentaje de superficie intimal (ISI) ocupado por la lesión aterosclerótica (LA) en el mismo sexo, siendo mayor el porcentaje de superficie intimal en la placa grave (PG) en el grupo de peso comprendido entre 363-370 g. La PG se presentó en los 2 sexos con igual porcentaje a diferencia de las lesiones elevadas que predominaron en las ratas hembras, en donde también predominaron

TABLA 2. Lesiones ateroscleróticas. Número de ratas afectadas y media aritmética del porcentaje del área intimal ocupada por lesión aterosclerótica según grupo de edades y sexo

Lesiones ateroscleróticas	Sexo	Ratas	Área %	Grupo según peso		
				3330-345	346-362	363-370
Estría adiposa	M	6	4,1	2	2	2
	H	6	8,6	3	2	1
Placa fibrosa	M	8	0,8	1	5	2
	H	7	1,2	1	4	2
Placa grave	M	7	0,1	1	2	4
	H	7	0,7	1	2	4
Lesiones elevadas	M	6	0,8	1	2	3
	H	7	1,2	1	2	4

el ISI de ambos tipos de LA. Por tanto, el comportamiento del total de aterosclerosis se mostró con mayor énfasis en dicho sexo.

Los índices aterométricos recogidos en la tabla 3, presentaron las características siguientes: la obstrucción y el estenamiento exhibieron un incremento constante con el peso en uno y otro sexos, mientras que los índices de benignidad disminuyeron en la medida que aumenta el peso.

TABLA 3. Índice aterométrico, según grupo de peso y sexo

	IA (%)	Peso	Grupo según IA (%)
Obstrucción	M 1,6	330 - 345	2
	H 2,6	346 - 362	1
		363 - 370	4
Estenosis	M 1,8	330 - 345	0,7
	H 3,2	346 - 362	1
		363 - 370	2,9
Benignidad	M 9,9	330 - 345	9,9
	H 9,8	346 - 362	9,2
		363 - 370	8,5

En la tabla 4 se muestra el comportamiento del índice de MDA en los diferentes grupos, donde hubo un incremento significativo de forma ascendente en los de 346-362 y 363-370.

TABLA 4. Comportamiento de índices de MDA en los diferentes grupos

Grupo	MDA (nmol/mL) $\bar{X} \pm DE$	p
330 - 345	0,65 \pm 0,38	
346 - 362	1,66 \pm 0,52	0,05
363 - 370	2,42 \pm 0,92	0,05

DISCUSIÓN

Los resultados referentes al comportamiento de las estrías adiposas de acuerdo

con el sexo difieren a lo encontrado por *Sary, Holman* y otros,^{9,11,13} los cuales plantean que en las ratas hembras predomina este tipo de LA.

Matsuda, Ross, Tanganelli y muchos investigadores expertos en aterosclerosis,^{14,15} plantean que las EA son las precursoras de las PF, y estas de las PG, interpretándose esas transformaciones aceleradas como producto de las agresiones que se cometen contra la pared arterial y contra el metabolismo general. Un hecho que refuerza estos criterios es precisamente que las placas fibrosas se desarrollan en las mismas áreas donde se encuentran las EA. La disminución de las EA coincide con el incremento en la formación de las PF.

Con respecto a los resultados de la tabla 4, se confirman los encontrados por otros investigadores respecto al papel del estrés oxidativo en el daño endotelial y el desarrollo de la placa de ateroma, porque el aumento local de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno produce oxidación de los lípidos, generándose radicales que conducen a la peroxidación lipídica.^{7,8}

Se concluye que la aterosclerosis es una enfermedad de distribución universal, presente en casi todas las aortas estudiadas, independientemente de peso, sexo, el tipo de alimentación, la cantidad de alimento consumido. Las estrías adiposas estuvieron presentes en los distintos pesos. Su mayor desarrollo se observó entre los 330-345 g de peso. Las hembras se mostraron más afectadas en el área de superficie intimal por esa LA.

Las placas fibrosas predominaron en el grupo de pesos 346-362 g. Los machos presentaron más placas fibrosas, mayor superficie intimal afectada por ese tipo de LA que las hembras en todos los grupos de peso.

La PG fue mayor en el grupo de peso comprendido entre 363-370 g. El porcenta-

je de superficie intimal ocupada por PG se presentó en los 2 sexos con igual forma, a diferencia de las lesiones elevadas en las que predominaron en las ratas hembras.

La transformación de las lesiones ateroscleróticas de EA a PF y la de esta a PG es continua y su progreso más este proceso queda demostrado por los valores observados en los índices aterométricos (obstrucción, estenosis y benignidad).

Las hembras exhibieron los mayores valores en los índices de obstrucción y de es-

tenosis, mientras que los varones de benignidad.

Los datos obtenidos mediante los índices aterométricos del SA demuestran la utilidad de esa metodología para caracterizar la LA en cualquier arteria o grupos de sujetos

Los resultados del estudio de los niveles de la MDA, refuerzan el criterio de otros autores del importante papel del estrés oxidativo en el daño endotelial y el desarrollo de la placa de ateroma

SUMMARY

20 aortas from Wistar rats ranging between 330-370 g of weight from the Breeding Place of "Victoria de Girón" Institute of Basic and Preclinical Sciences were analyzed aimed at identifying and characterizing the atherosclerotic injury and at relating it to oxidative stress indicators as malondialdehyde. For the anatomopathological and morphometric study of the arteries, it was used the atherometric system. Blood samples were also taken to measure the levels of malondialdehyde. The most relevant results were that the adipose striae were present in the different weights and their greatest presence was observed between 330 and 3345 g. The fibrous plaques began their slow appearance in the second group and the severe plaque was more observed in the weight group 363-370 g. As regards the MDA levels, there was a significant increase in the groups of higher weight, according to the severity of the atheroma plaque.

Key words: Atherosclerotic injury, oxidative stress, atherometric system.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández-Brito JE, Wong R, Contreras D, Norde P. Atherosclerotic risk factors, their impact in youth: a ten-year multi-national, pathomorphometrical study (1986-96) using atherometric system. International WHO/ISFC research project Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PBDAY). Proceeding of 9th International Dresden Symposium on Lipoproteins and Atherosclerosis 1997.p.36.
2. Gotto AM Jr. Directions of atherosclerosis research in the 1980s and 1990s. *Circulation* 1984;70 (Suppl 3).
3. World Health Organization, Statistical Review, Geneva,1994.
4. Fernandez-Brito JE, Affeld K. Biofluidmechanics of atherosclerotic lesions. In *J Artif Organs* 1995;18(8):436.
5. ———. Influence of Blood flow in molecular transport and in the arterial wall. Proceeding of 66th Congress of the European Society of Atherosclerosis, Florence Italy, July 13-17, 1996;99.
6. Fernández-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Beat M, Mailhac A, et al. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture, *JACC* 1994; 23,1562-9.
7. Niki E. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidant. *Biochem Soc Trans* 1993;21:313-7.
8. Gwinner W. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1127-32.
9. Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J* 1994;11 (Suppl E):3-23.
10. PDAY Study Protocol and Manual of procedures. Chicago: 1976.
11. Holman. An index for the evaluation of atherosclerotic lesions in the abdominal aorta. A report by the committee on lesions of the American Society for study of Atherosclerosis. *Circulation* 1960;28:1137.
12. Fernández-Brito JE, Carlevaro PV. An atherometric system to study atherosclerotic lesion and its organ-related consequences. *Pathol Res Pract* 1987;49:488-91.

13. Vihert AM. Atherosclerosis of the aorta in five towns. Bull world Health Organ 1976;53(5-6):501-8.
14. Masuda J, Ross R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the non-human primate, I: fatty streak formation. Arteriosclerosis 1990;10:164-77,87.
15. Tanganelli P, Bianciardi G, Simoes C, Attino V, Ttarabochia B, Weber G. Distribution of lipid and Raised lesions in aortas of young people of different geographic origins (WHO_ISFCPBDAY Study). Arterios Thromb 1993;13:1700-10.

Recibido: 2 de abril de 2004. Aprobado: 9 de junio de 2004.

Dr. *Manuel Chaple La Hoz*. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 y 31. Playa. CP 11600. Ciudad de La Habana. Cuba. Teléf.: 2084877-2717686, correo electrónico: chaple@giron.sld.cu