

Efecto de la dieta rica en grasa (1%) sobre la aorta y el hígado en conejas ovariectomizadas. II parte

Recibido para publicación julio 26 de 2010. Revisado y aceptado septiembre 1 de 2010

ONATRA W.^{*1}, MENDOZA R.², LENIS C.³, FORERO G.⁴, RODRÍGUEZ A.⁵, PEÑA E.⁶, LAVERDE G.⁷, GALLEGU C.⁸, ESQUINAS PC.⁹, ZÚÑIGA M.¹⁰, RUIZ AI.¹¹, RÍOS MT.¹²

RESUMEN

Introducción. La enfermedad coronaria con la enfermedad cerebrovascular son las entidades que causan mayor morbilidad y mortalidad en el mundo. La aterosclerosis es una lesión arterial inflamatoria crónica exacerbada por una alteración del metabolismo lipídico y factores de riesgo cardiovascular. Fue interés de los autores evaluar el efecto de una dieta rica en grasa sobre especímenes de aorta e hígado en un modelo animal como la coneja.

Material y Métodos. Se tomaron 20 conejas New Zealand de 2.500 a 3.000 gr de peso, las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 cada uno: grupo 1 n = 5 control (C1); grupo 2 n = 5 control + dieta rica en grasa 1% (C+D); grupo 3 ovariectomizadas n = 5 control (O1) y grupo 4 n = 5 con dieta rica en grasa 1% (O+D). Se evaluó por estudio ecográfico la aorta abdominal y al final de las 24 semanas se sacrificó una coneja de cada uno de los 4 grupos, realizándose estudios histológicos de aorta y el hígado. Se utilizó la coloración de hematoxilina eosina, cortes histológicos para alta resolución y una coloración para grasa (Red Fast).

Resultados. Ultrasonido de la aorta: el diámetro de la aorta se incrementó en un 18.40% en las conejas no ovariectomizadas y un 12.83% en las ovariectomizadas. La intima de los C y los C+D aumentó un 33.33% y entre las O controles y O+D aumentó un 15.38%, 50% menor al comprarla con los controles. La evaluación de la intima entre los C1 y O1 aumentó el diámetro en un 14.72% y el grosor de la intima fue del 33.33%. En los casos de C+O y O+D el diámetro presentó un aumento de 0.33% y la adventicia presentó un aumento de 275.0%. El estudio histológico de la aorta y el hepatocito muestra que las C: presentan un aumento escaso de gránulos de grasa en la intima y en el hepatocito; las C+D: en la aorta se aprecian pequeñas gotas de grasa en la intima con aumento del espesor de la intima (290 u-390 u). En el hígado se observa un proceso inflamatorio con alteraciones hidrópicas moderadas y gotas grasas en su interior; las O: se observan muy pocos cambios en la intima, escasas gotas de lípidos y el diámetro se encuentra ligeramente aumentado (180 u-240 u) en relación con los controles. En el hígado, focos inflamatorios con degeneración hidrópica perilobulillar y grasa pericelular; en las O+D: la aorta demuestra un gran acumulo de grasa pericelular con aumento en el espesor (230 u-360 u) un poco mayor que la C+D, el hepatocito presenta cambios hidrópicos, severa vasculización y marcada reacción grasa perilobulillar.

Conclusión. La dieta rica en grasa (1%) en un modelo como el conejo produce lesiones severas a nivel del endotelio aórtico y el hepatocito, especialmente en las conejas con dieta y en menor proporción en las ooforectomizadas.

¹ Correo electrónico: wonatra@gmail.com, celular: 310-2626771, Tels: 6108777-2323656-2876901; MD, MSc, Ginecólogo, Endocrinólogo UN; Profesor titular, Docente investigador, UDCA. ² MVZ, PhD, Decano de Zootecnia, UDCA. ³ QF. Docente Laboratorio Bioquímica, UDCA. ⁴ MV, Cirujano, Profesor UDCA. ⁵ MV, Anestesiólogo, Profesor UDCA. ⁶ MV, Ecografista, Profesora UDCA. ⁷ Bacterióloga, Gerente Laboratorio de Investigaciones Hormonales. ⁸ MV, Patóloga, Profesora UDCA. ⁹ MV, Patóloga, Fundación Santa Fe. ¹⁰ MV, Coordinador Bioterio, Profesor UDCA. ¹¹ MD, MSc., Ginecólogo Endocrinólogo, Epidemiólogo, Profesor titular, Universidad Nacional de Colombia. ¹² Estadística UDCA. Institución: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA). Bogotá.

Palabras clave: dieta rica en grasa, conejas, aorta, hepatocito.

ABSTRACT

Introduction. Coronary artery disease with cerebrovascular disease are the entities that cause more increased morbidity and mortality in the world. Atherosclerosis is a chronic inflammatory arterial injury exacerbated by an altered lipid metabolism and cardio-vascular risk factors. It was the interests of authors evaluate the effect of a high diet fat on specimen of aorta and liver in an animal model such as the rabbit.

Material and Methods. 20 New Zealand rabbits were taken from 2500 to 3000 kg in weight which were divided into 2 groups: Group I (n = 10) 5 control (C), 5 control-fat diet + 1% (C+D) and group II (n = 10) ovariectomized, 5 control (O) and 5 high-fat diet with 1% (O+D). Was evaluated by ultrasonography the abdominal aorta. At the end of the 24 week was sacrificed a rabbit in each group to carried out histological studies of aorta and liver. Was used hematoxylin eosin staining and histological sections for high resolution and fat stain (Fast-Red)

Results. In ultrasound the diameter of the aorta between the C and C+D grew by 18.40% in the O and O+D was 12.83%. The intima of the C and C+D grew by 33.33% and between O and O+D controls grew by 15.38%. 50% lower when comparing with controls. The evaluation of the intima between the C1 and O1 increased the diameter in a 14.72% and the thickness of the intima was 33.33%. In the case of C+O and O+D the diameter presented an increase of 0.33% and the adventitia was increased for 275.0%. Histology of the aorta and the hepatocyte shows that the C: had a little increase of fat granules in the intima and in the hepatocyte. C+D: the aorta were seen fat droplets in the intima with thickening of the intima (290 u-390 u). In the liver there was an inflammatory process with moderate hydropic changes and fat droplets inside. O: there was very little change in the intima, small lipid droplets and the diameter is slightly increased (180 u-240 u) compared with controls and inflammatory foci in the liver with hydropic degeneration and fat perilobulillar pericellular in relation to controls. O+D: the aorta showed a large accumulation of fat pericellular with increase in thickness (230 u-360 u) are little larger than the C+D, presents hepatocyte hydropic changes, severe vacuolization and fat perilobulillar strong reaction.

Conclusion. The high-fat diet (1%) in a rabbit model produced severe injury to aortic endothelium and the hepatocyte, especially in rabbits with diet and to a lesser extent in the oophorectomised ones.

Key words: high-fat, diet, rabbits, aorta, hepatocyte.

Introducción

Es conocido y está bien documentado que la enfermedad cardiovascular (EC), y específicamente la enfermedad coronaria, es la primera causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y algunos en vía de desarrollo, superando las enfermedades infecciosas con un costo que supera los US500 millones al año^{1,2}. Si bien a la presencia de placa arteriosclerótica se le han atribuido la mayoría de los eventos tanto coronarios como cerebrovasculares, no necesariamente es la causante de este resultado.

La aterosclerosis es una lesión arterial inflamatoria crónica exacerbada por una alteración del metabolismo lipídico y los factores de riesgo cardiovascular^{3,4}. Estudios de anatomía patológica postmortem revelan que la aterosclerosis se inicia muy temprano, casi desde la vida intrauterina, y se presenta en el adulto mayor en diferentes partes de los vasos arteriales; además, que a pesar de existir numerosas placas, algunas pacientes mueren de otras causas⁵. Para resolver esta paradoja se han diseñado diferentes estudios clínicos y experimentales, los cuales han mostrado que el infarto del

miocardio es debido a ruptura o erosión de la placa inestable más que a la cantidad de la misma, atribuyendo entonces a que sus diferentes elementos constitutivos son los que hacen que una placa sea o no inestable⁶. En estas condiciones se inicia el análisis de los componentes de la placa, los diferentes elementos internos y externos que puedan estar interviniendo en la misma para su desestabilización.

La mayoría de los estudios aclaratorios iniciales han dependido de los hallazgos de autopsia y de los especímenes de arteriectomía coronaria, ultrasonido cardiovascular y algunos marcadores bioquímicos⁷. A nivel terapéutico se ha probado el efecto benéfico de las estatinas a nivel de la arquitectura de la placa y algunos de los elementos constitutivos de la misma que de alguna manera contribuyen para la estabilización de la placa⁸. Para poder entender parte de los complejos mecanismos de la composición de la placa debemos remitirnos a la biología molecular. La calcificación de la media ha sido reproducida experimentalmente con dieta rica en colesterol asociada a una variedad de tratamientos, los cuales incluyen la administración de Vitamina D en ratas⁹, cerdos¹⁰ y conejos¹¹; Vitamina D con nicotina con o sin suplemento de colesterol en ratas¹² y conejos¹³; Vitamina D con deficiencia de magnesio en cerdos¹⁴ y conejos con falla renal crónica inducida por cauterización renal¹⁵ y Warfarina con o sin Vitamina K en ratas¹⁶, evidenciando el papel indirecto que tendría la Vitamina D en la etiopatogenia de la aterosclerosis.

La dieta rica en grasa tiene efectos metabólicos que fueron descritos en la primera parte (ref) y fue interés de los autores describir los efectos de la dieta rica en grasa (1%) en conejas control y ovariectomizadas en la aorta e hígado mediante estudios ecográficos e histológicos.

Material y métodos

Tipo de Estudio: Estudio experimental en conejas New Zealand con peso de 2.500 a 3.000 g sometidos a una dieta rica en grasa al 1%.

Muestra

Se tomaron 20 Conejas maduras New Zealand de 3.000 g de peso, en condiciones de temperatura 21°C y ciclo normal de día y noche.

Se dividieron en 4 grupos: Grupo A: conejas Control: 1) Dieta normal (C) n = 52). Dieta hiperlipidémica (C+D) n = 5. Grupo B: conejas ovariectomizadas (O): 1) Dieta normal (O) n = 52). Dieta hiperlipidémica (O+D).

Dieta

Se les administró dieta rica en 1% de Colesterol, además de 10% de aceites ricos en ácidos grasos saturados [palma,(A)], monoinsaturados [oliva,(B)] y poliinsaturados [maíz,(C)]²³.

Laboratorio

Durante este periodo se tomaron muestras de sangre de la vena central de la oreja en



Figura 1. Toma de muestra vena Central



Ovariectomía en una coneja

cantidad de 10 mL al inicio tiempo 0 (T0), 12 semanas (T2) y 24 semanas (T3) (Figura 1).

En las instalaciones de la Clínica Veterinaria de la UDCA se les practicó extracción bilateral de la gónada (Ovariectomía) a 10 conejas bajo anestesia general y mediante laparotomía; con los cuidados postoperatorios de acuerdo a las guías existentes para estos casos.

1. Se evaluó semanalmente el peso y el promedio de aumento de cada una de las conejas, se consignó el día de la toma en el tiempo T0 (octubre 2007), T2 (febrero 2008) y T3 (mayo 2008) que fue descrita en un número anterior de esta revista, (2009; 15: 219) así como los efectos metabólicos de la química sanguínea y estradiol.
2. Ultrasonido. Al final de las 24 semanas se realizó un ultrasonido de aorta abdominal en una coneja de cada grupo, utilizando un equipo Aloka prosound a-10 con un transductor de 13 MHz. Se evaluó el diámetro de la aorta abdominal a 1.5 cm por

encima de las arterias renales y se midió el grosor de la adventicia en mm.

3. Anatomía patológica. Al final de las 24 semanas se sacrificó una coneja de cada grupo. Se evidenció aumento de grasa en el tejido celular subcutáneo y peritoneo, especialmente en las conejas que recibieron dieta rica en grasa. Se tomaron muestras representativas de hígado y aorta, los cuales se colocaron en recipientes con formol al 10%. A los especímenes se les realizó estudios con hematoxilina eosina, cortes histológicos para microscopía de alta resolución y coloraciones especiales para grasa (Red Fast).

Manejo estadístico

Por tratarse en esta segunda parte de una descripción de los hallazgos histológicos, sólo se transcriben los hallazgos anatomopatológicos¹⁷.

Instrumento de recolección: Los datos se consignaron en un formulario diseñado para tal efecto.

Tabla 1. Valores en ultrasonido de la aorta.

ULTRASONIDO		
Aorta	Diámetro	Intima
Grupo I: Control		
C-1	1,63	0,15
Control + dieta		
C6	1,93	0,20
Aumento (%)	18.40	33.33
Grupo II		
Ooforectomía control		
O-1	1,87	0,65
Ooforectomía + Dieta		
O-6	2,11	0,75
Aumento (%)	12.83	15.38
COMPARATIVO		
Aumento %		
C1 - O1	14.72	0.33
Aumento %		
C6 - O6	9.33	275.00

Comité de Bioética

El estudio fue autorizado por el Comité de Bioética Sección Experimentación animal de la UDCA de acuerdo a la normatividad internacional existente en el manejo ético de animales en experimentación.

Resultados

Ultrasonido aórtico

Se hizo estudio de la aorta tanto por el lado derecho como por el lado izquierdo, demostrando que el izquierdo es más confiable en el momento de suministrar los datos. El diámetro entre los controles y C+D fue de 18.40% y en las ovariectomizadas controles y con dieta fue de 12.83%.

En la intima al comparar los controles y los C+D se presenta un aumento del 33.33% y entre las ovariectomizadas controles y con dieta el aumento fue de 15.38%. 50% menor al comprarla con los controles.

En cuanto a la evaluación de la intima entre los C1 y O1, el aumento del diámetro fue del 14.72% y el grosor de la intima fue del 33.33%. En los casos de C+O y O+D el diámetro presentó un aumento de 0.33%, y la adventicia presentó un aumento de 275.0% (Tabla 1).

Estudios de Anatomía Patológica (Descripción de Patología)

Evaluación histológica

Mediante este método se aprecian los efectos de la dieta y de la ovariectomía en la aorta y

el hígado tanto por microscopía de luz como por microscopía de alta resolución. Se aprecia aumento del contenido de gránulos de grasa en el endotelio y en el hepatocito.

Características Coneja C1 (control)

Aorta

Microscopía óptica: a nivel de la aorta se aprecia moderado aumento en la cantidad de tejido adiposo a nivel de la adventicia arteriolar.

Microscopía de alta resolución: la pared de la arteria tiene un espesor de 150 micras-200 micras (u). Se observa morfología normal en la lámina elástica y en la adventicia. Escasas gotas de lípidos con relación al endotelio.

Red Fast: no se observa material lipídico asociado al tejido arterial (Figura 2).

C1: Hígado

Microscopía óptica: se encuentran focos de leve infiltrado inflamatorio mononuclear. En algunos hepatocitos se encuentran vacuolas citoplasmáticas de bordes irregulares compatibles con cambio hidrópico de localización perilobulillar. No hay cambios compatibles con infiltración grasa.

Microscopía de alta resolución: la mayoría del parénquima se observa sin alteraciones; hay una degeneración hidrópica muy leve y focal en algunas células.

Red Fast: marcación positiva para grasa (Figura 3).

Tabla 2. Resumen histológico descriptivo coneja control.

Microscopía óptica			Microscopía Alta resolución		Red Fast	
Aorta		Hígado	Aorta	Hígado	Aorta	Hígado
Control						
C-1	Adventicia: T. adiposo. Leve	Focos inflamatorios: leves Cambios grasos: no hay	Espesor: 150 u-200 u Advent. normal Lípidos endotelio: escasos Luz: lípidos ++	Parénquima: sin alteraciones Degeneración Hidrópica: leve	Endotelio: no se observa	Negativa

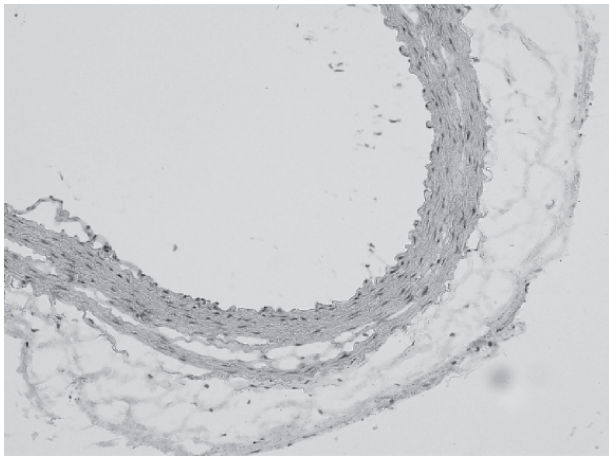


Figura 2. Microfotografía Aorta C1.

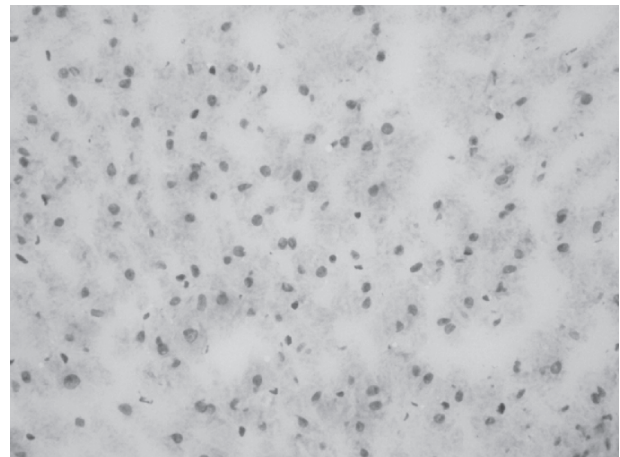


Figura 3. Microfotografía Hígado C1.

Características Coneja C6 (control + dieta)

En la aorta y a nivel de la intima se aprecian pequeñas gotas de grasa y aumento del espesor de la intima (290 um-390 um). En el hígado se observa un infiltrado inflamatorio con alteraciones hidrópicas moderadas y algunas células con gotas grasas en su interior.

Aorta

Microscopía óptica: el tejido evaluado muestra gran cantidad de tejido adiposo depositado en la adventicia arteriolar:

Microscopía de alta resolución: la pared de la arteria tiene un espesor de 290 micras a 390 micras. Se observa la morfología normal de la lámina elástica interna y adventicia. Representa poca vacuolización del endotelio y se observan escasas gotas de lípidos con relación al endotelio. Hay grandes gotas de lípidos en la luz del vaso.

Red Fast: marcación positiva en algunas regiones con pequeñas gotas de material lipídico sobre el endotelio y algunas en la lámina elástica (Figura 4).

C6: Hígado

Hay una marcada degeneración hidrópica extensa, principalmente de localización perilobulillar. Se observan ocasionales gotas lipídicas a nivel pericelular.

Red Fast: marcación positiva leve como pequeñas gotas lipídicas a nivel pericelular en algunas regiones (Figura 5).

Características Coneja O1 (ovariectomizada control)

Se observan muy pocos cambios en la intima, escasas gotas de lípidos y el diámetro se encuentra ligeramente aumentado (180 u-240 u) con relación a los controles. En el hígado se apre-

Tabla 3. Resumen histológico descriptivo coneja Control + dieta.

Microscopía óptica		Microscopía Alta resolución		Red Fast	
Aorta	Hígado	Aorta	Hígado	Aorta	Hígado
C6 Adventicia: T. adiposo. Moderada	Focos Inflamatorios: Leves cambios hidrópicos + grasos: no hay	Espesor: 290 u - 390 u Advent: normal Lípidos endotelio: leve Luz: lípidos +	Parénquima: sin alteraciones D. Hidrópica: moderada Lípidos: ocasionales	Endotelio: pequeñas gotas y en intima	Positiva y en algunas células

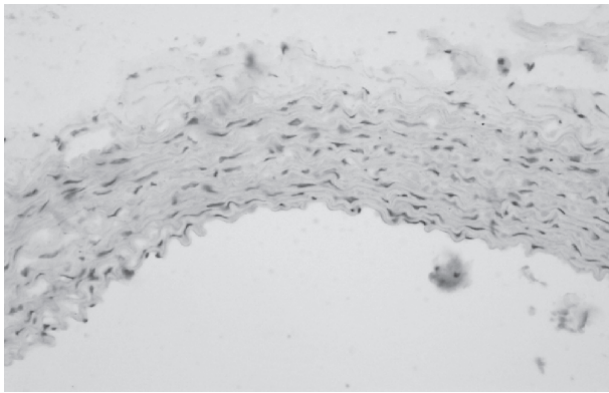


Figura 4. Microfotografía Aorta C1.

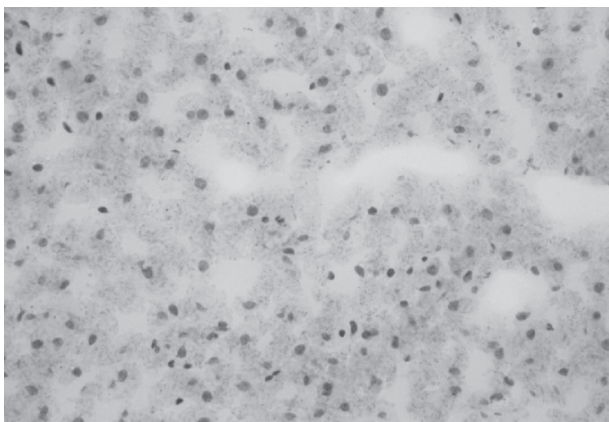


Figura 5. Microfotografía Hígado C6.

cian focos inflamatorios con degeneración hidrópica perilobulillar y grasa pericelular.

O1: Aorta

El tejido evaluado muestra una gran cantidad de tejido adiposo depositado en la adventicia arteriolar.

Microscopía de alta resolución: la pared de la arteria tiene un espesor de 180 micras-240 micras. Morfología normal de la lámina elástica y la adventicia. En la lámina intima se observa una moderada vacuolización y aumento del tamaño de las células endoteliales en algunas regiones y gotas de grasa, algunas en contacto íntimo con el endotelio.

Red Fast: muy escasa marcación positiva focal a nivel pericelular (Figura 6).

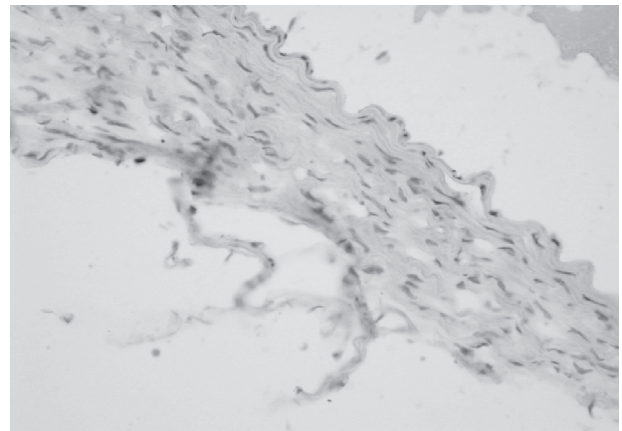


Figura 6. Microfotografía Aorta O1.

O1: Hígado:

Microscopía óptica: se encuentran leves focos de infiltrado inflamatorio mononuclear. No hay cambios compatibles con cambios grasos.

Microscopía de alta resolución: la pared de la arteria tiene un espesor de 180 μ - 240 μ . Se observa

Tabla 4. Resumen histológico descriptivo coneja ovariectomizada control.

	Microscopía óptica		Microscopía alta resolución	Red Fast		
	Aorta	Hígado		Hígado	Aorta	Hígado
O1	Adventicia: T. adiposo. Sin cambios	Focos inflamatorios: leves cambios grasos: no hay	Espesor: 180 u-240 u Adventicia: vacuolización Células > Lípidos endotelio: escasos Luz: Lípidos +	Parénquima: sin alteraciones D. Hidrópica: leve; mayor a nivel perilobulillar	Endotelio: escasa	Leve positiva pericelular

la morfología normal de la lámina elástica y la adventicia. En la lámina intima se observa una moderada vacuolización y aumento de tamaño de las células endoteliales en algunas regiones y gotas de grasa en contacto con el endotelio.

Red Fast: muy leve marcación positiva focal a nivel pericelular (Figura 7).

Características Conejas O6 (Ovariectomizada + dieta)

Los hallazgos en la aorta demuestran un gran acumulo de grasa pericelular con aumento en el espesor (230 u-360 u) un poco mayor que la C+D, el hepatocito presenta cambios hidrópicos y severa vacuolización con marcada reacción grasa pericelular.

O6: Aorta

Microscopia óptica: el tejido evaluado no muestra cambios anatomopatológicos evidentes.

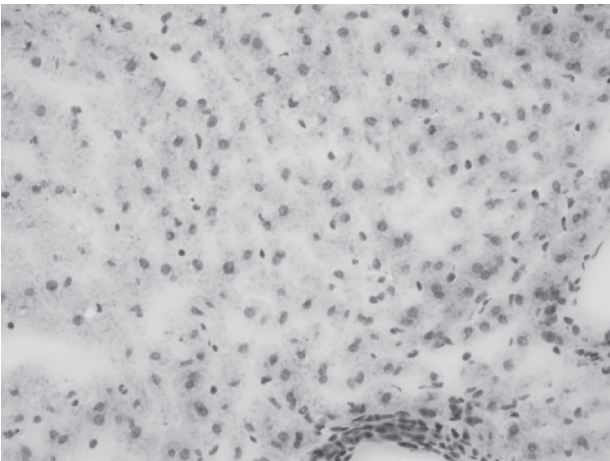


Figura 7. Microfotografía Hígado O1.

Microscopía de alta resolución: la pared arterial tiene un espesor de 230 micras a 360 micras. Se observa morfología normal len la lámina elástica y adventicia, leve o moderada vacuolización del endotelio. Gotas grasas a lo largo del endotelio (Figura 8) y más evidente en la coloración Red Fast (Figura 9).

Red Fast: se observa marcación positiva especialmente pericelular.

O6: Hígado

Microscopía óptica: se encuentran leves focos de infiltrado inflamatorio mononuclear. Presencia de vacuolas intracitoplasmáticas de bordes irregulares de localización perilobulillar. No hay cambios de degeneración grasa.

Microscopía de alta resolución: moderada a severa degeneración hidrópica en la mayoría de las células de parénquima de localización perilo-bulillar. Vacuolización sinusoidal leve (Figura 10).



Figura 8. Microfotografía Aorta O6.

Tabla 5. Resumen histológico descriptivo coneja ovariectomizada + dieta.

Microscopía óptica		Microscopía alta resolución		Red Fast	
Aorta	Hígado	Aorta	Hígado	Aorta	Hígado
O6 Adventicia: aumento de tejido adiposo.	Focos inflamación: leves cambios hidrópicos + gotas grasas	Espesor: 230 u-360 u adventicia: lípidos en endotelio:	Parénquima: degeneración hidrópica: moderada a severa. Vacuolizacion +	Endotelio: lípidos y en la íntima	Marcada reacción pericelular

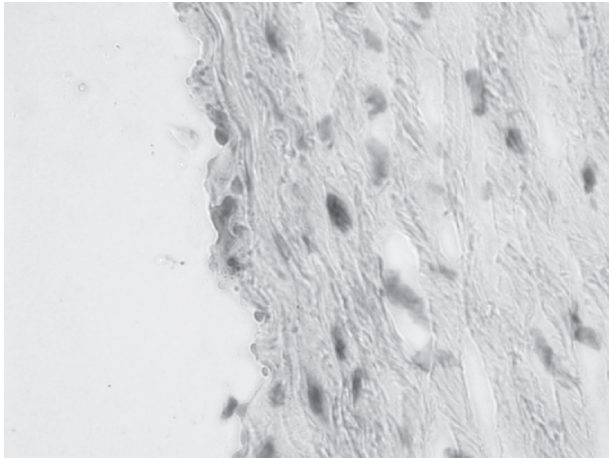


Figura 9. Microfotografía Aorta O6 (x 100).

Red Fast: se observa marcación positiva especialmente pericelular.

Espesor de la adventicia

El espesor de la adventicia muestra un aumento del 94% entre el control y el control con dieta, con una respuesta superior a lo esperado. A diferencia de las ovariectomizadas, que si bien hay un aumento, éste es del 40.4%. Al

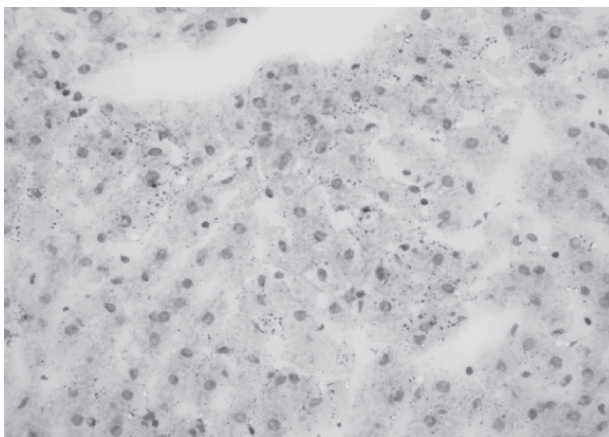


Figura 10. Microfotografía Hígado O6.

comparar los controles sin dieta y los controles de la ovariectomizada el espesor es de 20%; en cambio, si se compara el control + Dieta con la O+D presenta una disminución del 13.24% (Tabla 6).

Discusión

Una de las principales causas atribuidas a la calcificación de las arterias ha sido la dieta rica en grasas y por ende rica en colesterol con aumento de las diferentes lipoproteínas. Estudios en cultivo han mostrado que en células vasculares o mesenquimales se producen nódulos mineralizados a causa del estrés oxidativo¹⁷, leptina¹⁸ y puede ser inhibido por las lipoproteínas de alta densidad (HDL)^{19,20}. En cultivo aislado de células estromales de médula ósea de rata C57BL/6 con dieta rica en grasa *in vivo* fallan en la diferenciación de los osteoblastos así como los cultivos *in vitro* de LDL oxidada inhiben la calcificación²¹. Una posible explicación a esta paradoja es que las LDL oxidadas afectan diferencialmente la calcificación tanto en hueso como en las arterias, fenómeno que también se ha visto en tratamiento con la estátnas que tiene efecto tanto en los mecanismos de resorción como de la formación y el efecto sobre la pared arterial no ha sido documentado.

Estudios clínicos del efecto de los lípidos sobre la calcificación de la pared arterial han evidenciado que los niveles de LDL se encuentran relacionados proporcionalmente con las HDL e inversamente con la prevalencia y extensión de la calcificación coronaria midiendo el colesterol total^{22,23}. Sin embargo, esto sugiere, pero no es conclusivo, que las lipoproteínas tengan un efecto directo sobre la calcificación coronaria *per se*. La calcificación coronaria en buena medida ofrece una buena correlación con

Tabla 6. Resumen histológico descriptivo del espesor de la adventicia entre los controles y ovariectomizadas.

CONTROL				OVARIECTOMIZADAS			
Control C1	150-200	Control + D. C6	290-390	Control O1	180-240	Control + D. O6	230-360
Promedio	175		340		210		295
% Aumento			94.28				40.48
					20.00		-13.24

la arteriosclerosis coronaria y los estudios histológicos demuestran esta relación entre el aumento de placa, el nivel de arteriosclerosis²⁴ y la concentración sérica de LDL²⁵.

La evidencia muestra que la enfermedad cardiovascular tanto en el hombre como en la mujer después de los 50 años, es la primera causa de morbilidad por encima del cáncer cervicouterino y de mama²⁶. La lesión arteriosclerótica es multifactorial, como tuvimos la oportunidad de mencionarlo en la I parte de este artículo.

Uno de los factores en la organización de la placa ateromatosa es la dieta rica en lípidos y un modelo aceptado experimentalmente es el conejo²⁷. El primer estudio relacionado con la aterosclerosis en conejos se describe en 1908²⁸, donde se induce lesión mediante una dieta rica en colesterol. Es conocido que en humanos la restricción de hidratos de carbono conlleva a una disminución de triglicéridos y aumento de la HDL-colesterol a diferencia de la dieta rica en colesterol que presenta una disminución de la HDL y aumento de los TGs²⁹. El conejo es un buen modelo para estudio de la aterogénesis, donde se sabe que parte del colesterol pertenece a una mayor proporción de LDL, tiene proteínas de transferencia de esteres de colesterol y lipoproteinlipasa.

Podemos dividir la calcificación de las arterias en dos grandes orígenes: las que se presentan a nivel de la media y las que comprometen la intima. Se puede presentar la mineralización como un componente del ateroma o en ausencia de placa ateromatosa. Este concepto explica cómo con el correr de los años los vasos se calcifican progresivamente y sólo producen alteraciones patológicas cuando se presenta ruptura o lesión de la placa ateromatosa. Las calcificaciones que se presentan a nivel de la intima o cerca del endotelio son las que tienen más riesgo de ruptura y contribuyen en la formación de trombos. La calcificación de la media ocurre independiente de la placa de ateroma conocida como esclerosis de Monckeberg, la cual se ha observado en placas radiográficas en forma de hileras o rieles observados en gente joven con o sin enfermedad metabólica³⁰. Se han descrito estas alteraciones en trastornos metabólicos de

líquidos y electrolitos, hipervitaminosis D y estados terminales de insuficiencia renal. Experimentalmente se ha obtenido con la administración de Vitaminas D en ratas, cerdos y conejos³¹. A nivel de la intima, esta capa es mucho más delgada en todas las especies y diferentes estudios clínicos y experimentales demuestran cómo el estrés hemodinámico y la proliferación fibromuscular determinan un adelgazamiento de la intima con efectos catastróficos a nivel cardio-cerebro-vascular. La calcificación de la intima ocurre con dos patrones distintos, uno con acúmulos de áreas mineralizadas en forma de puntos, alargados y de localización, cerca de la capa media con un componente de metaplasma que incluye médula ósea y áreas similares a las encontradas en el hueso. Parece que presenta las mismas características de los osteoblastos y osteoclastos, pero este tipo de calcificación no se puede descalcificar por los métodos convencionales. Por otro lado, existe un patrón difuso de la calcificación en todas las áreas de la intima que se ha confirmado por estudios radiológicos y que al parecer está comprometido con eventos clínicos³².

El colesterol en la dieta ha sido uno de los factores más estudiados en la literatura y el conejo por su sensibilidad a producir lesiones ateromatosas ante dietas ricas en grasas, combinadas o no, con periodos de intervención cortos de 8-12 semanas y otros de 24-32-50 semanas. Los estudios de Zulli y cols.³³ desarrollaron placas de arteriosclerosis con 0,5% de colesterol durante 12 semanas; Pfister³⁴, con igual porcentaje de colesterol durante 3 semanas; Zhang y cols.³⁵ utilizaron colesterol al 1% por 12 semanas; Ozer y cols.³⁶, colesterol al 2% por 4 semanas y Shakuto y cols.³⁷ con colesterol al 1% durante 10 semanas. Otros estudios hacen combinaciones de colesterol y grasa saturada, como el equipo de Juzwlak y cols.³⁸, quienes han desarrollado aterosclerosis en conejos mezclando 0,5 g/kg de grasa saturada con 0,5 g/kg de colesterol durante 12 semanas; Gil-Hernández y cols.³⁹ provocan la aparición de estría grasa en conejos con la ingesta de colesterol al 1,5% junto a grasa saturada al 3% (manteca de cerdo) durante 4 semanas y placas de ateroma a las 8 semanas. En este grupo se observaron depósitos mínimos de macrófagos cargados de lípidos

haciéndose más abundantes a los 20 días. La placa aparece a nivel aórtico a los 30 días con depósito de macrófagos en la intima tipo estría grasa y la verdadera placa apareció a los 50 días. Este estudio confirma los hallazgos encontrados a nivel de aorta y especialmente en las conejas control con dieta rica en grasa.

La medición del adelgazamiento de la intima-media de la carótida (MIT) por ultrasonido es una técnica no invasiva disponible desde los años 80 pero que tan sólo hace una década se ha visto su utilidad clínica para calcular el riesgo cardiovascular tal como el infarto del miocardio (MI), la enfermedad coronaria (CHD) y la enfermedad cerebrovascular⁴⁰. Esta técnica tiene sus limitaciones porque sólo evidencia el adelgazamiento o engrosamiento de los vasos posiblemente en un periodo preclínico en función de la arteriosclerosis pero su información sobre la hipertensión no es clara. Es posible que en la medida que se pueda diagnosticar tempranamente la formación de placa y posible ruptura será un elemento importante en la enfermedad cardiovascular⁴¹.

En la evaluación de la placa en aorta de conejos se han utilizado diferentes métodos invasivos y no invasivos: desde sondas para lesión endotelial, radiación, sustancias químicas y doppler⁴². En el presente estudio se observa como las conejas intactas sometidas a dieta aumentan el diámetro de la aorta y de la intima 18.4% y 33,33%, respectivamente, siendo menor en las conejas ovariectomizadas. Estos datos concuerdan con un estudio similar utilizando estatinas donde disminuyen la formación de placa con relación a la coneja control⁴³. En un estudio utilizando espectrometría de absorción atómica (AAS) se encuentra que la dieta rica en grasa en conejas aumenta en un 95% las concentraciones de hierro en el pulmón y 7% en el riñón; hay disminución de cobre del 16% en la aorta y 71% de Zinc en el riñón, postulándose que el hierro tiene que ver con el proceso de aterogénesis por producción de radicales libres, depósito y absorción de lípidos intra y extracelular en la intima, en el tejido conectivo, proliferación de músculo liso, degradación de la matriz extracelular e inestabilidad de la placa. En anemia inducida previene la progresión de la arteriosclerosis⁴⁴.

Es así que una evidencia en este mismo sentido demuestra cómo la administración de fosfolípidos esenciales (EPL) a la dieta rica en grasa a conejos presenta una disminución significativa de las áreas arterioscleróticas en la aorta, con baja en la concentración de los lípidos, aparición de colesterol esterificado y del malonilaldehído a nivel plasmático. Por otro lado, existe una disminución en la concentración de radicales libres de ascorbato en sangre e hígado⁴⁵. Recientemente, desde el punto de vista de la biología molecular, la paroxonasa-1 (PON-1) es una enzima que hidroliza fosfolípidos oxidados, la cual ante una dieta rica en grasa reduce la actividad de esta enzima aumentando la oxidación de las LDL, postulándose esta molécula como un candidato para terapia génica antiaterogénica⁴⁶.

Con relación al hígado, la dieta rica en grasa en conejos produce una alteración en el sistema de monocito – macrófago con infiltraciones grasas en dicho órgano⁴⁷. La activación de este sistema se presenta como una simple esteatosis similar a la observada en el hígado graso (NASH) no alcohólico. Desde el punto de vista nutricional se observan alteraciones de citoquinas, especies reactivas de oxígeno (ROS), peroxidación lipídica y disfunción mitocondrial. Etiopatogénicamente la resistencia a la insulina juega un papel primordial en la esteatosis hepatocelular con acumulación de lípidos, especialmente triglicéridos en todo el complejo de la cascada de la inflamación⁴⁸. Los resultados de este estudio también así lo demuestran (Figura 11).

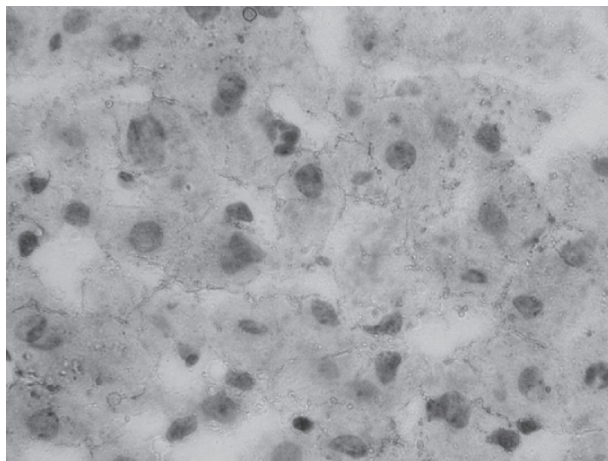


Figura 11. Microfotografía hígado O6 (x 100).

Conclusiones

Los efectos de la dieta rica en grasa (1%) en conejas evidencia aumento en el grosor de la intima-media con depósito de lípidos a nivel del endotelio y músculo liso. En el hígado se aprecian lesiones perilobulillares y signos de hígado graso, especialmente en las conejas con dieta y ovariectomizadas. Aunque estamos conscientes de las limitaciones para sacar conclusiones al haber sacrificado un solo sujeto, este modelo permitirá futuras investigaciones en el campo de la arteriosclerosis.

Agradecimientos

A las directivas de la universidad y a la Vicerrectoría de Investigaciones por el apoyo recibido para la realización de este proyecto. A todos nuestros colaboradores, quienes desinteresadamente nos ayudaron en la consecución de los conejos, su control pre y postoperatorio.

A la clínica veterinaria que nos prestó sus instalaciones para la realización de los procedimientos quirúrgicos. Al personal de la clínica: bioterio, médicos veterinarios cirujanos, anestesiólogo, ecografista, patólogos y estadística de la UDCA, quienes hicieron posible concluir exitosamente esta investigación.

Referencias

1. American Heart Association. Heart disease and stroke statistics 2003 update. Dallas: American Heart Association. 2003.
2. World Health Organization. The world health report: making a difference. Geneve: World Health Organization. 1999.
3. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2000;420:868-874.
4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;400:233-241.
5. Strong JP Landmark. perspective coronary atherosclerosis in soldiers. A clue to the natural history of atherosclerosis in the young. *JAMA* 1986;256:2863-2866.
6. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaque: new mechanism and clinical targets. 2000;8:1257-1262.
7. Falk E, Shah PK, Fuster V. coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-671.
8. Chiton R, O'Rourke RA. The expanding role of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in the prevention and treatment of ischemic heart disease. *Curr Probl Cardiol* 2001;26:734-764.
9. Kitagawa S, Yamaguchi Y, Kunitomo M, Fujiwara M. Impairment of endothelium dependent relaxation in aorta from rats with arteriosclerosis induced by excess vitamina D and high cholesterol diet. *Jpn Pharmacol* 1992;59:339-347.
10. Ito M, Sekine I, Kummerow FA. Dietary magnesium effect on swine coronary atherosclerosis induced by hypervitaminosis D. *Acta Pathol Jpns* 1987;37:955-957.
11. Stehbens WE. Localization of experimental calcification in rabbit blood vessels with particular reference to hemodynamics. *Angiology* 1988;39:597-608.
12. Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giumelly P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D plus nicotine. *J Vasc Res* 1997;34:386-398.
13. Hass GM, Laderholm W, Hemmens A. Production of calcific-athero-arteriosclerosis and tromboarteritis with nicotine, vitamin D and dietary cholesterol. *Am J Pathol* 1966;49:739-771.
14. Ito M, Cho BH, Kummerow FA. Effects of dietary magnesium deficiency and excess vitamin D3 on swine coronary arteries. *Jam Coll Nutri* 1990;9:155-163.
15. Tvedegaad E. Arterial disease in chronic renal failure an experimental study in the rabbit. 1987;290:1-28.
16. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarina causes rapid calcification on the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:317-327.
17. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation on vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31:509-519.
18. Parhami F, Tintuf Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target leptin. *Circ Res* 2001;88:954-960.
19. Jonarta AL, Pudyani PS, Sosroseno W. Effects of high density lipoprotein on lipopolysaccharide induced alveolar bone resorption in rats. *Oral Dis* 2002;8:261-267.

20. Parhami F, Basseri B, Hwang J, Tituf Y, Demer LL. High density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circ Res* 2001;91:570-576.
21. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Beliner JA, Demmer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiations. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997;17:680-687.
22. O'Rourke RA, Brundage BH, Froelicher VF, Greenland P, et al. American College of Cardiology / American Heart Association Expert Consensus document on electron – beam computed tomography for the diagnosis and prognosis of coronary artery disease. *Circulation* 2000;102:126-140.
23. Dextrano RC, Doherty TM, Davies MJ, Stary HC. Predicting coronary events with coronary calcium: pathophysiologic and clinical problems. *Curr Probl Cardiol* 2000;25:374-402.
24. Sangiorgi G, Rumberger JA, Severson A, Edwards WD, et al. Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in human: a histologic study of 723 coronary artery segments using noncalcifying methodology. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:126-133.
25. Gordon T, Kannel WB. Premature mortality from coronary heart disease. The Framingham study. *JAMA* 1971;215:1617-1625.
26. Mooradian AD, Hass MJ, Norman C, Wong W. The effect of select nutrients on serum High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels. *Endocrine Review* 2006;27:2-16.
27. Gil-Hernández A, Ramírez MC, Aguilera MC, Mesa-García MD. Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular. *Nutri Hosp* 2007;22:122-136.
28. Ignatowski AI. Influence of animal food on the organism of rabbits. *ST Petersburg Izvest Imp Voenno-Med Akad* 1908;16:154-176.
29. Fletcher B, Berra K, Ades P, et al. Managing abnormal blood lipids: a collaborative approach. *Circulation* 2005;112:3184-3209.
30. Prodfool D, Shanahan CM. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* 2001;26:245-251.
31. Stehbens WE. Localization of experimental calcification in rabbit blood vessels with particular reference to hemodynamics. *Angiology* 1968;39:597-608.
32. Doherty IM, Asotra K, Fitzpatrick LA, et al. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:11201-11206.
33. Zulli A, Buxton BF, Black MJ, Hare DL. CD34 Class III positive cells are present in atherosclerotic plaques of the rabbit model of atherosclerosis. *Histochem Cell Biol* 2005; 124:517-522.
34. Pfister SL. Aortic thromboxane receptor deficiency alters vascular reactivity in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2006; 1 (in press).
35. Zhang ZS, Jame AE, Huang Y, Ho Wk, Sabota DS, Chen ZY. Quantification and characterization of aortic cholesterol in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Int J Food Sci Nutr* 2005;56:359-366.
36. Ozer NK, Negis Y, Aytan N, Villacorta L, Ricciaralli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 2006;184:15-20.
37. Shakuto S, Oshima K, Tsuchiya E. Glimepiride exhibits prophylactic effect on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2005;182:209-217.
38. Juzwiak S, Wojcicki J, Mokrzycki K, Marchlewicz M, Bialecka M, Wenda-Rozewicka L, Gawronska-Szklarz B, Drozd-zik M. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol Rep* 2005;57:604-609.
39. Gil Hernández A, Ramírez T. MC, Aguilera García MC, Mesa García MD. Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular. *Nutr Hosp*. 2007;22.
40. Pokorski R. Use of carotid intima-media thickness in an insurance context. *J Insur Med* 2009;41:127-131.
41. Finn AV, Kolodgie FD, Virmani R. Correlation between carotid intimal-media thickness

and atherosclerosis: a point of view from pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:177-181.

42. Iwata A, Miura S, Imaizumi S, Zhang B, Saku K. Measurement of atherosclerotic plaque volume in hyperlipidemic rabbit aorta by intravascular ultrasound. *J Cardiol* 2007;50:229-234.
43. Soma MR, Donetti E, Parolini C et al. HMG CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Tromb*. 1993;13:571-578.
44. Abdelhalim MA, Alhadlang HA, Moussa SA. Elucidation of the effects of high diet on trace elements in rabbit tissue using atomic absorption spectroscopy. *Lipids Health Dis* 2010;9:2.
45. Wocicly J, Dufkiewicz T, Gietdanowski, J et al. Essential phospholipids modify immunological functions and reduce experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1992;93:7-16.
46. Miyoshi M, Nakano Y, Sakaguchi T, et al. Gene delivery of paraoxonase-1 inhibits neointimal hyperplasia after arterial balloon-injury in rabbits fed a high-fat diet. *Hiper tens Res* 2007;30:85-91.
47. Song SH, Min BI, Lee JH, et al. Chronological effects of atherogenic diets on the aorta and spleen of rabbits. *J Korean Med Sci* 2000;15: 413-419.
48. Birkner E, Kasperczyk S, Zalejka-Fiolka J. Metabolic and antioxidative changes in liver steatosis induced by high fat, low carbohydrate diet in rabbits. *J Physiol Pharmacol* 2005;56: 45-58.