

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**ARTERIOSCLEROSIS EXPERIMENTAL
EN EL CONEJO: DIAGNÓSTICO POR
IMAGEN Y TRATAMIENTO DE LA
ESTENOSIS ARTERIAL MEDIANTE
ANGIOPLASTIA Y CRIOPLASTIA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Lda. Dña. M^a Teresa Balastegui Martínez

Dirigida por:

Dr. D. Fernando Liste Burillo

Dra. Dña. M^a Dolores Ferrer Puchol



VALENCIA
2012





CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Fernando Liste Burillo, Profesor del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera, y María Dolores Ferrer Puchol, Médico adjunta del Hospital Universitario de la Ribera,

INFORMAN: que el trabajo titulado *“Arteriosclerosis experimental en el conejo: diagnóstico por imagen y tratamiento de la estenosis arterial mediante angioplastia y crioplastia”* ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera por **María Teresa Balastegui Martínez**, Licenciada en Veterinaria.

Consideramos que este trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para que la interesada pueda optar al título de Doctora por la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Valencia, 20 de Junio de 2012

Fernando Liste Burillo

María Dolores Ferrer Puchol



RESUM

***ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO GRACIAS A LA
FINANCIACIÓN DE LA CONSELLERÍA DE EMPRESA, UNIVERSIDAD
Y CIENCIA DE LA GENERALITAT VALENCIANA (GV07/39)***

RESUMEN

En este trabajo se ha puesto a punto un modelo de arteriosclerosis utilizando el conejo como animal de experimentación, utilizándose técnicas analíticas, de diagnóstico por imagen e histopatológicas en la evaluación de la efectividad del modelo propuesto. A continuación, se ha descrito una técnica de denudación en la arteria ilíaca externa mediante abordaje transcarotídeo en esta especie, optimizando el protocolo de actuación y describiendo las incidencias comparando dos tipos distintos de catéteres de balón de angioplastia convencional. Por último, se ha comparado la eficacia de la técnica de crioplastia frente al método convencional de angioplastia para el tratamiento de la lesión arterial utilizando conejos con arteriosclerosis inducida, utilizando técnicas analíticas, de diagnóstico por imagen e histopatológicas.

Nuestro modelo de arteriosclerosis inducida por ingestión de dieta hiperlipídica durante 60 días, produjo una elevación plasmática significativa de los niveles de colesterol, provocando la instauración de placas de atheroma en la carótida, cayado aórtico, aorta torácica y abdominal e ilíaca externa.

La técnica de abordaje transcarotídeo para la denudación endotelial de la arteria ilíaca externa del conejo se demuestra eficaz en la creación de estenosis arterial inmediata y a largo plazo, obteniendo menos incidencias negativas de la técnica al utilizar el catéter de menor diámetro y mayor presión de inflado.

Las lesiones arteriales obtenidas tuvieron diferente extensión y grado de maduración histopatológica dependiendo de la localización anatómica y de la presencia o ausencia de denudación endotelial previa. Asimismo, se obtuvo un modelo de hígado graso no alcohólico en el conejo con la administración de esta dieta.

La crioplastia no produce una mejora significativa en la reparación de la estenosis de la arteria ilíaca externa en conejos con arteriosclerosis inducida, presentando lesiones ateromatosas cualitativa y cuantitativamente mayores desde el punto de vista histopatológico en comparación con la angioplastia convencional.

SUMMARY

In this research work we have designed an atherosclerosis model in the rabbit. Ingesta of an enriched cholesterol diet was administered for 60 days. Analytical changes as well as arterial integrity were evaluated with imaging and histopathological techniques. Next, a transcarotideal approach for endothelial denudation of the external iliac artery in the rabbit was developed. Two different angioplasty catheters were essayed, optimizing the experimental protocol and describing incidents. Also, the efficacy of the cryoplasty for the treatment of dietetically-induced arterial lesions was tested against conventional angioplasty.

Our atherosclerosis model increased plasma cholesterol levels, developing atheroma plaques in the carotid, aortic arch, thoracic and abdominal aortae and external iliac arteries.

The transcarotideal approach for endothelial denudation of the external iliac artery in the rabbit produced arterial stenosis at both short and long term. Best results were obtained with the smaller diameter-higher pressure catheter.

Arterial lesions were obtained from ingesta of cholesterogenic diet. Ateromas had different histopathological features and size depending on anatomical localizations and the presence or absence of endothelial denudation. Also, a non-alcoholic, fatty liver model in the rabbit was obtained with this diet.

When compared to conventional angioplasty, cryoplasty did not produce any significant improvement for the repair of diet-induced atherosclerosis in external iliac arteries in rabbits, showing more extensive and severe lesions on histopathological analysis.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Arteriosclerosis y Enfermedad Arterial Periférica.....	3
1.1. Factores de riesgo y clínica de la Enfermedad Arterial Periférica.	3
1.2. Diagnóstico de la Enfermedad Arterial Periférica.....	4
1.1.1. Índice tobillo-brazo.....	4
1.1.2. Diagnóstico por imagen.....	5
1.2.2.1. Técnicas no invasivas.....	5
A. Ecografía vascular.....	5
B. Tomografía Computerizada y Resonancia Magnética.....	7
1.2.2.2. Técnicas invasivas.....	8
A. Ecografía intravascular.....	8
B. Arteriografía convencional.....	8
1.3. Tratamiento de la Enfermedad Arterial Periférica.....	8
2.- Patogénesis e histopatología de la arteriosclerosis.....	11
2.1. Estructura de la pared arterial.....	11
2.2. Fisiopatología de la arteriosclerosis.....	12
2.3. Clasificación histológica de la placa de ateroma.....	15
3.- Radiología vascular intervencionista en el tratamiento de patologías vasculares.....	19
3.1. Angioplastia de balón.....	19
3.2. Reestenosis postangioplastia.....	21
3.3. Crioplastia.....	22
4.- Modelo animal de arteriosclerosis.....	27
4.1. El conejo como modelo animal.....	27
4.2. Otras especies de experimentación.....	31
4.3. Recuerdo anatómico del cayado y la bifurcación aórtica en el conejo.....	32
4.4. Técnica de cateterización y denudación arterial.....	33
4.4.1. Crioplastia y experimentación animal.....	35

	38
II. OBJETIVOS.....	
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
1.- Animales.....	43
1.1. Estabulación.....	43
1.2. Dieta.....	43
1.3. Sacrificio.....	44
2.- Protocolo experimental.....	45
3.- Análisis sanguíneos.....	49
4.- Anestesia.....	49
5.- Diagnóstico por imagen.....	50
5.1. Ecografía vascular.....	50
5.2. Tomografía Computerizada.....	50
5.3. Arteriografía.....	51
6.- Técnicas endovasculares.....	51
6.1. Denudación endotelial y angioplastia.....	51
6.2. Crioplastia.....	53
7.- Obtención de las muestras arteriales e hígado. Análisis histopatológico.....	54
7.1. Disección y tinción Oil Red-O.....	54
7.2. Evaluación macroscópica del ateroma.....	55
7.3. Evaluación microscópica del ateroma.....	56
7.3.1. Análisis cualitativo.....	58
7.3.2. Análisis cualitativo.....	59
8.- Análisis estadístico.....	60

	61
IV. RESULTADOS.....	
1.- Efecto de una dieta aterogénica en el conejo y técnicas diagnósticas de arteriosclerosis experimental.....	63
1.1. Peso e ingesta de pienso.....	63
1.2. Análisis sanguíneos.....	64
1.3. Ecografía vascular.....	66
1.4. Tomografía Computerizada.....	72
1.5. Evaluación macroscópica y microscópica del hígado.....	78
1.6. Evaluación macroscópica de la lesión ateromatosa arterial.....	80
1.7. Evaluación microscópica de la lesión ateromatosa arterial.....	83
2.- Técnica de lesión en la arteria ilíaca izquierda mediante abordaje transcarotídeo en el conejo. Optimización e incidencias.....	93
2.1. Anestesia.....	93
2.2. Cateterización transcarotídea de la arteria ilíaca izquierda.....	93
2.3. Arteriografía no selectiva de la bifurcación aórtica.....	98
2.4. Denudación endotelial de la arteria ilíaca izquierda.....	99
2.5. Incidencias y mortalidad.....	103
3.- Estudio comparativo de la eficacia de dos técnicas de radiología intervencionista en el tratamiento de la estenosis arterial inducida en el conejo: Crioplastia vs. Angioplastia convencional.....	107
3.1. Análisis sanguíneos.....	108
3.2. Ecografía vascular.....	110
3.3. Control por imagen a los 120 días.....	113
3.4. Evaluación histopatológica de la lesión ateromatosa arterial.....	114

V. DISCUSIÓN.....	127
VI. CONCLUSIONES.....	147
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	151

ABREVIATURAS

AHA: American Heart Association

ALB: Albúmina

ALP: Fosfatasa alcalina

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

Atm: Atmósferas

ATP: Angioplastia transluminal percutánea

BILT: Bilirrubina total

CHCM: Concentración corpuscular media de hemoglobina

CML: Células musculares lisas

COL: Colesterol

CREA: Creatinina

EAP: Enfermedad arterial periférica

FDA: Food and Drug Administration

GB: Recuento de leucocitos

GR: Recuento de eritrocitos

GLUC: Glucosa

H-E: Hematoxilina-Eosina

HB: Concentración de hemoglobina

HCM: Hemoglobina corpuscular media

HDL-c: Lipoproteínas transportadoras de colesterol de alta densidad

HTO: Valor hematocrito

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular

IL-1: Interleucina 1

IR: Índice de Resistencia

ITB: Índice tobillo-brazo

IVUS: Intravascular Ultrasound

L: Length

L4: Cuarta vértebra lumbar

L5: Quinta vértebra lumbar

LDH: Lactato deshidrogenasa

LDL-c: Lipoproteínas transportadoras de colesterol de baja densidad

LDL-ox: LDL oxidadas

M: Capa media

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos

MEE: membrana elástica externa

MEI: membrana elástica interna

PAS: Presión arterial sistólica

PLT: Recuento de plaquetas

PPT: Proteínas plasmáticas totales

PVS: Pico de velocidad sistólica

RM: Resonancia Magnética

TASC: Transatlantic Intersociety Consensus

TC: Tomografía Computerizada

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TRIG: Triglicéridos

VCAM-1: Molécula de adhesión a endotelio 1

VCM: Volumen corpuscular medio

VDT: Velocidad diastólica terminal

VLDL-c: Lipoproteínas transportadoras de colesterol de baja densidad

W: Width

INTRODUCCIÓN

1. ARTERIOSCLEROSIS Y ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA

La enfermedad cardiovascular constituye la principal causa de mortalidad en los países desarrollados, con más de 17 millones de muertes al año, y la predicción es que aumente hasta los 23 millones anuales en el año 2030 (Mathers y Loncar, 2006).

La enfermedad arterial periférica (EAP) engloba todas aquellas entidades que son resultado de la obstrucción del flujo sanguíneo en las arterias, con la exclusión del árbol coronario e intracraneal (Ouriel, 2001).

La arteriosclerosis es la causa más frecuente de enfermedad vascular arterial. La arteriosclerosis es un proceso patológico de carácter degenerativo (Joris y otros, 1983) encaminado a alterar la estructura de los vasos arteriales, con el desarrollo de una serie de lesiones que van desde las menos intensas, como es la hiperplasia intimal, a otras de carácter degenerativo de toda la pared y que, en ocasiones, implica la oclusión del vaso (Flórez-Tascón y otros, 1990).

1.1. FACTORES DE RIESGO Y CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA

La arteriosclerosis presenta una etiología compleja, en la que interactúan con efectos aditivos numerosos factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales (Mehrabian y otros, 1998; Goldbourt y Neufeld, 1988; Lusic y otros, 1998).

Los principales factores de riesgo de arteriosclerosis, con componente genético son: niveles elevados de LDL-c/VLDL-c, niveles reducidos de HDL-c, niveles elevados de lipoproteínas, hipertensión arterial, niveles elevados de homocisteína, historia familiar, diabetes y obesidad, niveles elevados de factores hemostáticos, depresión y otras enfermedades del comportamiento, sexo masculino, inflamación sistémica y síndrome metabólico. Los factores de riesgo de arteriosclerosis con componente ambiental son: las dietas altas en grasas, el tabaquismo, los niveles bajos de antioxidantes, la falta de ejercicio, los agentes infecciosos.

La severidad de la enfermedad varía desde pacientes que están asintomáticos a aquellos en los que los síntomas son persistentes (Schainfeld, 2001).

El síntoma principal de la EAP de los miembros inferiores es la claudicación intermitente, esto es, la incapacidad de caminar una distancia concreta debido a malestar o dolor en los músculos de la pierna y que desaparece o mejora mucho al dejar de caminar. El dolor de la claudicación siempre es distal a la localización de la lesión obstructiva y es debido a la isquemia de los tejidos por falta de aporte arterial (Villa y Rodrigo, 2003).

Cuando la enfermedad progresa, el paciente puede sufrir dolor en reposo o isquemia crítica de miembros (Palmer-Kazen y Wahlberg, 2003). La isquemia crítica de miembros se refiere a una condición caracterizada por isquemia crónica con dolor en reposo, aparición de úlceras o gangrena en una o ambas extremidades atribuibles objetivamente a la enfermedad arterial oclusiva a múltiples niveles. Los pacientes con isquemia crítica de miembros tienen más de tres veces riesgo de infarto de miocardio, infarto cerebral y muerte cardiovascular que pacientes con claudicación intermitente. Debido a su impacto negativo en la calidad de vida y a su pobre pronóstico, son de sumo interés los mecanismos de prevención de la isquemia crítica de miembros (Halperin, 2002; Daskalopoulou y otros, 2005). La mortalidad está entre un 3-5% por año en pacientes con claudicación intermitente y un 20% por año en aquellos con isquemia crítica.

Otras causas de claudicación intermitente no arteriosclerosa y mucho menos frecuentes son: la artritis, la estenosis del canal espinal, la radiculopatía, claudicación venosa o los procesos inflamatorios (Schmieder y Comerota, 2001).

1.2. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA

1.2.1. ÍNDICE TOBILLO-BRAZO

El diagnóstico de la EAP se realiza con una prueba sencilla, barata y reproducible, que es el Índice tobillo-brazo (ITB). El ITB es el resultado de dividir la presión arterial sistólica (PAS) de cada tobillo (se escogerá el valor más alto entre la arteria pedia y la tibial posterior) entre el valor de la PAS más alto de cualquiera de las arterias braquiales. Así se obtienen dos valores de ITB, uno para cada miembro inferior, seleccionando como definitivo el más bajo de los dos (Baker y Dix, 1981). Un ITB menor de 0,9 presenta una sensibilidad y una especificidad muy altas para identificar una obstrucción superior al 50% en el territorio vascular de los miembros inferiores en relación con la arteriografía (Fowkes, 1988). Un ITB menor de 0,9 es diagnóstico de EAP, a pesar de que más del 80% de estos sujetos no tenga manifestaciones clínicas (Hirsch y otros, 2001). Pero además, la presencia de un ITB disminuido se asocia con una mayor incidencia de complicaciones coronarias y cerebrovasculares y un mayor riesgo de mortalidad a expensas del incremento de la mortalidad cardiovascular (Criqui y otros, 1992; Newman y otros, 1999; Tsai y otros,

2001. Por lo tanto, un ITB menor de 0,9 es, además de diagnóstico de EAP, sinónimo de alto riesgo cardiovascular, por lo que habrá que tratar intensivamente los factores de riesgo e iniciar tratamiento antiagregante (Hirsch y otros, 2006).

1.2.2. DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

Para el estudio clínico-vascular de la arteriosclerosis, disponemos de técnicas de diagnóstico por imagen, que nos permiten visualizar las características morfológicas y funcionales de las placas arterioscleróticas.

1.2.2.1. TÉCNICAS NO INVASIVAS

A- ECOGRAFÍA VASCULAR

La ecografía es un método de diagnóstico por imagen no invasivo, de bajo costo y preciso. Informa de la presencia de estenosis y del grosor de la pared, identificando la relación entre el grosor de la íntima-media como factor de riesgo cardiovascular. Cuenta con el inconveniente de tener escasa capacidad de caracterización tisular y que no es aplicable a todos los territorios vasculares (O'Leary y otros, 1999).

Dentro de la evaluación ecográfica, existen diferentes métodos que van a servir para identificar la presencia y desarrollo de lesiones estenosantes:

- *Doppler pulsado /Doppler color*: evalúa la reducción del diámetro de la luz del vaso a través de los cambios hemodinámicos registrados, pudiéndose deducir el pronóstico del órgano irrigado por las arterias que estamos estudiando.

- *Ecografía en modo B*: estudia las características histopatológicas de la pared arterial (espesor íntima-media, presencia y caracterización de las placas lipídicas, fibrolipídicas, fibróticas o fibrocálcicas) evaluando su ecogenicidad y comparándola con la adventicia arterial vecina. También se usa este método para ver la textura de las placas (homogéneas o heterogéneas) y estudiar su superficie (lisas, irregulares, ulceradas).

Se utilizan transductores de distinta frecuencia (entre 3 y 10MHz), de tipo lineal o convex, según la porción arterial a estudiar y características físicas del paciente. En lo referente a la técnica de estudio por ecografía Doppler, es imprescindible mantener un ángulo de insonación de 60º a lo largo del eje longitudinal de la arteria para la lectura de la señal

Doppler. En el caso de segmentos arteriales con tortuosidad, hemos de procurar mantener ángulos de insonación de 60° o menores (Zaccardi y Olmsted, 2002).

La ecografía tanto en modo B como en modo Doppler ha demostrado ser útil para describir estenosis en el flujo de las arterias carótidas (Wardlaw y otros, 2006). Los parámetros ecogenidad, heterogeneidad e irregularidad de la pared han sido estudiados para ver la correlación de estos parámetros con la histopatología de la lesión (L. ten Kate y otros, 2010).

La ecografía puede dar información acerca de los componentes de la placa como son el núcleo lipídico, hemorragia intraplaca, inflamación y neovascularización *vasa vasorum*, todos ellos relacionados con la vulnerabilidad de la placa. El uso de la ecografía para la detección cualitativa de la irregularidad de bordes, ecogenidad y heterogeneidad es prometedor. Sin embargo, la precisión de la ecografía para detectar los componentes y características individuales de la placa, muestra una gran variabilidad.

La ecografía tiene poca sensibilidad (60%) para la detección de úlceras, mientras que es más precisa en la detección de bordes irregulares (sensibilidad 97%, especificidad 81%). Sin embargo, este parámetro no tiene un valor clínico relevante (Kagawa y otros, 1996).

En dos estudios se ha comparado la ecografía con TC en los mismos pacientes. El primero demuestra que las medidas de ecografía correlacionan mejor con la histología que las medidas de TC de densidad de tejido lipídico y fibroso y hemorragia intraplaca (Grønholdt y otros, 2001). El segundo demuestra que la TC es más precisa que la ecografía para la detección de placas ulceradas (sensibilidad 94% vs. 38%, especificidad 99% vs. 92%) (Saba y otros, 2007).

La cuantificación de la ecogenidad resultó en una clara mejoría en la detección de los componentes de la placa, mediante el análisis de la distribución de los píxeles. El uso de contraste ecográfico puede mejorar la detección de ulceraciones, al mejorar el contraste entre la luz y la pared del vaso (Kono y otros, 2004). El uso de contraste muestra una correlación significativa de neovascularización *vasa vasorum* y podría ser un nuevo marcador interesante de placa vulnerable.

Se puede concluir que la ecografía puede dar una indicación de los componentes de la placa. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad son limitadas y varían en gran medida, mientras que el desarrollo de nuevas técnicas cuantitativas y la ecografía con contraste muestra posibilidades para el futuro.

B- TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA Y RESONANCIA MAGNÉTICA

Tanto la RM como la TC son capaces de ofrecer imágenes de la estructura de la pared de los vasos sanguíneos, mostrando los diferentes cambios ateroscleróticos que en ella se dan. La RM se ha aplicado en diferentes estudios en medicina humana para visualizar placas ateromatosas en arterias coronarias, carótidas y aorta. Mediante esta técnica se pueden identificar aspectos relevantes de la placa arteriosclerótica tales como sus dimensiones, el tamaño del núcleo lipídico, la presencia de calcificaciones, tejido fibroso y grosor de la cápsula fibrosa (Nighoghossian y otros, 2005). La última generación de sistemas de TC permite incluso diferenciar en los componentes que integran la placa en los vasos sanguíneos. Además, tienen la habilidad de visualizar la pared vascular y dar una medida cuantitativa sobre la calcificación de la placa (Fayad y otros, 2004). Sin embargo, la presencia de calcificaciones por sí sola no es suficiente para la evaluación de placa vulnerable (Achenbach, y otros, 2004).

L. ten Kate y otros, 2010, compararon las tres técnicas de diagnóstico por imagen no invasivas -ecografía, TC y RM-, estudiando sus ventajas e inconvenientes a la hora de valorar placas vulnerables. En sus conclusiones vieron que, mientras la ecografía está limitada a la evaluación del sistema vascular superficial, la TC es cada vez más utilizada para la valoración de las arterias coronarias. La limitación de la tomografía radica en la caracterización de la placa, por tener un pobre contraste tisular y una resolución espacial moderada. La RM muestra la mejor discriminación entre los componentes de la placa, pero esta técnica tiene una resolución espacial relativamente baja y está contraindicada en pacientes con insuficiencia renal, claustrofobia severa y con implantes electrónicos.

La detección del grado de estenosis combinado con la composición de la placa y la alteración del proceso metabólico, puede proporcionar una visión más clara en el desarrollo de la enfermedad vascular aterosclerótica, la identificación de placas vulnerables y la evaluación de su respuesta al tratamiento (Fayad y Fuster, 2001). Además, estas técnicas proporcionan información sobre las complicaciones de la placa, tales como hemorragia, ulceración, ruptura y trombosis. Las actuales técnicas de imagen no invasivas muestran resultados prometedores, sin embargo, los estudios carecen de mediciones estandarizadas. Es necesario consensuar estándares reproducibles, tanto en imagen como en histología. El desarrollo de las técnicas de imagen no invasivas, centradas en los *vasa vasorum* y la evaluación in situ de la inflamación, mejorará la identificación de pacientes con mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, pudiendo así guiar las decisiones terapéuticas (L. ten Kate y otros, 2010).

1.2.2.2. TÉCNICAS INVASIVAS

A- ECOGRAFÍA INTRAVASCULAR

La ecografía intravascular (IVUS) es una técnica de imagen que proporciona imágenes de ultrasonidos de alta resolución de la luz y la pared de la arteria. Además de revelar información sobre el área de la luz, el área de la placa y el área del vaso, esta modalidad de imagen puede identificar componentes morfológicos de la placa a través de diferencias en la ecogenicidad (Nighoghossian y otros, 2005).

La ecografía intravascular es más sensible que la angiografía convencional en detectar presencia de arteriosclerosis, y más precisa en medir la gravedad de la lesión (Tobis y otros, 1991). Además, proporciona una información adicional de la composición de la placa (Yamagishi y otros, 2000), ya que puede distinguir diferentes ecogenicidades en las placas, y puede detectar la presencia de lípidos con alta especificidad, aunque limitada sensibilidad (Prati y otros, 2001).

B- ARTERIOGRAFÍA CONVENCIONAL

La angiografía o arteriografía se considera el procedimiento estándar en el diagnóstico de la estenosis arterial, aunque tiene un valor relativo bajo en la caracterización de la placa. Estaría indicada para trazar la extensión y localización de la patología arterial previa a la revascularización (Halperin, 2002; Schmieder y Comerota, 2001). Se trata de un proceso diagnóstico mediante el cual conseguimos la visualización de determinados vasos sanguíneos mediante la introducción de contraste en el organismo, y la posterior visualización del mismo mediante radiología, tomografía computerizada (TC) y resonancia magnética (RM).

1.3. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA

El objetivo del tratamiento es reducir los síntomas isquémicos, aliviar la incapacidad, mejorar la capacidad funcional, prevenir la progresión a gangrena o amputación, y prevenir eventos cardiovasculares y cerebrales (Hilleman, 1998).

Se recomienda modificar el estilo de vida, dejar de fumar, aumentar el ejercicio y mejorar la dieta como parte del tratamiento, para la reducir el riesgo (Khan y otros, 2005).

El tratamiento farmacológico incluye anticoagulantes (aspirina, clopidogrel), IECA's, β -bloqueantes y fármacos para disminuir la lipemia (principalmente estatinas) (Antignani, 2003).

El tratamiento quirúrgico de revascularización puede realizarse con diversas técnicas de endarterectomía, o por técnicas de bypass, mediante procedimientos de anastomosis vascular (Cao y otros, 2002).

El tratamiento endovascular consiste en la aplicación de prótesis endovasculares o stents y diversos procedimientos de angioplastia que se explicarán en un punto posterior.



2. PATOGÉNESIS E HISTOPATOLOGÍA DE LA ARTERIOSCLEROSIS

2.1. ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL

La pared arterial está compuesta por tres capas o túnicas concéntricas (Bacha y otros, 1998):

- *Túnica íntima*. Consiste en una capa simple de células epiteliales escamosas, el endotelio, que descansa sobre una lámina basal de tejido conectivo. Esta capa subendotelial está compuesta por tejido conectivo y, en arterias y arteriolas, una capa de tejido elástico fenestrado llamado lámina o membrana elástica interna (MEI). Las fenestraciones permiten que las sustancias difundan a través de la capa y lleguen a las células que se encuentran dentro de la pared del vaso. En ocasiones en el tejido conectivo puede haber células musculares de músculo liso.

- *Túnica media*: Está formada primariamente por capas circulares concéntricas de músculo liso. En las arterias, es relativamente gruesa y se extiende desde la membrana elástica interna hasta la membrana elástica externa (MEE). Ésta es una capa de elastina que separa la túnica media de la adventicia en las arterias. Existen cantidades variables de elastina, fibras reticulares y proteoglicanos entre las células lisas de la túnica media. Las láminas de elastina están fenestradas y dispuestas en capas concéntricas. Todos los componentes extracelulares de la túnica media son segregados por las células musculares lisas.

- *Túnica adventicia*: Se encuentra compuesta principalmente por tejido colágeno dispuesto de forma longitudinal y unas pocas fibras elásticas. Estos elementos tisulares conectivos se entremezclan gradualmente con el tejido conectivo que rodea a los vasos. La túnica adventicia puede ser desde relativamente delgada en la mayor parte del sistema arterial, hasta bastante gruesa en las venas y vénulas (en las que es el principal componente de su pared).

Los *vasa vasorum* y *nervi vasorum* suministran el riego y la inervación a la adventicia y la mitad exterior de la media. La íntima y la otra mitad interior de la media son avasculares, y dependen de la difusión desde la luz vascular.

2.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ARTERIOSCLEROSIS

La aterogénesis es un proceso que evoluciona a lo largo de muchos años, y es probable que el crecimiento de las placas arterioscleróticas sea discontinuo en lugar de lineal, con períodos de inactividad relativa interrumpidos por episodios de rápida evolución (Ross, 1986; Stary y otros, 1994). Después de una fase silente, habitualmente prolongada, la arteriosclerosis puede hacerse clínicamente manifiesta.

La enfermedad afecta preferentemente a determinados territorios de la circulación arterial y produce manifestaciones clínicas que dependen del lecho vascular afectado (Ross, 1986, 1993); Asimismo, dentro de un territorio arterial determinado, suele producir una lesión focal sobre zonas predispuestas, especialmente en puntos de ramificaciones arteriales donde el flujo sanguíneo es turbulento.

En el siglo XIX existían dos hipótesis que intentaban explicar la patogénesis de la arteriosclerosis, la hipótesis trombogénica (Von Rokitansky, 1852) y la hipótesis lipídica (Virchow, 1856). Estas dos hipótesis están actualmente integradas en una hipótesis más compleja, hipótesis de respuesta al daño, que representa la visión actual de la patogénesis inicial de la aterosclerosis y se basa en el resultado que provoca una disfunción endotelial, con una serie de respuestas celulares y moleculares altamente especializadas que se traducen en una enfermedad con un componente inflamatorio importante (Ross, 1986, 1993, 1999).

Las diferentes etapas en la progresión de la enfermedad se describen a continuación (Fuster y otros, 1992).

En condiciones normales el endotelio se encuentra orientado en la dirección laminar del flujo sanguíneo, exhibe una baja permeabilidad lipoproteica y posee mecanismos de control para mantener una superficie anticoagulante. En las zonas donde el endotelio se encuentra sometido a un mayor estrés hemodinámico (bifurcaciones arteriales) se produce un cambio del genotipo endotelial (Breslow, 2000), que se convierte en proinflamatorio y antifibrinolítico. Así, se produce un aumento de la permeabilidad del endotelio a las lipoproteínas plasmáticas, que se modifican en el tejido subendotelial, fundamentalmente en forma de LDL oxidadas (ox-LDL), las cuales inducen una respuesta inflamatoria local, que es la responsable de los siguientes pasos del desarrollo de la lesión.

Existe reclutamiento focal de monocitos de la sangre a la íntima, que da lugar a la activación endotelial y a la adhesión entre el endotelio y los leucocitos. Las ox-LDL activan el

endotelio para expresar los genes que codifican las moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, selectina P), que atrapan a los monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio por diapédesis a través de uniones interendoteliales y colonizan la íntima subendotelial. Los monocitos de la íntima se activan y se transforman en macrófagos que fagocitan las ox-LDL en un intento de depurar la pared arterial del exceso de lípidos, con lo que se transforman en células espumosas.

El resultado final de todos estos pasos es la formación de la *estría grasa*. En la *estría grasa* dominan las células espumosas derivadas de los macrófagos y los lípidos son predominantemente intracelulares.

Los macrófagos desempeñan una función primordial en el equilibrio del metabolismo lipídico de la pared arterial durante la aterogénesis. Algunos macrófagos cargados de lípidos podrían abandonar la pared arterial y cumplir así su función limpiadora de lípidos de la arteria. La acumulación de lípidos y, en consecuencia, la tendencia a formar una placa de ateroma, se produce cuando en la pared arterial penetran más lípidos de los que salen.

Hay evidencia de que las *estrias grasas* son lesiones reversibles. Se consideran precursoras de las placas fibrosas más avanzadas, aunque no es seguro que todas las *estrias grasas* progresen necesariamente para convertirse en placas fibrosas.

La formación de *placas fibrosas* tiene un crecimiento explosivo en la segunda y tercera décadas de la vida. En la transición de la *estría grasa* a la placa fibrosa existe una persistencia de los mecanismos que llevan al inicio de la lesión, así como una insuficiencia en los procesos que facilitan la regresión de la lesión. Se produce la muerte de las células espumosas, quizá por apoptosis (Hutter y otros, 2001; Tedgui y Mallar, 2001), lo que conduce a la formación de un núcleo lipídico necrótico extracelular dentro de la lesión, rasgo característico de las lesiones complicadas. El núcleo lipídico es importante por dos razones: primero, porque es intersticial y constituye un poso de lípidos metabólicamente inerte no accesible a los mecanismos biológicos de depuración; segundo, porque, con toda probabilidad, contribuye a la fragilidad y vulnerabilidad global de la placa para su fisuración. Las células musculares lisas migran hacia la íntima arterial y proliferan. En las arterias normales las células musculares lisas expresan fundamentalmente la isoforma α -actina muscular y los filamentos intermediarios, como la vimentina y la desmina. Este fenotipo se altera en la hiperplasia intimal, y las células musculares lisas adoptan un estado diferente que se caracteriza por la expresión de β -actina no muscular y de γ -actina muscular. Asimismo, existe un aumento de la vimentina y una

disminución de la desmina. Se produce síntesis de tejido conjuntivo, colágeno, elastina y proteoglicanos. Determinados factores de crecimiento y citocinas, sintetizados por los fagocitos mononucleares, estimulan la proliferación de las células musculares lisas y la producción de matriz extracelular, que se acumula en las placas ateroscleróticas. La interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) son citocinas que favorecen la producción local de factores de crecimiento, entre ellos el factor de crecimiento de origen plaquetario y el fibroblástico, junto a otros que podrían intervenir en la evolución y complicación de la lesión aterosclerótica.

La placa fibrosa muestra un adelgazamiento considerable de la media. En el 80% de las lesiones existe evidencia de inflamación crónica, reflejada por el infiltrado linfocítico en la adventicia. Se caracteriza por la ulceración o denudación de la superficie con fisura o fracturación de la placa. Se producen fisuras endoteliales microscópicas en las que aparecen microtrombos ricos en plaquetas, debido a la exposición de la matriz, que es muy trombogénica, y en la membrana basal subyacente. Es frecuente encontrar trombos murales en varias etapas de organización, y la trombosis mural puede ser oclusiva. Las plaquetas que se activan secretan factores que facilitan la respuesta fibrótica. Es probable que la mayoría de estos microtrombos desaparezcan, sin dejar secuelas clínicas, por un proceso de fibrinólisis focal, reabsorción y reparación del endotelio. Puede haber hemorragia intramural, calcificación y neovascularización de la placa.

A medida que avanza la lesión aterosclerótica, se forman abundantes plexos microvasculares en relación con los *vasa vasorum* de las arterias. Estas redes microvasculares favorecen la complicación de la placa, pues ofrecen una puerta de entrada a los leucocitos y pueden constituir focos de hemorragia dentro de la placa. Estos vasos son friables y tienden a romperse y producir hemorragia local. En estas zonas de sangrado se produce trombosis *in situ* y formación de trombina a partir de la protrombina. Alrededor del núcleo lipídico se forman granulomas y se produce una inflamación de naturaleza linfocitaria en la adventicia de origen autoinmune.

Las placas de ateroma avanzadas suelen tener un carácter fundamentalmente fibroso, sin el aspecto hiper celular de las lesiones menos avanzadas, y poseen muy pocas células musculares lisas. En estos ateromas, tanto las fibras musculares lisas como los macrófagos pueden sufrir muerte celular programada o apoptosis (Hutter y otros, 2001; Tedgui y Mallar, 2001).

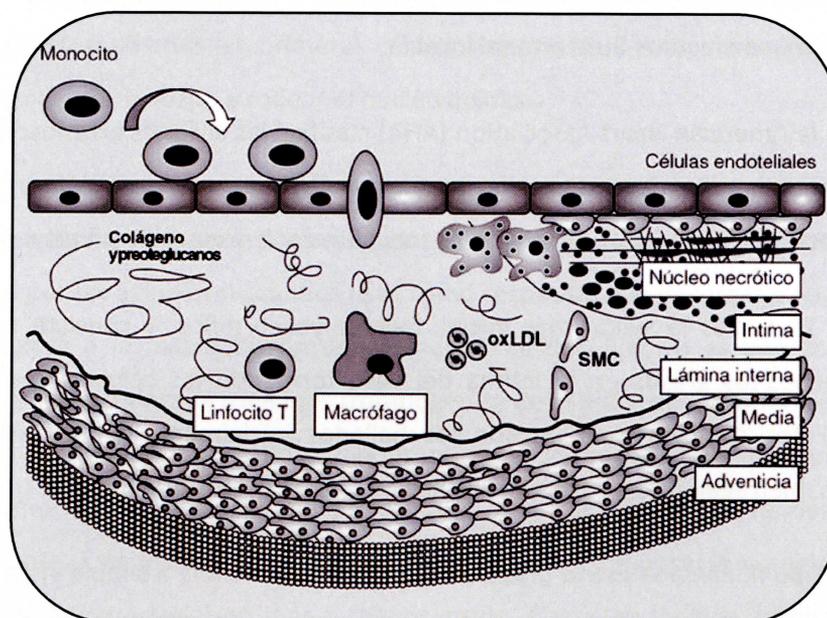


Figura II-1: Formación de la placa de ateroma. En la parte superior los monocitos se adhieren al endotelio vascular, penetran la línea endotelial y entran a la íntima de la pared del vaso por diapédesis entre las células endoteliales. Este proceso requiere de un gradiente quimioatrayente como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) o las LDL modificadas. En la parte media de la imagen se observa en la íntima que los monocitos maduran a macrófagos, los cuales aumentan la expresión de receptores y fagocitan lipoproteínas modificadas. Los ésteres de colesterol acumulados en el citoplasma activan a los macrófagos dando lugar a las células espumosas. Estas células son características de los estadios tempranos de la aterosclerosis; Los macrófagos producen factores de crecimiento y citoquinas que amplifican la señal proinflamatoria; Los linfocitos T también migran a la íntima produciendo citoquinas proinflamatorias, que amplifican la actividad inflamatoria colaborando en la formación de la placa de ateroma. En la parte inferior se muestra la multiplicación de las células del músculo liso, las cuales migran y se acumulan en la placa, y dan una abundante matriz extracelular. Si la lesión avanza, el lumen arterial se estrecha hasta que el flujo se obstruye dando lugar a las manifestaciones clínicas (Nácher y otros, 2007).

2.3. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PLACA DE ATEROMA

La aterosclerosis se caracteriza histológicamente como una lesión focal en las arterias de mediano y gran calibre, constituida por un cúmulo de células, material extracelular y lípidos en la capa íntima que compromete el flujo sanguíneo y afecta a los órganos irrigados por la arteria lesionada. Las lesiones pueden estar presentes a lo largo de la vida de las personas; de hecho, el tipo de lesión más precoz, la estría grasa, es común en la infancia y adolescencia precoz; es una lesión inflamatoria que consiste en un cúmulo de macrófagos cargados de lípidos (células esponjosas) y linfocitos T en la capa íntima (Stary y otros, 1994; Ross, 1999). El

crecimiento de las estrías grasas evoluciona hacia la placa fibrosa, que cuando forma una protrusión intraluminal afecta el flujo arterial local.

En 1995, la American Heart Association (AHA) clasificó las lesiones arterioscleróticas en 8 tipos diferentes (Stary y otros, 1994, 1995). A las tres primeras se les considera *lesiones iniciales*, y a las dos intermedias, *lesiones avanzadas*, y a las tres últimas, *lesiones complicadas*:

- Lesión Tipo I: es la lesión más inicial, hallada ya en niños, y consiste tan sólo en microscópicos depósitos grasos en la íntima del vaso formando las células espumosas, de forma aislada. Estos cambios también son los hallados inicialmente en los animales de experimentación, bien sean ratas, conejos o monos con hipercolesterolemia.

- Lesión Tipo II: llamada **estría grasa** y en ocasiones ya visible a simple vista como una lesión amarillenta en la superficie de las arterias, que se tiñe con facilidad con Sudán IV, y que engrosa la íntima aunque menos de 1 mm. Aquí encontramos células espumosas en mayor cantidad dispuestas en hileras, y acompañadas ya por células musculares lisas también rellenas de lípidos, y linfocitos T en menor medida. Asimismo existen también depósitos lipídicos extracelulares aunque sólo visibles con microscopio electrónico. El 99% de los niños entre 2 y 15 años tienen estas lesiones a nivel aórtico. La mayoría de estas lesiones se encuentran situadas en los ostiums de salida de las distintas colaterales de la aorta. El ser una lesión visible a simple vista en la mayoría de los casos ha hecho de ella la más estudiada en animales de experimentación.

- Lesión Tipo III: es la lesión intermedia o de transición o **preateroma**, caracterizada por un mayor depósito de lípidos extracelulares que interrumpen la disposición ordenada de las células espumosas y desplazan las células musculares lisas de la íntima. La unión de los distintos cúmulos lipídicos de la lesión III dará lugar al **núcleo lipídico** (lesión tipo IV).

- Lesión Tipo IV: es llamada **ateroma** propiamente dicho y aparece a partir de la tercera década de la vida. La luz arterial puede empezar a disminuir. Existe un núcleo lipídico constituido por una acumulación bien delimitada de lípidos extracelulares a nivel de la íntima, causando una desorganización y un engrosamiento inicialmente excéntrico de la misma. Las células musculares lisas son desplazadas por este cúmulo lipídico y entre este núcleo y las células endoteliales existe la capa de proteoglicanos de la íntima infiltrada por macrófagos, linfocitos, y alguna célula muscular lisa. Cuando esta zona empieza a ser ocupada por tejido fibroso, básicamente colágeno, pasaremos a la lesión tipo V. La lesión tipo IV será susceptible de fisurarse y trombosarse por sus zonas más débiles (dando lugar a la lesión tipo VI), tanto en

su superficie como en la periferia donde existe también un cúmulo de macrófagos, con poco colágeno. Existen además las primeras células espumosas y musculares lisas en apoptosis, y algunos capilares empiezan a rodear al núcleo lipídico.

- Tipo V: lesión llamada **fibroateroma** o lesión Va. En ella encontramos una capa fibrosa bien conformada que cubre el núcleo lipídico, compuesta básicamente por colágeno sintetizado por las células musculares lisas como respuesta a la desorganización de la íntima, y que reemplaza a la matriz de proteoglicanos. El núcleo lipídico es una zona hipocelular y avascular, y se considera la zona más trombogénica de la placa de ateroma. En él se produce la deposición de cristales de colesterol, lipoproteínas modificadas, detritus celulares, monocitos, macrófagos y células espumosas. Se produce a partir de la cuarta década de la vida habitualmente. Esta lesión es susceptible de fisurarse y trombosarse y además presenta una estenosis de la luz arterial en más o menos grado. El núcleo lipídico seguirá rodeándose de capilares favoreciendo las microhemorragias. A nivel de la media también se producen cambios con una disminución de las células musculares lisas y un aumento de los macrófagos y linfocitos, y los depósitos lipídicos, lo que puede debilitar la pared arterial y facilitar la aparición de aneurismas.

- Tipo VI: son las lesiones complicadas por evolución de los tipos IV y V habitualmente, con fisuras (VIa), hemorragias (VIb), y trombosis (VIc). La morbimortalidad producida por la aterosclerosis es básicamente debida a estas lesiones. Las lesiones tipo IV y V son las más susceptibles a accidentarse debido al predominio en ellas de células espumosas, que las hacen más susceptibles de lesionarse, sobretodo a nivel de los márgenes. Las distintas lesiones y reparaciones (regresando al tipo V) que se irán produciendo con el tiempo provocarán una estenosis cada vez mayor de la luz arterial. Aunque las trombosis en general se verán favorecidas por la disrupción de las placas, en otros casos se producirán sin roturas previas favorecidas por factores predisponentes de cada individuo como un aumento del fibrinógeno, o niveles altos de la Lp(a) que inhibiría la fibrinolisis.

- Tipo VII: se produce cuando encontramos calcificación del núcleo lipídico o de otras partes de la lesión, predominando sobre el acúmulo lipídico. Llamada también tipo Vb.

- Tipo VIII: existe un predominio del tejido fibroso sobre el acúmulo lipídico, por aumento del primero y resorción del segundo. Llamada también tipo Vc.

Estos 2 últimos tipos pueden representar la fase final de la evolución de las lesiones histopatológicas de la aterosclerosis, reemplazando los depósitos lipídicos y las células muertas por colágeno o calcio o ambos. Estas lesiones también pueden reproducirse experimentalmente en animales cuando disminuimos bruscamente el aporte de colesterol.

La posibilidad de regresión de estas lesiones ha sido estudiada en experimentación animal y se ha visto que cuando los factores de riesgo son reducidos, las lesiones tipo I, II, y III pueden regresar completamente, la tipo IV puede regresar parcialmente y los tipos V y VI pueden pasar a tipos VII y VIII (Stary, 1996).

3. RADIOLOGÍA VASCULAR INTERVENCIONISTA EN EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS VASCULARES

La Radiología vascular e intervencionista es una rama de la Radiología caracterizada por la realización de procedimientos diagnóstico-terapéuticos, con abordaje percutáneo poco invasivo, guiados siempre por técnica de imagen. Los procedimientos endovasculares realizados en el campo de la Radiología vascular e intervencionista comprenden básicamente todas las técnicas de recanalización vascular así como la embolización intraarterial.

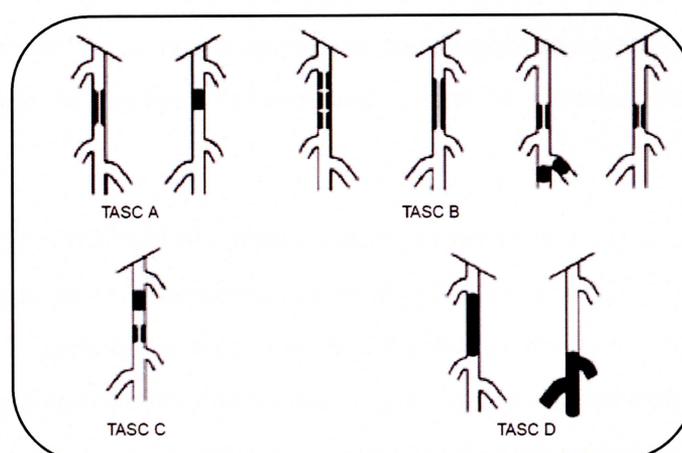
3.1. ANGIOPLASTIA DE BALÓN

Charles Dotter, el padre de la radiología intervencionista, introdujo la angioplastia transluminal en 1964, junto a Melvin Judkins, en la Universidad de Oregón en Portland (Dotter y otros, 1964). Dotter utilizó múltiples catéteres para aumentar la luz y repermeabilizar arterias de los miembros inferiores con enfermedad arteriosclerótica. En 1967, el doctor Judkins desarrolló su propio sistema de diagnóstico angiográfico, con la introducción de catéteres especializados y perfeccionando el acceso transfemoral mediante la técnica de punción inguinal.

Tras aprender las técnicas de Dotter en Nuremberg, Andreas Grüntzig inventó en 1974, un catéter de doble luz equipado con un balón de polivinilcloruro (Grüntzig y Hopff, 1974). El 16 de septiembre de 1977, en Zurich, Grüntzig marcó un hito en la radiología intervencionista, al efectuar de forma programada la primera angioplastia coronaria transluminal percutánea con catéter de balón en un humano despierto (Grüntzig y otros, 1979).

Desde entonces, más de cuarenta mil artículos publicados certifican la importancia de la angioplastia de balón a la hora de tratar patologías circulatorias. Las indicaciones de la angioplastia han ido creciendo en paralelo a los avances tecnológicos. De igual importancia ha sido el desarrollo de nuevas generaciones de angiografía digital, que mejoran espectacularmente la imagen radiológica e introducen la posibilidad de cuantificación angiográfica automática inmediata. Por último, han aparecido nuevos dispositivos que permiten el tratamiento tanto de lesiones desfavorables como de las complicaciones que pueden ocurrir con la angioplastia. También el uso de mecanismos de apoyo hemodinámico han permitido que la angioplastia se realice ahora con mayor confianza y seguridad, incluso en pacientes anteriormente considerados de riesgo inaceptablemente alto.

Un punto principal para decidir el tratamiento vascular a realizar en la enfermedad arterial periférica (EAP) es el tipo de lesión. Para ello, se publicó en el año 2000 la clasificación TASC (TransAtlantic InterSociety Consensus on the Management of Peripheral Arterial Disease) (Figura I-2), como resultado de la colaboración de 14 sociedades médicas y de cirugía vascular, cardiovascular, de radiología vascular y cardiología en Europa y Norteamérica. La guía TASC define los tipos de lesiones para las intervenciones y las clasifica en cuatro grupos. Los dos extremos son las lesiones tipo A, en las que el abordaje endovascular es el tratamiento de elección, y las lesiones tipo D, en las que es recomendable la cirugía abierta. Entre ambos grupos están las lesiones B y C, en las que no es posible hacer recomendaciones firmes sobre la intervención preferida. Actualmente el tratamiento endovascular es el más usado en las lesiones tipo B y el quirúrgico en las C. Esta clasificación tiene la ventaja de estandarizar la descripción de las lesiones y promover la comunicación de resultados comparables (TASC, 2000).



TASC A: Estenosis < 10 cm de longitud. Oclusión < 5cm de longitud.

TASC B: Múltiples estenosis u oclusiones <5 cm de longitud cada una. Estenosis única <15 cm de longitud que no incluya la región infragenicular de la arteria poplítea (2ª y 3ª porción). Calcificación extrema con lesiones < 5 cm de longitud. Estenosis poplítea única.

TASC C: Múltiples estenosis u oclusiones >15 cm de longitud. Estenosis recurrentes a pesar de 2 procedimientos endovasculares previos.

TASC D: Oclusiones totales de la arteria femoral común o femoral superficial > 20 cm de longitud, con implicación de la arteria poplítea. Oclusión total de la arteria poplítea, así como los vasos tibiales y tronco.

Figura I-2: Clasificación TASC de la región femoropoplítea (Transatlantic Intersociety Consensus) (TASC, 2000).

El éxito técnico y clínico de la angioplastia como tratamiento endovascular en el sector femoropoplíteo excede el 95%, siempre y cuando la estenosis u oclusión sea menor de 10 cm de longitud (TASC A). Cuando existe una enfermedad clasificada como TASC C o D (estenosis u oclusiones mayores de 15 cm longitud) las permeabilidades son mayores en tratamientos quirúrgicos convencionales, como la creación de bypass. La permeabilidad en una angioplastia en TASC C o D no está por encima del 45% a un año, comparado con el bypass que en el segmento femoral alcanza hasta un 80% de permeabilidad a un año. La terapia endovascular es una alternativa confiable y segura para resolver la EAP oclusiva, especialmente en el sector infrainguinal. Actualmente los métodos de mínima invasión deben considerarse como de primera elección, a excepción de que exista una contraindicación absoluta para el procedimiento (Dormandy y Rutherford, 2000).

3.2. REESTENOSIS POST-ANGIOPLASTIA

Varios estudios consideran la angioplastia como tratamiento de elección para las estenosis cortas de la región infrainguinal, con una tasa de éxito de 75-95% (Krankenber y otros, 2007; Tepe y otros, 2006). A pesar de los buenos resultados a corto plazo, el beneficio de la angioplastia está limitado por el desarrollo de reestenosis de la luz vascular a largo plazo. La hiperplasia neointimal, la remodelación arterial, el retroceso elástico, la reducción de la pared arterial y la formación de trombos en el sitio de la lesión vascular contribuyen a la reestenosis (Post y otros, 1997; Schwartz y otros, 1998). Después de la angioplastia de balón convencional se produce un estrechamiento en la luz vascular en aproximadamente el 30-40% de los casos durante los 6 primeros meses (Laird, 2006; Wyttenbach y otros, 2004).

Tanto estudios histopatológicos experimentales en modelos animales como estudios de imagen *in vivo* demuestran que la angioplastia produce un daño al endotelio y subendotelio, dañando la estructura de la membrana elástica interna y de las fibras elásticas subendoteliales. El trauma vascular induce una respuesta inflamatoria local y hemostática que resulta en la activación de la cascada molecular de adhesión de leucocitos. La infiltración de monocitos y otras moléculas inflamatorias en el sitio de la lesión estimula la proliferación de células musculares lisas, que migran a la íntima y secretan una cantidad elevada de matriz extracelular. El resultado es la formación de la neoíntima y la reestenosis (Wildgruber y Berger, 2008).

3.3. CRIOPLASTIA

Una nueva técnica endovascular que podría reducir la incidencia de restenosis post-angioplastia en las arterias periféricas, es la crioplastia.

La crioplastia combina la angioplastia convencional (ATP) con el efecto de la energía criotermal. El principio de la crioplastia se basa en la utilización de óxido nitroso, el cual optimiza los efectos de la dilatación al liberar energía criotérmica. El balón de crioplastia es posicionado en la lesión y se dilata por la infiltración de óxido nitroso líquido a través de un sistema de catéter de triple lumen. Dentro del globo el óxido nitroso líquido pasa a gas, inflando el balón aproximadamente a 8 atmósferas. Esta evaporación lleva a la superficie del balón a alcanzar la temperatura de -10 C. El globo se mantiene inflado y congelado durante 20 segundos, hasta que se desinfla y retira (Wildgruber y Berger, 2008).

El principal efecto de la crioplastia es la inducción de apoptosis en las CML que normalmente contribuyen al proceso de reestenosis, gracias a que consigue un ambiente intracelular hipertónico. Al congelarse las células y formarse hielo intracelular, el agua libre sale de la célula y el ambiente interno se hace significativamente hipertónico. Esta hipertonicidad es la desencadenante de la apoptosis e induce la muerte celular programada. Después del inflado del balón de crioplastia las células vuelven a calentarse, absorbiéndose el agua libre y restaurándose la isotonicidad. Las membranas celulares permanecen intactas, y las células se eliminan por pinocitosis y fagocitosis. El resultado final es una reducción de las CML disponibles para contribuir a la reestenosis (Joye, 2005).

El primer estudio clínico de crioplastia en el segmento femoropoplíteo fue publicado por Fava (Fava y otros, 2004). Estos autores llevaron a cabo un estudio multicéntrico clínico en 15 pacientes con diversos grados de EAP. Las tasas de permeabilidad fueron evaluadas con el índice tobillo-brazo y mediante angiografía a los 6 y 18 meses. Se observó una tasa de permeabilidad del 83% después de 14±4 meses. Los resultados de este estudio no son consistentes debido al pequeño número de muestra y a la heterogeneidad del grupo.

Laird y otros, 2005 realizaron un estudio prospectivo multicéntrico de 102 pacientes con lesiones en el sector femoropoplíteo. El éxito del procedimiento fue del 94% a corto plazo, mejorándose el índice tobillo-brazo en un seguimiento a los nueve meses. La permeabilidad clínica estuvo presente en el 82% de los pacientes tratados, mostrándose mejores resultados que con la angioplastia convencional. Mediante ecografía Doppler se encontró una permeabilidad del 70%.

Joye, 2005 publicó un artículo en el que se describen las aplicaciones clínicas de la crioplastia en la enfermedad arterial infrainguinal así como las consideraciones técnicas del procedimiento basados en estudios clínicos previos. En este estudio se demuestra que la crioplastia minimiza la proliferación neointimal a través de la inducción de apoptosis de las líneas celulares que contribuyen a la reestenosis. Además, los efectos mecánicos sobre la arquitectura de la pared del vaso y la propia placa reducen la probabilidad de rotura vascular tras la crioplastia, en comparación con la angioplastia transluminal percutánea. Esta publicación apoya la crioplastia como terapia de elección para el tratamiento endovascular de la EAP.

En el año 2006 la FDA (US Food and Drug Administration) aprobó el uso de la crioplastia para procedimientos vasculares relacionados con patología obstructiva en sector infrainguinal.

La insuficiente estandarización de las investigaciones clínicas realizadas sobre la EAP refleja una falta de evidencia en la que basar la recomendación de la crioplastia frente a la angioplastia de balón (Diehm y otros, 2007).

Los estudios clínicos revisados sugieren que la crioplastia es una técnica factible y segura para el tratamiento de la enfermedad femoropoplítea. Sin embargo no se ha podido constatar que ofrezca ninguna ventaja sobre la angioplastia tradicional (Wildgruber y Berger, 2008). Estos autores realizaron una revisión de estudios tanto clínicos como experimentales, sin encontrar evidencia de que la crioplastia fuese a resolver el problema de la hiperplasia neointimal y la formación de reestenosis posteriores. Estudios en modelos *in vitro* sí que demuestran que la inducción de apoptosis de las CML por la aplicación de crioplastia es factible y eficaz. Pero estos estudios (Grassl y Bischof, 2005) también demuestran que el ajuste de parámetros como la temperatura del balón, la velocidad de enfriamiento, la temperatura alcanzada en el tejido, el tiempo que se mantiene la crioplastia y la velocidad de recalentamiento es decisivo para la inducción de apoptosis. La discrepancia entre los parámetros que permiten una óptima inducción de apoptosis *in vitro* y los parámetros utilizados en el ámbito clínico, puede explicar el motivo por el que la reducción en la reestenosis no ha sido tan eficiente como se esperaba. Los valores óptimos en los parámetros para aplicar la crioplastia en la clínica aún no se han determinado.

Schmieder y otros, 2010, realizaron una revisión retrospectiva de todos los pacientes tratados con crioplastia entre 2004 y 2008. Se trataron con crioplastia 35 lesiones difíciles ya

intervenidas previamente con otras técnicas endovasculares, obteniéndose tasas de permeabilidad del 17%. Esta menor permeabilidad, comparada con los estudios previos realizados (Laird y otros, 2005) podría deberse a que se trataba de reintervenciones en lesiones graves. Además de las limitaciones de la revisión, este estudio muestra que el uso de la crioplastia en lesiones difíciles y reintervenidas da lugar a resultados clínicos y de permeabilidad pobres. Además debe sopesarse su utilización por el coste del balón de crioplastia (1800 \$).

Con el objetivo de estandarizar y homogeneizar los grupos de estudio para la valoración de la crioplastia frente a la angioplastia, Spiliopoulos y otros, 2010, investigaron los resultados a largo plazo de la crioplastia frente a la angioplastia convencional en el sector femoropoplíteo de pacientes diabéticos. También en este caso se ha demostrado la seguridad de esta técnica, pero no una mayor efectividad frente a la angioplastia con balón. No existe un beneficio importante en cuanto al éxito de la técnica ni del stent ni de la permeabilidad resultante a largo plazo. Además, la reestenosis y las altas tasas de revascularización de la lesión comprometen la relación coste-beneficio del procedimiento, debido al mayor coste del balón de crioplastia.

En otro estudio retrospectivo realizado a pacientes con EAP de la región femoropoplíteo, se comprobó la seguridad de la técnica de crioplastia y su alto porcentaje de éxito perioperatorio, midiendo el ITB. Sin embargo, no se recomienda la crioplastia como opción para el tratamiento definitivo de la EAP debido a la alta tasa de reintervención en los primeros 6 meses (Silva y otros, 2011).

También se ha comparado la eficacia de la crioplastia frente a la angioplastia tradicional en la arteria femoropoplíteo a más largo plazo. Se hicieron controles a los 1, 6, 9, 12, 24 y 36 meses de la intervención, mediante el cálculo del ITB y ecografía Doppler. A lo largo de los tres años, las tasas de permeabilidad se tienden a igualar para las dos modalidades de revascularización (Díaz y otros, 2011).

A pesar de los alentadores resultados iniciales, los últimos informes no establecen la superioridad de la crioplastia a largo plazo frente a la angioplastia convencional. Por ello, existe un interés creciente en el estudio de los cambios biomecánicos inducidos por la hipotermia sobre la pared vascular. Se trata de estudios *in vitro* que simulan el fenómeno biológico y mecánico producido por la crioplastia en la arteria, optimizando el efecto

apoptótico de la crioplastia sobre las CML, utilizando diferentes temperaturas y diferentes tiempos de angioplastia (Balasubramanian y otros, 2008; Venkatasubramanian y otros, 2010).

Son muy pocos los ensayos realizados en modelos animales para evaluar la efectividad de la crioplastia frente a la ATP. Huijbregts y otros, 2010 caracterizaron histológicamente las lesiones después del tratamiento con crioplastia para reducir la hiperplasia intimal en cerdos a los que se realizó una anastomosis venosa, obteniéndose resultados positivos. Las investigaciones *in vivo* en conejos se limitan al estudio de Cheema y otros, 2003 y al de Spiliopoulos y otros, 2011, que no han podido detectar una mayor actividad apoptótica en los animales tratados con crioplastia frente a los animales tratados con ATP.

4. MODELO ANIMAL DE ARTERIOSCLEROSIS

4.1. EL CONEJO COMO MODELO ANIMAL

La imposibilidad de poder hacer un estudio histológico y bioquímico de las lesiones ateroscleróticas en los humanos secuencialmente en el tiempo, ha determinado que sea imprescindible que se utilicen modelos animales (Vasselinovitch, 1988). De hecho, puede afirmarse que la mayor parte del conocimiento actual sobre la respuesta al daño arterial se fundamenta en los estudios realizados en el animal de experimentación, generalmente con el empleo de un mecanismo de daño endotelial mecánico (Steel y otros, 1985; Rodríguez-Piñero y otros, 1998). Pero sin duda, el mayor problema está en que las arterias manipuladas de los humanos son arterias ateroscleróticas enfermas, mientras que las arterias de los animales de experimentación son arterias sanas. Para poder solventarlo se precisa el empleo de animales, provocándoles arteriosclerosis y manipulando sus arterias mediante técnicas de cirugía vascular idénticas a las empleadas en los humanos (Muller y otros, 1992).

El conejo fue el primer modelo animal de arteriosclerosis utilizado y se continúa empleando para tal fin (Ignatowski, 1908; Anitckkonw, 1914; Badimon, 1990). Ignatowski demostró en 1908 la formación de lesiones en la pared aórtica de conejos alimentados con dietas enriquecidas con proteínas animales (especialmente de carne, leche y yema de huevo). En concreto, el conejo de la cepa Nueva Zelanda, es el más utilizado para los estudios de arteriosclerosis. Más específicamente, existen líneas de conejos de Nueva Zelanda, como la Watanabe (WHHL) y la St. Thomas'Hospital, que presentan alteraciones del metabolismo lipoproteico. La primera de ellas presenta un fenotipo de hipercolesterolemia familiar, ya que presenta un defecto en el gen del receptor LDL-c, y los animales homocigotos alcanzan cifras de colesterolemia de 400 a 800 mg/dl (Watanabe, 1980; Armstrong y Heistad, 1990), mientras que la segunda manifiesta un fenotipo de hiperlipemia combinada familiar (Beaty y otros, 1992).

El conejo es un animal idóneo como modelo de arteriosclerosis experimental (Chen y otros, 1992; Zhu y otros, 1992; Spagnoli y otros, 1991). Ofrece tres grandes ventajas prácticas: su tamaño es muy adecuado, el coste de su alojamiento y alimentación es asumible, y es un animal que ya se ha utilizado ampliamente en otros trabajos experimentales de características similares para el estudio de la arteriosclerosis (Clowes y otros, 1983; Sarembock, 1995).

El conejo como modelo experimental de arteriosclerosis presenta también varias desventajas (Xiangdong y otros, 2011). En primer lugar es raro que los conejos desarrollen lesiones avanzadas como las de humana, con fibrosis, hemorragia, ulceración y/o trombosis (Kolodgie y otros, 1996). Asimismo, en el conejo, las lesiones se distribuyen en el cayado aórtico y aorta torácica, en el origen de las arterias intercostales y en menor medida, en la aorta abdominal. En los seres humanos, las placas son más abundantes en la aorta abdominal, enriquecidas con células de músculo liso y generalmente con una capa fibrosa (Taylor y Fan, 1997). Además, los niveles altos de colesterol en la dieta son altamente hepatotóxicos para los conejos, y a menudo se produce mortalidad antes del final del estudio. También se produce una inflamación masiva en el cuerpo del conejo, lo cual no se corresponde con los cambios fisiopatológicos observados en la arteriosclerosis natural humana. Otra desventaja es que la mayoría del colesterol circulante en conejos es transportado por HDL-c, mientras que en humanos es transportado en LDL-c (Fernández y otros, 1999). Finalmente, los anticuerpos necesarios para estudiar los mecanismos involucrados en la inflamación de los conejos no son generalmente fáciles de conseguir.

Son numerosos los estudios realizados en el conejo como modelo experimental de arteriosclerosis (Yanni y otros, 2003). Al objeto de causar diferentes tipos de lesiones en las arterias, se han utilizado distintos porcentajes de colesterol en la dieta, con adición o no de combinaciones de aceites y proteínas específicas, así como ensayando diferentes duraciones de los experimentos (Xiangdong y otros, 2011).

Los valores plasmáticos normales de colesterol en el conejo de Nueva Zelanda son bajos (50.3 mg/dl de valor medio) (Finking y Hanke, 1997), pero pueden aumentar entre dos y ocho veces 20 días después de la administración de una dieta rica en colesterol (Bocan y otros, 1993).

La mayoría de los estudios publicados analizan los efectos del colesterol en las dietas y, su aporte en éstas varía entre un 0,5 y un 4% de colesterol, con un período de administración de entre 8 y 16 semanas. Con estos protocolos experimentales se observa un elevado valor de colesterol plasmático (> 1.000 mg/dl). La elevada hipercolesterolemia se traduce en presencia de lesiones aórticas en el estadio de estría grasa (Thompson y Zilversmit, 1983; Schwenke y Carew, 1989).

Una dieta con un porcentaje bajo de colesterol, administrada durante un periodo largo de tiempo, causa lesiones ateroscleróticas con penetración de células musculares lisas y deposición de colesterol, similares a las lesiones observadas en el hombre (Kolodgie y otros, 1996). Por el contrario, dietas con un 0.2% de colesterol y 19% de grasa administradas por un periodo

de entre 6 meses a 5 años, inducen lesiones ateroscleróticas avanzadas (Cornhill y Roach, 1974, 1976; Adams y otros, 1982; West y otros, 1982; Rogers y Karnovsky, 1988). Así, con aportes de colesterol superiores al 1% del peso de la ingesta, se inducen fundamentalmente lesiones con abundantes células espumosas (Ross y otros, 1978; Orlandi y otros, 1992; Kritchevsky y otros, 1971). En este fenómeno parece influir la edad del conejo utilizado, obteniéndose mejores resultados en individuos jóvenes (Cortés y otros, 2002). En cambio, con aportes de colesterol comprendidos entre el 0,125 y el 0,5% en períodos de 6 a 8 se observa una progresión de la estría grasa a la lesión ateromatosa, tal como se evidencia por la presencia de mayor número de células musculares lisas, depósitos de colesterol y áreas necróticas en la aorta y los vasos epicárdicos (Daley y otros, 1994; Bocan y otros, 1993), un fenómeno que no ocurre en los vasos intramiocárdicos (Kolodgie y otros, 1996). Estos datos indican que en este modelo animal, la duración del ensayo y el aporte dietético de colesterol pueden modular el desarrollo de las etapas de la arteriosclerosis hacia un patrón más similar al humano en las lesiones aórticas, pero no en los vasos intramiocárdicos.

También la localización de las lesiones parece influida por el aporte de colesterol. Un aporte inferior al 0,15% induce su aparición en la aorta torácica superior, en tanto que aportes superiores a esta cifra producen una presencia generalizada de placas a lo largo de la íntima aórtica (Yang y otros, 1998; Daley y otros, 1994).

Otros estudios sugieren que la formación de lesiones avanzadas depende de la edad del animal. Animales de entre 3 y 4,5 años mostraron placas fibrosas, mientras que animales jóvenes de 4 meses no lo hicieron (Spagnoli y otros, 1991).

En otro estudio se utilizó un pienso estándar de conejo suplementado con un 2 % de colesterol disuelto en 14 cc. de aceite de girasol. Al final del experimento, los animales alimentados con este pienso habían desarrollado arteriosclerosis, que se comprobó al presentar sus lipoproteínas séricas un perfil característico, así como tras el estudio anatomopatológico de la arteria aorta torácica y abdominal (Rodríguez-Piñero y otros, 1998).

Leth- Spensen y otros, 1988, demostraron la influencia positiva del aceite de oliva en la estabilización de la concentración de colesterol plasmático en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol en comparación con el aceite de maíz.

A continuación se resume en la tabla I-1 el efecto sobre las lipoproteínas plasmáticas, colesterol y triglicéridos, que tienen diferentes dietas hipercolesterogénicas.

Tabla I-1: Efecto de diferentes dietas hiperlipídicas sobre el colesterol, triglicéridos y lipoproteínas plasmáticas, revisados en diferentes estudios en el conejo.

AUTORES	DIETA	INGESTA (semanas)	COL	HDL-c	LDL-c	TRIG
Kainuma y otros, 2006	1% colesterol	8-12	↑	↑	↑	NS
Torres y otros, 2007	0.3% col	12	↑	-	↑	↑
Cheong y otros, 2010	0.5% col + 2% aceite maíz	4	↑	NS	↑	↑
Yu y otros, 2012	0.3% col + 0.5% aceite maíz	28	↑	↓	-	NS
Duarte y Scorza, 2004	10% aceite palma	16	↑	↑	-	NS
Duarte y Scorza, 2004	10% aceite maíz	16	↑	NS	-	↑

↑: valores aumentados tras la dieta y diferencias con grupo control; ↓: valores disminuidos tras la dieta y diferencias con grupo control; NS: no diferencias significativas con valores basales; - : no se ha determinado el parámetro; COL: colesterol; TRIG: triglicéridos.

Valiente y otros, 2001 realizaron un estudio para evaluar el desarrollo de arteriosclerosis carotídea en conejos. Para ello, compararon tres grupos de conejos, el control, y dos alimentados con un pienso suplementado con un 0.5 y 1% de colesterol. Sus conclusiones apuntaron que las condiciones de hipercolesterolemia logradas en los conejos con dieta suplementada con un 1% de colesterol durante 12 semanas, constituyen un modelo útil para desarrollar aterosclerosis carotídea, no siendo así con la dieta suplementada con el 0.5 % de colesterol.

González-González y otros, 2005 utilizaron un pienso aterogénico preparado con un 2% de colesterol y 5% de aceite de coco hidrogenado. El estudio concluyó que la administración de dietas ateromatosas potencian el desarrollo de las lesiones provocadas tras la denudación endotelial con catéter de balón tipo Fogarty y frenando la evolución de curación natural de las mismas.

Para inducir lesiones más avanzadas en la aorta torácica y abdominal, tales como una capa fibrosa con gran cantidad de células musculares lisas, es necesario combinar una dieta alta en colesterol con una lesión inducida con un catéter de balón (Abela y otros, 1995; Aikawa y otros, 1998; Worthley y otros, 2000). Además, la adición de fármacos combinados (veneno de víbora e histamina) con el uso del catéter de balón también provoca lesiones similares a las que encontramos en las coronarias humanas (Johnstone y otros, 2001).

4.2. OTRAS ESPECIES DE EXPERIMENTACIÓN

En general, los ratones son resistentes a la aterogénesis inducida por la dieta. Aproximadamente el 70% del colesterol total plasmático se distribuye en las HDL (Fernández y otros, 1999), debido a la ausencia de la proteína transferidora de ésteres de colesterol. Sin embargo, debido a los múltiples modelos modificados genéticamente que se han obtenido, el ratón es actualmente un animal muy utilizado para el estudio de la arteriosclerosis. Las ventajas del ratón incluyen su bajo coste, la reproducibilidad y la disponibilidad de técnicas transgénicas para reproducir procesos patológicos. Sin embargo, el tamaño de los vasos y factores hemodinámicos de los mismos son muy diferentes a los humanos, por lo que es muy difícil trasladar los resultados a los pacientes (Xiangdong y otros, 2011).

Igual que los ratones, las ratas son también resistentes a la arteriosclerosis. Son animales poco sensibles al colesterol de la dieta. Además, las lesiones observadas no son muy parecidas a las de la especie humana. Han sido descritas varias cepas de ratas con hiperlipidemia hereditaria asociadas a aterogénesis (St John y Bell, 1991; Russell y otros, 1993) y pocas ratas transgénicas han demostrado producir arteriosclerosis (Herrera y otros, 1999).

Algunas especies de aves desarrollan arteriosclerosis espontáneamente, que puede ser mejorada con una dieta alta en colesterol. Hasta la fecha, se han utilizado tres especies de aves para la investigación de la arteriosclerosis, la paloma, la codorniz japonesa y el pollo. Las similitudes más llamativas entre las aves y los humanos son las características de las lesiones avanzadas, tales como el grosor de la íntima y la presencia de necrosis e infartos (Shih y otros, 1983). Sin embargo, el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas es muy diferente entre ambos, ya que las aves no tienen apoE ni apoB48, y no forman quilomicrones para absorber la grasa.

La arteriosclerosis espontánea en perros es rara. También se trata de un animal con una baja actividad de proteína transferidora de ésteres de colesterol (aproximadamente un 15% de la presente en humanos), y resistente al desarrollo de aterosclerosis e incluso a la dislipemia moderada cuando se alimenta con dietas suplementadas con colesterol y grasa. Es necesario hacerlos hipotiroideos para elevar su colesterolemia. Aun en estas circunstancias, y en presencia de hipercolesterolemia, no todos los animales desarrollan la enfermedad (McCullagh y otros, 1976).

Debido a las similitudes anatómicas y fisiológicas con el hombre, el cerdo es un animal especialmente recomendado para el desarrollo de nuevos procedimientos terapéuticos y

quirúrgicos en la arteriosclerosis. Se trata de un buen modelo para el estudio de los efectos del colesterol de la dieta y otros lípidos sobre la biología de las arterias coronarias, el estudio de las complicaciones isquémicas coronarias y su diagnóstico, y los mecanismos involucrados en la restenosis tras la angioplastia, junto con los agentes que pueden interferir con la restenosis o prevenirla (Badimon, 2001). En su contra, hay que mencionar que el coste de su mantenimiento y estabulación y el elevado tiempo de ingestión de colesterol para inducir arteriosclerosis, limitan la utilización del cerdo como modelo animal.

La similitud genética y fisiológica entre primates no humanos y la especie humana, hace que los primates no humanos sean unos excelentes modelos para el estudio de la aterosclerosis. En cambio, la variabilidad en el desarrollo de la lesión, el elevado coste de los experimentos y la existencia de problemas éticos limitan su uso en el estudio de la aterosclerosis (Xiangdong y otros, 2011).

4.3. RECUERDO ANATÓMICO DEL CAYADO Y LA BIFURCACIÓN AÓRTICA EN EL CONEJO

Tanto el cayado aórtico como el tronco braquiocefálico del conejo presentan dos ligeras modificaciones específicas de especie (Barone, 1996). La arteria subclavia izquierda está ligeramente más alejada del tronco braquiocefálico y la arteria carótida izquierda emerge directamente del cayado, prácticamente en el mismo punto que el tronco braquiocefálico (Figura I-3).

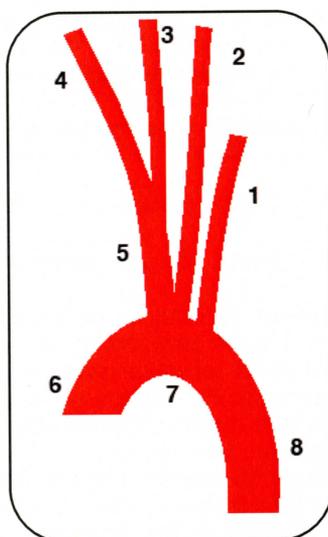


Figura I-3: Representación esquemática del cayado aórtico y el tronco braquiocefálico. 1. Arteria subclavia izquierda. 2. Arteria carótida común izquierda. 3. Arteria carótida común derecha. 4. Arteria subclavia derecha. 5. Tronco braquiocefálico. 6. Arteria aorta ascendente. 7. Cayado aórtico. 8. Arteria aorta descendente.

También existen diferencias interespecíficas en la anatomía de la bifurcación aórtica terminal. En el caso del conejo, la aorta abdominal se bifurca en dos arterias ilíacas comunes, que son las que emiten las arterias ilíacas externa e interna en sentido lateral y medial respectivamente (Figura I-4).

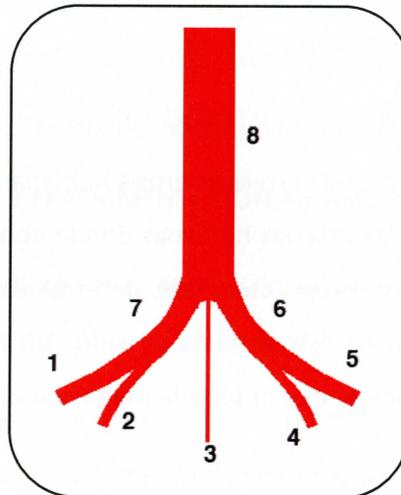


Figura I-4: Representación esquemática de la bifurcación aórtica. 1. Arteria ilíaca externa derecha. 2. Arteria ilíaca interna derecha. 3. Arteria sacra media. 4. Arteria ilíaca interna izquierda. 5. Arteria ilíaca externa izquierda. 6. Arteria ilíaca común izquierda. 7. Arteria ilíaca común derecha. 8. Arteria aorta abdominal.

4.4. TÉCNICA DE CATETERIZACIÓN Y DENUDACIÓN ARTERIAL

Los procedimientos de cateterización intraarterial actuales están basados en la técnica de Sven Ivar Seldinger, que no ha sido prácticamente modificada desde su descripción a principios de los años 50 (Seldinger, 1953). Su principal ventaja es que permite la inserción de un catéter de mayor diámetro que la aguja utilizada para la punción arterial. Las complicaciones, habituales con los procedimientos de abordaje vascular existentes hasta ese momento, se redujeron drásticamente a partir del uso de esta técnica.

La denudación endotelial es una técnica de lesión arterial que consiste en la introducción de un catéter de balón dentro del vaso que, inflado a una determinada presión, produce una abrasión de la íntima sin rotura de la membrana elástica interna, provocando la creación *in situ* de un lecho potencialmente aterogénico en la producción de los modelos animales de arteriosclerosis.

La técnica de denudación endotelial en un modelo experimental de arteriosclerosis en el conejo fue desarrollada por Baumgartner, 1963. En este estudio, se accede a la porción distal de

la bifurcación de la arteria carótida común mediante un abordaje de la arteria carótida externa derecha.

Desde entonces, se han desarrollado diversos modelos de arteriosclerosis en el conejo, con adición o no de dieta hiperlipídica, con el objetivo de desarrollar lesiones avanzadas de mayor similitud a las existentes en humana.

Los métodos experimentales de denudación endotelial producen un engrosamiento intimal morfológicamente similar al de la arteriosclerosis humana (Stemerman y Ross, 1972, Fishman y otros, 1975). Es en estas zonas de las arterias humanas donde normalmente se desarrollan las placas de ateroma (Velican, 1980). Manderson y otros, 1989, determinaron los cambios *in vivo* en la estructura de las células de músculo liso después de sufrir un daño endotelial con catéter balón en la arteria carótida del conejo, que implica la migración de las células musculares lisas desde la media hasta la íntima.

LeVeen y otros, 1982, desarrollaron un modelo de arteriosclerosis por denudación con balón de la arteria femoral junto a la administración de una dieta con un 2% de colesterol y 6% de aceite de cacahuete durante un mes, en conejos de la raza Gigante de Flandes. Aunque el desarrollo de lesiones arterioscleróticas por el efecto de la angioplastia ya había sido descrito previamente, se añadió la dieta hiperlipídica para tener lesiones más graves y que no volvieran a la normalidad con el tiempo. Las lesiones fueron estudiadas mediante angiografías seriadas e histología.

El modelo de la doble lesión de la arteria ilíaca a través de arteriotomía de la carótida izquierda de Strauss y otros, 1994, consiste en realizar cuatro inflados de balón de 1 minuto cada uno, con un catéter de 3 mm de diámetro y 4 mm de longitud, a 6, 8, 4 y 10 atmósferas, con 45 segundos entre cada inflado. El procedimiento se repetía 3 semanas después, sacrificándose los animales a las 4 o 12 semanas.

La técnica de daño endotelial con balón de la arteria ilíaca mediante abordaje por la arteria carótida izquierda fue descrito por Maillard y otros, 2000. También Perlman y otros, 1997, utilizaron la carótida derecha para realizar la denudación endotelial de la arteria ilíaca.

El abordaje de la arteria ilíaca a partir de la arteria femoral también fue utilizado por otros autores (Meurice y otros, 1996, Wang y otros, 1996).

Karnabatidis y otros, 2006 describieron un método de acceso percutáneo endovascular transauricular mediante radiología intervencionista en el conejo y el cerdo, haciendo la cirugía

y la anestesia general innecesaria para la creación de modelos animales y acelerando así los protocolos experimentales. Realizaron la cateterización percutánea de la arteria y la vena auricular mediante una guía hidrofílica de 0.018 pulgadas, para acceder hasta arteria aorta y vena cava, siendo el procedimiento exitoso en un 90 y 100% respectivamente en el conejo, y en el 100% de los casos en el cerdo. Se consiguió el acceso intrapulmonar, intracoronario e intracerebral de manera segura y factible. Únicamente se registraron como incidencias los hematomas perivasculares de poca importancia en los casos de acceso arterial.

4.4.1. CRIOPLASTIA Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Sólo existen dos publicaciones sobre crioplastia realizada en conejos como modelo experimental de arteriosclerosis.

Cheema y otros, 2003 estudiaron los efectos de la aplicación de la crioplastia a corto y largo plazo sobre un modelo de daño endotelial por angioplastia en la arteria íliaca del conejo, mediante estudios seriados de ecografía intravascular y posterior inmunohistoquímica. Se observó un aumento del área de la luz en el grupo crioplastia frente al grupo control con balón convencional de angioplastia inmediatamente después del tratamiento endovascular. Sin embargo, este efecto de aumento en el área luminal no fue significativamente distinto a las 72 horas o a las 10 semanas después del tratamiento. Este estudio experimental no mostró ningún beneficio a largo plazo de la crioplastia en comparación a la angioplastia convencional con balón.

Spiliopoulos y otros, 2011, comparó la respuesta histológica de la crioplastia frente a la angioplastia convencional en la arteria íliaca sana del conejo. Este estudio evidenció una mayor inducción de apoptosis de las células musculares lisas de la capa media, tras 30 minutos y 72 horas de la aplicación de crioplastia. Además, la crioplastia resultó mínimamente traumática e inflamatoria. Estos resultados difieren de otros autores (Cheema y otros, 2003), que no evidenciaron apoptosis después de 72 horas de la crioplastia. Estas diferencias en los resultados de la técnica podrían deberse al modelo animal utilizado, ya que Cheema y otros, 2003 utilizaron un modelo de lesión arterial por angioplastia, para simular la enfermedad arterial periférica, mientras que Spiliopoulos y otros, 2011 utilizaron arterias sanas, lo cual constituye una limitación del estudio. Posiblemente, la clave para explicar la discrepancia entre estudios *in vitro* y los ensayos clínicos recientes es el hecho de que la crioplastia puede inducir la apoptosis en un ambiente experimental ideal pero no en uno inflamatorio de lesiones arteriales ateroscleróticas.

OBJETIVOS

El conejo se ha demostrado como un excelente modelo experimental para la inducción de lesión ateromatosa arterial, como así ha sido reconocido en diferentes publicaciones. Además, el tamaño de sus arterias ilíacas externas en esta especie es muy similar al de las arterias femoropoplíteas en el hombre.

Se han utilizado variados modelos de arteriosclerosis con distintos porcentajes de colesterol, con adición o no de grasas saturadas o insaturadas, y tiempos variables de administración de dieta, existiendo disparidad de resultados en los valores de lípidos plasmáticos obtenidos. De la misma manera, también se han publicado diferentes técnicas para la inducción de lesión en el conejo, sin que exista homogeneidad en los resultados obtenidos.

La crioplastia es una nueva técnica de angioplastia que se ha desarrollado para mejorar los resultados de la reestenosis provocada por la angioplastia convencional (ATP). Hasta el momento, mediante ensayos clínicos, la crioplastia ha demostrado ser una técnica segura en el tratamiento de la enfermedad arterial de la región femoropoplítea, pero no demuestra tener ninguna superioridad frente a la ATP. Los dos estudios realizados en conejos hasta la fecha no encuentran ventajas de una técnica sobre la otra, no siendo comparables entre sí ni extrapolables a medicina humana por presentar varias limitaciones en cuanto al protocolo experimental.

Para la realización de esta Tesis se han llevado a cabo tres estudios. El primero de ellos consiste en el diseño de un modelo experimental de arteriosclerosis en el conejo mediante la administración de una dieta hipercolesterogénica, en el que describimos distintas técnicas diagnósticas no invasivas que se han utilizado para su evaluación. En el segundo estudio se describe la puesta a punto de una técnica de lesión en la arteria ilíaca externa mediante abordaje transcarotídeo en el conejo. Finalmente, el tercer estudio compara la efectividad de dos tipos distintos de angioplastia con balón en el tratamiento de la estenosis arterial por lesión ateromatosa inducida.

Los objetivos de esta Tesis son los siguientes:

1. Evaluar el efecto de una dieta hiperlipídica (1% de colesterol y 6% de aceite de palma) administrada durante 60 días, sobre parámetros sanguíneos hematológicos y bioquímicos en el conejo.
2. Describir el fenotipo dislipémico desarrollado con este modelo en el conejo, y compararlo con el de humana.
3. Puesta a punto y optimización de una técnica de abordaje transcarotídeo para la inducción de lesión en la arteria ilíaca externa en el conejo, mediante la comparación de dos tipos de catéter de balón.
4. Comprobar la eficacia de dos técnicas de diagnóstico por imagen no invasivas, ecografía vascular y tomografía, en la detección de estenosis luminal inducida en el conejo.
5. Evaluar la eficacia de la arteriografía en el conejo para la detección de estenosis arterial a corto y largo plazo en los modelos de arteriosclerosis propuestos.
6. Describir histológicamente las lesiones desarrolladas en la aorta y otras arterias de menor calibre en el conejo, con los dos modelos experimentales de arteriosclerosis propuestos.
7. Comparación de la eficacia de la crioplastia y la angioplastia convencional en el tratamiento de la estenosis arterial en un modelo de arteriosclerosis inducida mediante el estudio histológico de la placa de ateroma.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Para la realización de este trabajo, se utilizaron conejos procedentes del cruzamiento industrial de 3 vías, de hembras obtenidas por cruce de 2 líneas seleccionadas por tamaño de camada al destete (A y V) con machos de una línea seleccionada por velocidad de crecimiento (R), todas ellas desarrolladas en la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

1.1. ESTABULACIÓN

Para el primer estudio se emplearon 15 conejos machos de 2 meses de edad que se alojaron en la Granja Cunicola Experimental del Departamento de Ciencia Animal de la UPV, en jaulas individuales (29 x 49 x 31 cm), dotadas de comedero tipo tolva y bebedero tipo cazoleta, en una granja experimental equipada con ventilación forzada y paneles de refrigeración evaporativa, con temperatura dentro del rango 18-26 °C y un fotoperiodo con 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Para el segundo estudio se emplearon 36 conejos, 18 machos y 18 hembras, de 3 meses de edad, que fueron trasladados a las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario CEU, en Alfara del Patriarca, donde se realizaron las intervenciones.

Finalmente, en el tercer estudio se emplearon 78 conejos machos, de 3 meses de edad para el tercer estudio. Estos animales se alojaron en el Núcleo Zoológico de Docencia e Investigación de la Universidad CEU-Cardenal Herrera, en jaulas individuales (29 x 49 x 31 cm), dotadas de comedero tipo tolva y bebedero tipo cazoleta.

1.2. DIETA

Se suministraron dos tipos de dieta, una dieta hiperlipídica y otra control. Del pienso hiperlipídico hay que destacar la adición del 1% de cristales de colesterol puro y el 6% de aceite de palma. El pienso control sustituye el colesterol y el aceite de palma por almidón purificado al 7%. La fábrica de piensos del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia se encargó de suministrar los dos tipos de dieta durante todo el estudio (Tabla III-1).

Tabla III-1: Composición de las dietas administradas en el estudio.

INGREDIENTES	Unidad	Pienso Colesterol	Pienso Control
CEBADA GRANO	%	22,000	22,000
CASCARILLA DE AVENA	%	15,000	15,000
TORTA DE GIRASOL 30	%	4,500	4,000
TORTA DE SOJA 44	%	9,000	9,500
HENO DE ALFALFA	%	25,000	25,000
PULPA DE REMOLACHA	%	14,400	14,400
L-LISINA HCL	%	0,200	0,200
DL-METIONINA	%	0,230	0,230
L-TREONINA	%	0,170	0,170
MANTECA DE CERDO	%	0,500	0,500
COLESTEROL	%	1,000	0.00
ACEITE DE PALMA	%	6,000	0.00
ALMIDÓN PURIFICADO	%	0,000	7,000
CARBONATO CÁLCICO	%	0,000	0,000
FOSFATO BICÁLCICO	%	0,600	0,600
BICARBONATO SÓDICO	%	0,600	0,600
SAL	%	0,300	0,300
CORRECTOR	%	0,500	0,500

1.3. SACRIFICIO

El sacrificio de los animales se realizó con la inoculación intravenosa de una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetoquinol SA, Lure; France).

La estabulación, el manejo, cuidado y sacrificio de los animales se realizaron de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que se contempla en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre, y la Transposición de la Directiva Comunitaria Directiva 2010-63-UE del 22 de Septiembre. Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para la realización de esta Tesis se han realizado tres estudios.

El primero de ellos consiste en el diseño de un modelo experimental de arteriosclerosis en el conejo mediante la administración de una dieta hipercolesterogénica, en el que describimos dos técnicas diagnósticas no invasivas que se han utilizado para su evaluación.

En el segundo estudio se describe la puesta a punto de una técnica de lesión en la arteria ilíaca izquierda mediante abordaje transcarotídeo en el conejo.

Y finalmente, el tercer estudio describe la efectividad de dos tipos diferentes de angioplastia con balón en el tratamiento de la estenosis arterial por lesión ateromatosa inducida.

Las figuras III-1, III-2 y III-3 muestran de manera esquemática los protocolos que se han llevado a cabo en cada uno de ellos.

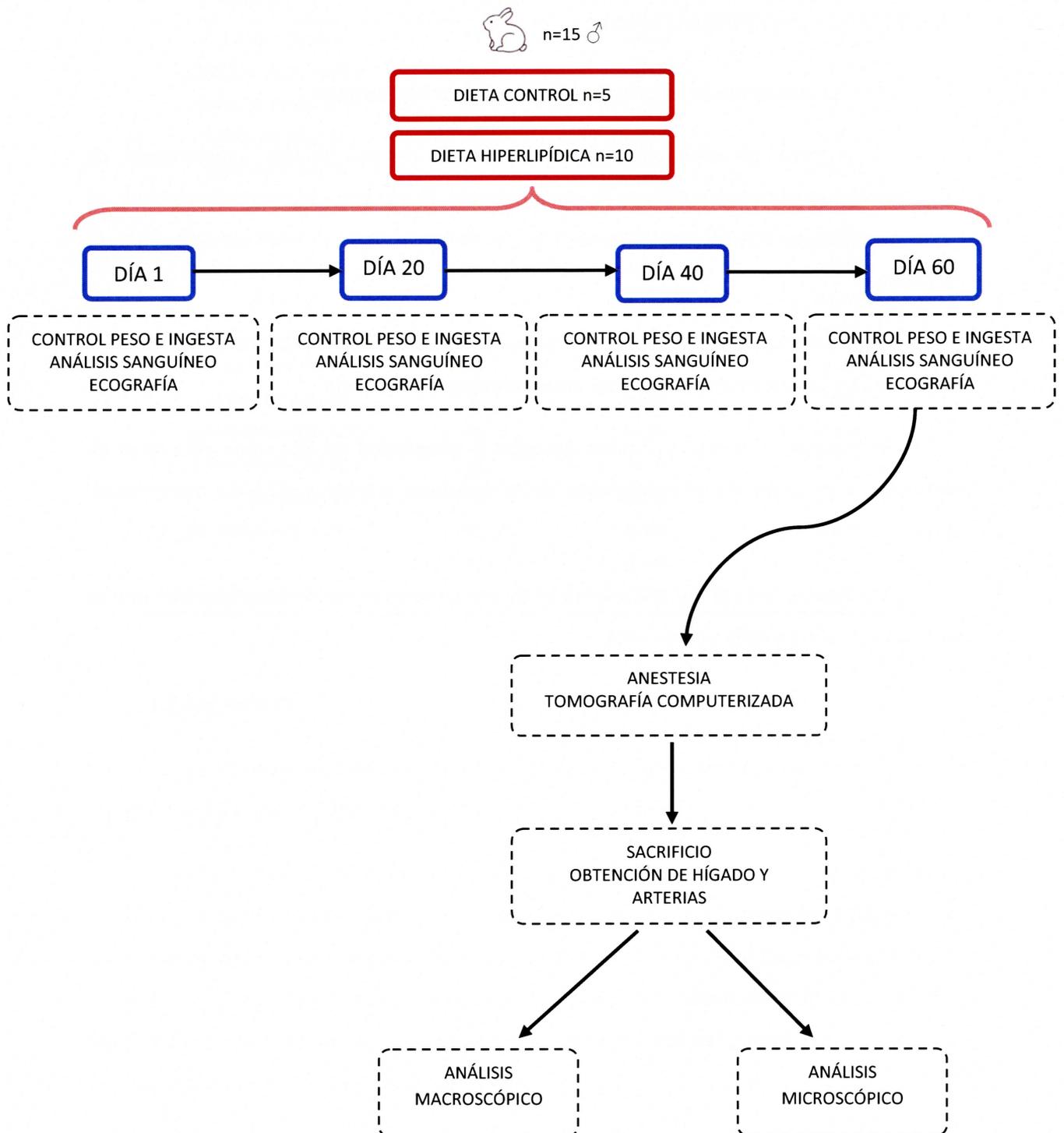


Figura III-1: Protocolo experimental del estudio del efecto de una dieta aterogénica en el conejo, indicando el cronograma y las técnicas realizadas.

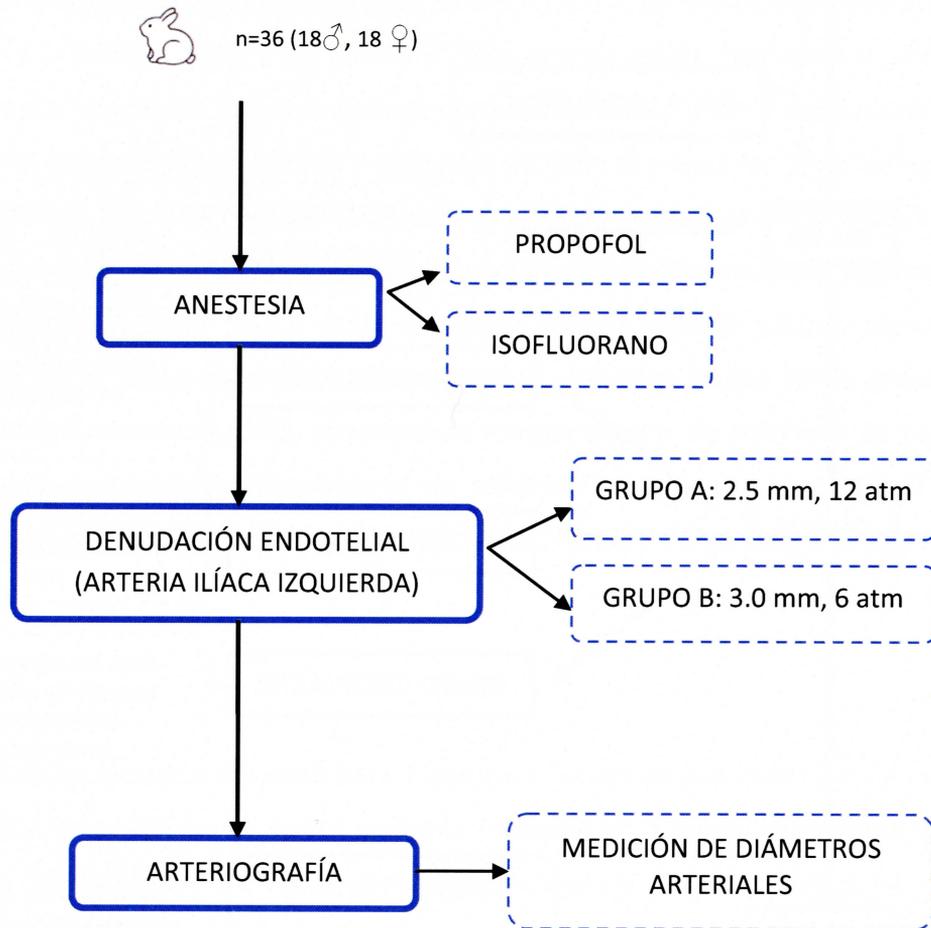


Figura III-2: Protocolo experimental de la técnica de denudación endotelial en la arteria ilíaca externa del conejo mediante abordaje transcatotídeo, indicando las técnicas realizadas.

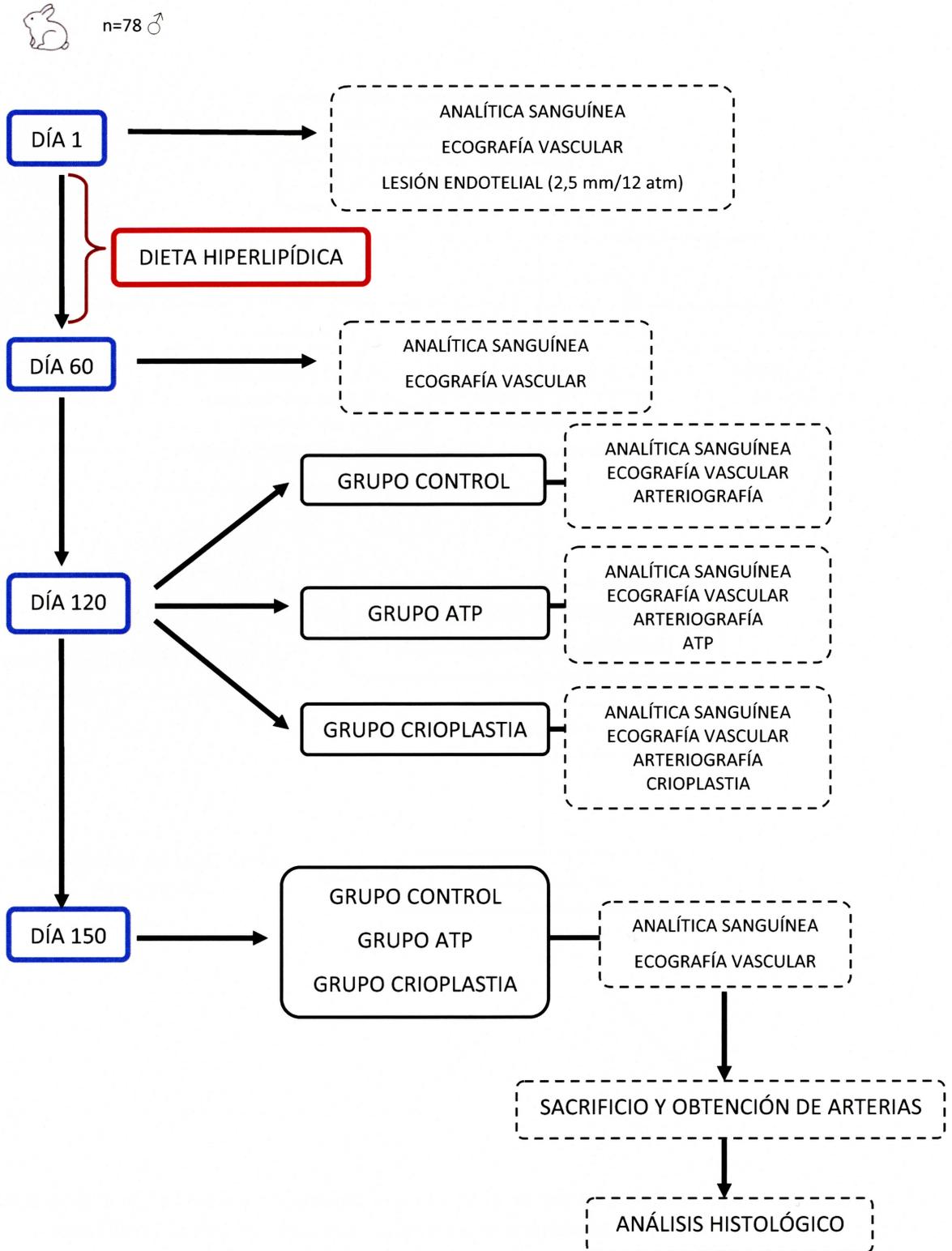


Figura III-3: Protocolo experimental del estudio comparativo de la eficacia de la crioplastia y la angioplastia convencional en el tratamiento de la estenosis arterial inducida en el conejo, indicando el cronograma y las técnicas realizadas.

3. ANÁLISIS SANGUÍNEOS

La extracción de sangre se realizó en la arteria central de la oreja. Las muestras de sangre se analizaron en el laboratorio del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Para el análisis hematológico se utilizaron tubos con EDTA. Se realizó un recuento de eritrocitos (GR) y leucocitos (GB), y se calculó el hematocrito (HTO), hemoglobina (HB), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración corpuscular media de hemoglobina (CHCM) y plaquetas (PLT) con el analizador Nihon Kohden Cell Tack Mek-6450K®, RAL. Para el análisis bioquímico se utilizaron tubos sin anticoagulante, para obtener suero y se calcularon las concentraciones séricas de albúmina (ALB), fosfatasa alcalina (ALP), bilirrubina total (BILT), urea, creatinina (CREA), glucosa (GLUC), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), proteínas totales (PPT), lactato deshidrogenasa (LDH), colesterol (COL), lipoproteínas transportadoras de colesterol de baja densidad (LDL-c), lipoproteínas transportadoras de colesterol de alta densidad (HDL-c) y triglicéridos (TRIG), con el analizador METROLAB 2300 Plus®, Random Acces Clinical Analyzer, RAL.

4. ANESTESIA

Las dosis de los fármacos utilizados para la anestesia fueron los publicados por Flecknell en 1987. La sedación preanestésica se realizó mediante inyección en la musculatura dorsal del lomo, con aguja (Sterican® 23 G, Braun) y jeringuillas de insulina (Omnifix®-F de 1 ml, de Braun). Se utilizó xilazina (Xylagesic® 2%, Calier) a dosis de 3 mg/kg y ketamina (Imalgene 1000®, Merial) a dosis de 20 mg/kg. Como analgésico utilizamos la morfina (Morfina 2%®, Braun) a dosis de 0,2 mg/kg.

Una vez el animal estuvo sedado, se rasuró la parte exterior de su oreja y se colocó un catéter intravenoso (BD Insyte-W® 24 GA, Becton and Dickinson) en la vena marginal de la oreja, situándolo en su borde caudal.

La inducción se realizó con propofol (Propofol Lipuro®, Braun) a una dosis de 3mg/kg. El mantenimiento anestésico de los animales se realizó bien bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (IsobaVet®, Schering Plough), bien con propofol en infusión continua (Percusor® fm, Braun), a una dosis de 4 ml/kg/h. La máquina anestésica utilizada fue la Datex Ohmeda®, GE Healthcare.

5. DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

5.1. ECOGRAFÍA VASCULAR

Para la realización del examen ecográfico se utilizó un ecógrafo portátil de alta resolución modelo Logiq E®, General Electric Healthcare, empleando un transductor electrónico lineal 12L-RS de alta frecuencia (5-13MHz), para el primer estudio, y una unidad de alta resolución modelo ACUSON 128 XP/10, con un transductor electrónico lineal de 7.5 MHz, para el tercero.

Se prepararon los animales, rasurando el área paravertebral caudal izquierda del abdomen, desde la última costilla hasta la altura del borde craneal del ilion y humedeciendo la zona con alcohol con el objeto de eliminar la grasa superficial y favorecer la absorción del gel de ecografía (Aquasonic® 100, Parker Laboratories), asegurando un buen contacto entre el transductor y la piel.

5.2. TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA

Con el animal anestesiado y posicionado en decúbito dorsal, se procedió a la realización del estudio tomográfico arterial con la unidad Brivo multicorte CT325 de General Electric de dos cortes.

Se realizó el escaneado entre la 4ª vértebra cervical y el trocánter mayor del fémur ofreciendo secuencias con suavizado y realce de bordes, en cortes de 2 milímetros, pitch de 1.5, y tiempo de escaneado de 138 segundos.

Se realizaron 2 tomografías por conejo, una en vacío (sin contraste) y otra post contraste, inmediatamente tras la administración de una dosis experimental no diagnóstica de 1.348 mg I₂/ Kg., inyectando 15 ml de Iodixanol (Visipaque®, GE Healthcare) a una concentración de 320 mgI₂/ml. Se rasuró la zona ventral del cuello del conejo, lugar donde se realizó el abordaje quirúrgico a la vena yugular derecha, en la que se colocó otro catéter (BD Insyte-W®20 GA, Becton and Dickinson) para la introducción del contraste intravenoso. La inyección del contraste se realizó manualmente en un solo bolo de contraste en la vena yugular externa derecha.

La información obtenida en cada individuo a partir de los estudios tomográficos fue procesada mediante la estación de trabajo modelo General Electric AW 4.6 Volume Share 5.

Año 2011. El software utilizado en el análisis de los vasos fue Volume Viewer Vessel®, IQ Xpress.

5.3. ARTERIOGRAFÍA

Para la realización de los estudios radiográficos y fluoroscópicos se empleó un generador de Rayos X (Electromedical S.L.) aplicado sobre un tubo de rayos X Comet y cámara de intensificación de imagen Thomson en columna autosustentada y mesa de Bennett® X-Ray Technologies. Se realizaron las arteriografías utilizando iohexol (Omnigraf 350®, Schering-Plough) como contraste vascular. El revelado se llevó a cabo en un equipo de radiología digital Regius Model 110 de Konica Minolta Medical & Graphic (Inc. nº 1. Sakura-machi, Hino-shi, Tokyo, 191-8511 Japan), obteniéndose imágenes en formato DICOM, que se almacenaron en el analizador de imágenes eFilm Workstation 2.1 (Merge® Healthcare). Finalmente se midieron los diámetros arteriales en cada procedimiento.

6. TÉCNICAS ENDOVASCULARES

6.1. DENUDACIÓN ENDOTELIAL Y ANGIOPLASTIA

El abordaje quirúrgico a la arteria carótida se realizó mediante una incisión en la piel del cuello utilizando hojas de bisturí nº 10 (Aesculap®, Braun), tijeras de Metzenbaum (Aesculap®, Braun) y agujas de punción intravenosa (Safelet® Cath 18G, Nipro). La zona a incidir se limpió y desinfectó con solución de clorhexidina al 5% (Desinclor®, Tecnodial, SA), y se aisló mediante la colocación de un paño estéril.

La cateterización arterial se realizó mediante la técnica de Seldinger (Seldinger, 1953), utilizando una aguja de punción intravenosa con fiador metálico (Safelet® Cath 18G, Nipro®).

Para la cateterización de la arteria se utilizaron introductores (Radiofocus introducer II® 4 Fr, Terumo) y guías hidrofílicas (0,035'', J-180cm, de Terumo). El contraste yodado fue Omnigraf 350®, Schering-Plough. Se utilizan 25 UI en cada conejo de heparina sódica (heparina Rovi®) para prevenir fenómenos trombóticos.

Tanto la denudación endotelial como el tratamiento reparador con angioplastia se realizaron con un catéter de dilatación de balón (Symmetry® balloon dilatation catheter, Boston Scientific) (Figura III-4) el cual se accionó mediante un manómetro de precisión (Encore®, Boston Scientific®) (Figura III-5). Se utilizaron dos tipos de catéter de balón, de 2.5 y 3

milímetros de diámetro y 20 milímetros de longitud, y se inflaron a presiones de 12 y 6 atmósferas respectivamente.



Figura III-4: Extremo del catéter de balón (Symmetry®, Boston Scientific).



Figura III-5: Manómetro de precisión (Encore®, Boston Scientific).

Una vez realizada la denudación/angioplastia, se procedió a la sutura de la arteria carótida y planos musculares y cutáneos con multifilamento absorbible (Safil® 5/0 y 3/0, Braun).

El tratamiento postoperatorio de los animales consistió en la administración durante 5 días de antibiótico, antiinflamatorio y analgésico: enrofloxacino (Baytril®, Bayer), 10 mg/kg/12 horas SC, meloxicam (Metacam®, Schering-Plough), 0.04mg/kg/24 horas SC y buprenorfina (Buprex®, Schering-Plough), 0,05 mg/kg/8 horas SC (Hillyer y Quesenberry, 1997).

6.2. CRIOPLASTIA

Se utilizó el catéter de crioplastia PolarCath® Peripheral Dilatation System (CryoVascular Systems, Inc., Los Gatos, CA), de 40 milímetros de longitud y 2.5 milímetros de diámetro de expansión, y se infló a 8 atmósferas de presión (Figuras III-6).



Figura III-6: Extremo del catéter de crioplastia PolarCath System® (CryoVascular Systems, Inc., Los Gatos, CA).

El catéter de crioplastia PolarCath System®, está compuesto por cuatro elementos: una bombilla de óxido nitroso líquido; un módulo de control y microprocesador, que revisa la integridad y el sello del balón, y controla la administración de óxido nitroso, así como la temperatura y presión del insuflado; una batería externa y un catéter de tres vías en su porción distal (Figura III-7).

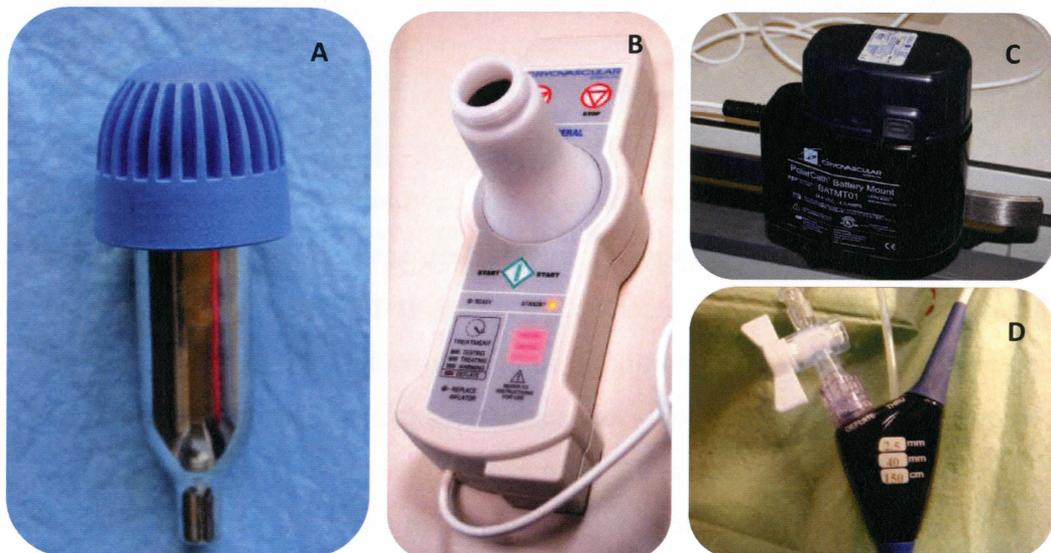


Figura III-7: Bombilla de óxido nitroso (A), módulo de control y microprocesador (B), batería externa (C), catéter de tres vías (D).

El catéter de balón tiene un diseño de triple lumen (PEBAX[®], Material) con tres capas. La capa interna del balón mantiene la presión del gas, la capa media permite la visibilidad del balón gracias a la presencia de marcas radiopacas y la capa externa permite una expansión pasiva y controlada al estar fabricada de amidas de polietano. A pesar de que las bombillas de óxido nítrico son líquidas, el balón recibe el componente en forma de gas, gracias al microprocesador. Los balones adquieren temperaturas de -10 grados centígrados, manteniendo dicha temperatura durante ciclos de 20 segundos. El balón debe calentarse de nuevo antes de poder ser retirado y no lastimar el endotelio vascular.

7. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS ARTERIALES E HÍGADO. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

7.1. DISECCIÓN Y TINCIÓN OIL RED-O

Se realizó la necropsia del animal y la extracción del hígado para pesarlo y procesarlo histológicamente, realizándose una tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) (Diapath[®]). Las arterias se procesaron con una modificación del método descrito por Holman (Holman y otros, 1958), utilizando Oil Red-O (Sigma Aldric[®]) como tinción específica de lípidos.

En primer lugar, se procedió a la extracción de la totalidad de la arteria aorta, desde el inicio del cayado aórtico hasta la bifurcación de las arterias ilíacas, incluyendo además la arteria carótida e ilíaca izquierdas (Figura III-8). A fin de facilitar el manejo de las arterias, se dividió la aorta en dos secciones; una primera sección torácica, desde el cayado aórtico hasta la arteria celíaca, incluyendo la carótida, y otra sección abdominal, desde la celíaca hasta la bifurcación, incluyendo la ilíaca externa izquierda. Después se realizó una sección longitudinal de las arterias y se fijaron en formaldehído al 4 % durante 16 horas. Tras la fijación se realizó la tinción arterial con Oil Red-O. Esta tinción se utiliza para teñir las lesiones adiposas en color rojo intenso. Se preparó previamente una solución madre de Oil Red-O al 0.5% en metanol al 80%. Se diluyó la solución madre al 0.2% con agua destilada y se filtró. A continuación se lavó la muestra con suero salino fisiológico para eliminar los restos de formaldehído. Se realizó la tinción con el Oil Red-O al 0.2% durante 2 horas en agitación suave. Finalmente se lavó dos veces con metanol al 90% durante 5 minutos. Una vez finalizada la tinción, se procedió al montaje de las arterias sobre un cartón sujetando cada muestra con agujas en sus bordes externos, quedando de esta manera expuesta la íntima arterial (Figura III-9) para su posterior

análisis cuantitativo con el programa de procesamiento de imagen digital Image J (National Institutes of Health, NIH).



Figura III-8: Diseción de la arteria aorta, carótidas e ilíacas externas.

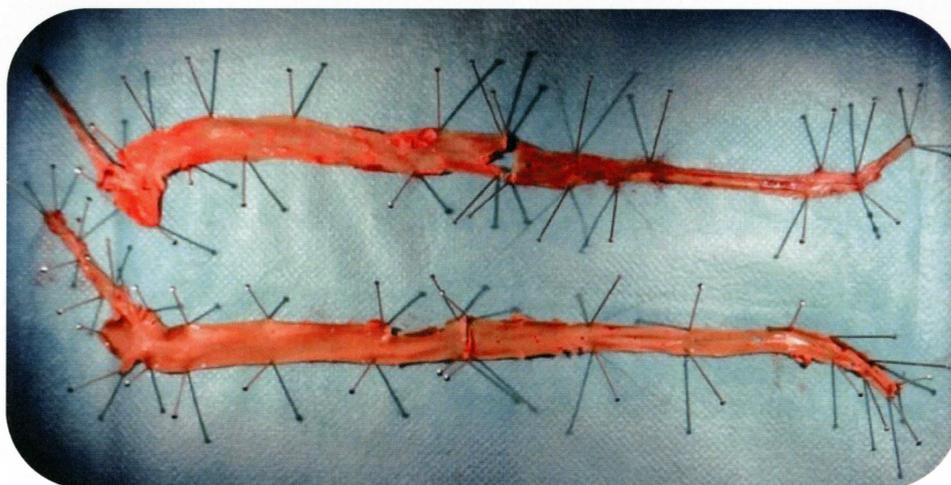


Figura III-9: Montaje de dos muestras arteriales, tras tinción con Oil Red-O, cortadas longitudinalmente y quedando de esta forma expuesta la íntima arterial para la evaluación macroscópica de las lesiones ateromatosas.

7.2. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL ATEROMA

En primer lugar se hizo una valoración macroscópica de las lesiones encontradas en las arterias. Ésta consistió en la medición del área afectada por depósito de placa ateromatosa en la íntima arterial, mediante el programa de procesamiento de imagen digital Image J (NIH).

Para el análisis de las lesiones arteriales con se procedió a la división de cada arteria en 6 zonas distintas de exploración de imagen (Figura III-10).

En cada una de estas 6 zonas, se procedió a la medición de su área total, así como el área de lesión adiposa, calculando así el porcentaje de superficie afectada mediante la ratio $\text{área teñida}/\text{área total} \times 100$.

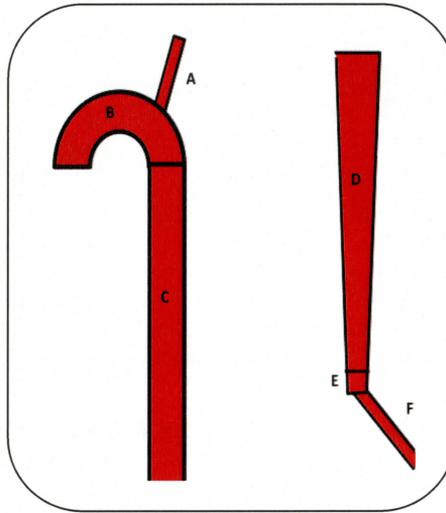


Figura III-10: Representación gráfica de la arteria aorta y su división para su posterior estudio. A: Arteria carótida izquierda, considerando 1 cm de longitud desde la bifurcación carotídea. B: Cayado aórtico, entre la primera porción visible de la aorta ascendente hasta el inicio de la aorta descendente. C: Arteria aorta torácica, entre el inicio de la aorta descendente y la salida de la arteria celíaca. D: Arteria aorta abdominal, entre la salida de la arteria celíaca y 5mm antes de la bifurcación aórtica. E: Un segmento de 5 mm inmediatamente craneal a la bifurcación aórtica. F: Arteria ilíaca externa izquierda, considerando 1 cm de longitud desde la bifurcación aórtica.

7.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL ATEROMA

En primer lugar se llevó a cabo el tallado de las muestras, realizándose dos cortes transversales de cada una de las seis zonas de la arteria en el primer estudio (Figura III-11) y tres cortes transversales en cada arteria ilíaca en el tercer estudio (Figura III-12).

Una vez talladas las muestras, se deshidrataron en el inclusor automático (HMP 110, MYR) mediante sucesivos pases por alcoholes en gradación creciente (80°, 96° y 100°) y xilol puro (Panreac®). Se incluyeron en parafina de punto de fusión 58° C (Panreac®). El montaje definitivo de los bloques se realizó en una unidad formadora de bloques (MYR 2500-III, Especialidades Médicas). De cada uno de los bloques se obtuvieron secciones de 3 μm de espesor mediante microtomo de rotación (Microm HM 310, Laborgeräte S.L.), utilizando cuchillas desechables (Accu-Edge, LPB). Las secciones fueron recogidas en portaobjetos de cristal (Marienfelb, Alemania) y secadas durante al menos 4 horas en una estufa a 37°C. Posteriormente se realizó la técnica convencional de tinción de Hematoxilina-Eosina

(Diapath®) y Tricrómico de Masson (Diapath®). Finalmente, la observación de las muestras se realizó en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) y las fotografías se tomaron con cámara digital (Nikon DXM 1200).

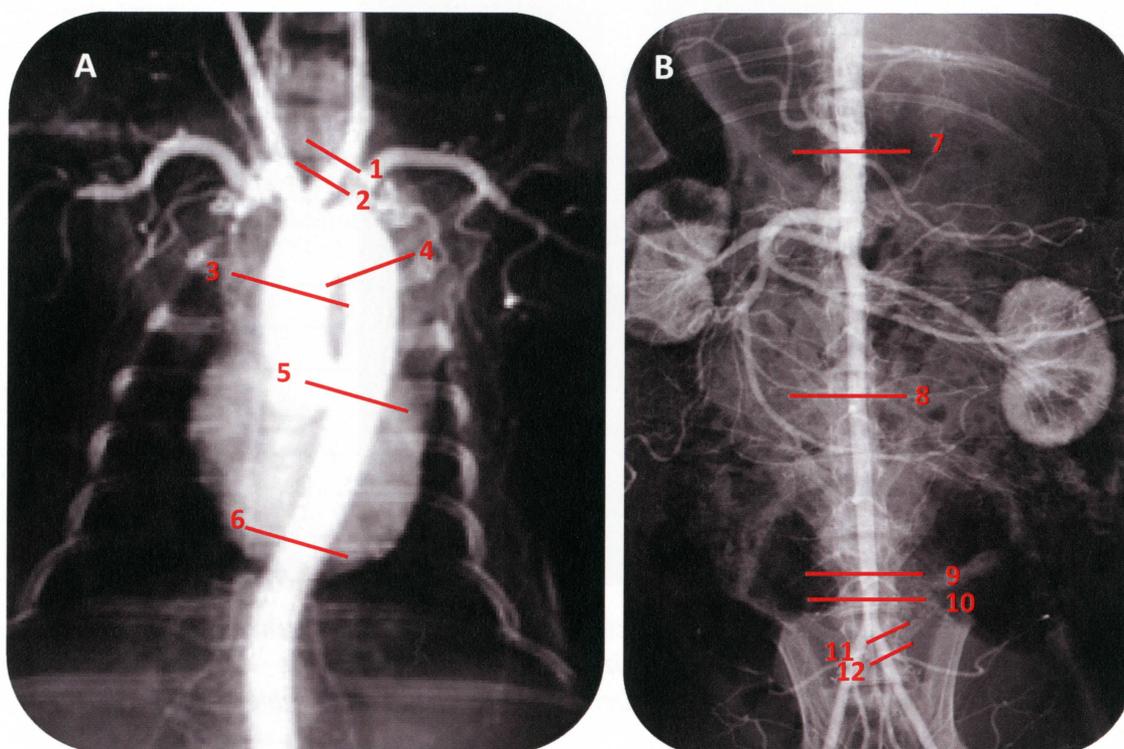


Figura III-11: Arteriografía del cayado aórtico y aorta descendente torácica (A) y aorta abdominal y bifurcación ilíaca (B) y representación esquemática de la misma zona. Los números indican las secciones que se tomaron para su procesamiento histológico. 1: Porción craneal de carótida; 2: Porción caudal de carótida; 3: Porción craneal de cayado; 4: porción caudal de cayado; 5: Porción craneal de aorta torácica; 6: Porción caudal de aorta torácica; 7: Porción craneal de aorta abdominal; 8: Porción caudal de aorta abdominal; 9: Porción craneal de bifurcación; 10: Porción caudal de bifurcación; 11: Porción craneal de ilíaca; 12: Porción caudal de ilíaca).

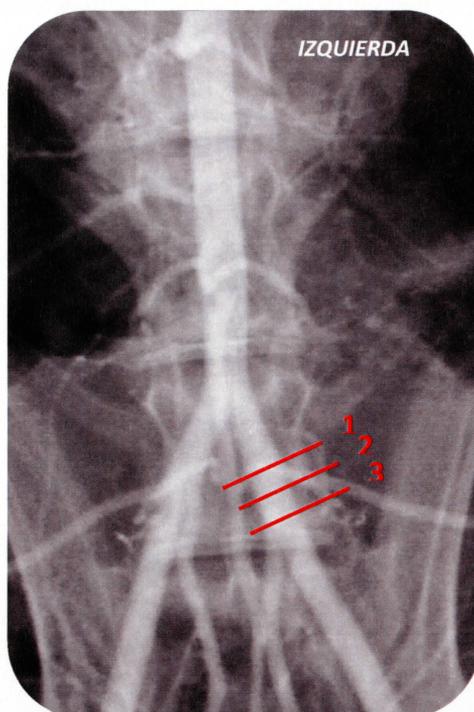


Figura III-11: Arteriografía de la bifurcación aórtica en la que se muestran las secciones transversales tomadas de la arteria ilíaca izquierda para su procesado histológico, a 0.5, 1 y 1.5 cm de la bifurcación respectivamente. Del mismo modo se talló también la ilíaca derecha.

7.3.1. ANÁLISIS CUALITATIVO

Se clasificaron las lesiones según una modificación de la clasificación de Stary explicada en el apartado 2 de la Introducción (Stary y otros, 1994 y 1995), según los criterios morfológicos que se describen en la tabla III-2. Así, se clasificó cada muestra desde lesión tipo I hasta lesión tipo VIII. Una vez clasificadas las lesiones del grado I al VIII, se agruparon a su vez en *lesiones tempranas* (lesiones I, II y III), *lesiones avanzadas* (lesiones IV y V) y *lesiones complicadas* (lesiones VI, VII y VIII).

Tabla III-2: Criterios morfológicos de clasificación de la lesión en cada una de las muestras de cada animal.

CONEJO Nº _____	SECCIÓN ARTERIAL(1-12)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Células espumosas												
	Inflamación: linfocitos												
	Inflamación: macrófagos												
	Lípidos extracelulares												
	Lípidos intracelulares												
	Desdoblamiento membrana elástica interna (MEI)												
	Cambio estructural marcado de la íntima												
	Fibrosis												
	Capa fibrosa												
	Capa fibroateroma												
	Fisuras o hemorragias												
	Trombosis												
	Calcio												
	Cristales de colesterol												
	LESIÓN												

7.3.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO

El estudio cuantitativo se realizó a partir de los cortes histológicos, mediante el programa analizador de imágenes Nis-Elements de Nikon, con el que se midieron el perímetro (mm) de la membrana elástica interna (MEI), el perímetro (mm) de la MEI afectado, el área de la lesión (mm²), el área de la luz arterial (mm²), el grosor de la capa muscular (mm) y la altura de la lesión (mm) (Figura III-12).

A partir de estas medidas se calculó el porcentaje de perímetro afectado de MEI, el porcentaje estenosis luminal y el ratio íntima/media.

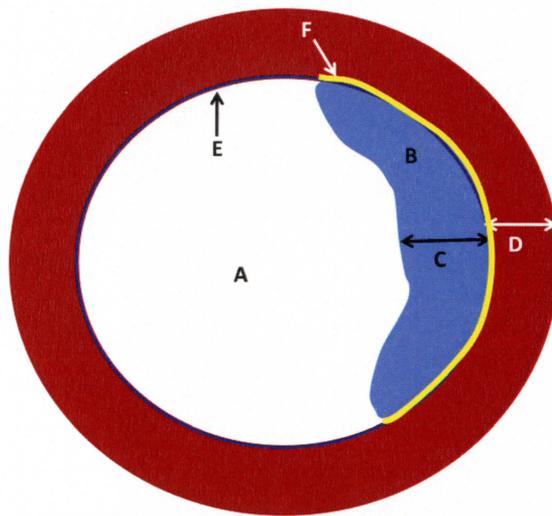


Figura III-12: Representación esquemática de un corte transversal de arteria, en el que se señalan el área luminal (A), el área de la lesión (B), la altura de la lesión (C), el grosor de la capa muscular (D), la membrana elástica interna (E) y el perímetro de membrana elástica interna afectado (F).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa PASW Statistics 18® para Windows.

Para las variables cuantitativas se empleó el método paramétrico *t*-Student. En el caso de la comparación de variables cuantitativas se realizó un ANOVA, y un test post-hoc de Tukey o Games-Howell. En el caso de las variables cualitativas, se hizo un test no paramétrico de Mann-Whitney.

Los resultados fueron representados como media \pm desviación típica.

RESULTADOS

1. EFECTO DE UNA DIETA ATEROGÉNICA EN EL CONEJO Y TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE ARTERIOSCLEROSIS EXPERIMENTAL

Tal y como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, se realizaron controles para verificar el bienestar animal y evaluar el efecto de la dieta hiperlipídica a lo largo del estudio. Estos controles consistieron en el pesaje de los animales, cálculo de la ingesta diaria de pienso, análisis sanguíneos, ecografía vascular y TC a fin de examinar las arterias aorta e íliaca externa izquierda.

1.1. PESO E INGESTA DE PIENSO

En la tabla IV-1 se muestra el peso de los animales a los días 1, 20, 40 y 60 del estudio, tanto del grupo Colesterol como del Control. Se puede observar que los animales del grupo Control alcanzan un peso final de 4 kilogramos, mientras que el grupo Colesterol alcanza un peso final menor, de 3.53 kilogramos de promedio, siendo ésta una diferencia significativa para un valor de $p=0.04$.

Tabla IV-1: Pesos de los animales (kg) del grupo Control ($n=5$) y el grupo Colesterol ($n=10$) en los días 1, 20, 40 y 60, expresados en media \pm desviación típica.

GRUPO	DÍA 1	DÍA 20	DÍA 40	DÍA 60
CONTROL	2.09 \pm 0.21	3.01 \pm 0.27	3.56 \pm 0.31	4.00 \pm 0.32
COLESTEROL	2.11 \pm 0.13	2.97 \pm 0.12	3.38 \pm 0.15	3.53 \pm 0.22
<i>p</i>	0.82	0.7	0.15	0.04

También se calculó la ingesta diaria de pienso para cada grupo, observándose un mayor consumo diario de pienso en el grupo Control (177.29 \pm 8.9 g) frente al grupo Colesterol (117.95 \pm 25 g), existiendo diferencias significativas entre ambos, con un valor de $p=0.001$ (Tabla IV-2).

Tabla IV-2: Ingesta diaria media (g/día) del grupo Control ($n=5$) y el grupo Colesterol ($n=10$), expresada en media \pm desviación típica.

CONTROL	COLESTEROL	<i>p</i>
177.29 \pm 8.9	117.95 \pm 25	0.001

1.2. ANÁLISIS SANGUÍNEOS

A continuación se muestran los resultados de los hemogramas y de las bioquímicas sanguíneas realizados a lo largo del experimento. Se hicieron las extracciones sanguíneas los días 1, 20, 40 y 60, obteniéndose los resultados de las tablas IV-3 y IV-4.

Tabla IV-3: Evolución del hemograma sanguíneo en los conejos durante la administración de la dieta hipercolesterogénica. Se muestran los valores de los parámetros sanguíneos analizados en los días 1, 20, 40 y 60 del estudio, expresados en valores de media \pm desviación típica, en el grupo Control ($n=5$) y el grupo Colesterol ($n=10$), indicándose también el nivel de significación (p) para cada parámetro.

PARÁMETRO	RANGO DE REFERENCIA*	GRUPO	DÍA 1	DÍA 20	DÍA 40	DÍA 60
GB ($\times 10^9/l$)	4.4-9.2	CONTROL	6.22 \pm 1.57	5.9 \pm 0.67	6.7 \pm 1.75	6.95 \pm 1.56
		COLESTEROL	6.36 \pm 0.65	10.23 \pm 2.26	14.35 \pm 4.08	17.64 \pm 6.55
		p	0.81	<0.01	0.01	0.03
GR ($\times 10^{12}/l$)	5,0-7.1	CONTROL	5.56 \pm 0.43	5.64 \pm 0.4	5.72 \pm 0.57	5.88 \pm 0.66
		COLESTEROL	5.85 \pm 0.31	5.97 \pm 0.69	5.02 \pm 0.56	4.25 \pm 0.59
		p	0.15	0.34	0.04	<0.01
HB (g/l)	9.5-16.3	CONTROL	12.04 \pm 0.8	12.12 \pm 0.6	12.54 \pm 0.83	13.8 \pm 0.80
		COLESTEROL	12.14 \pm 0.54	12.75 \pm 1.23	11.36 \pm 1.07	10.16 \pm 0.97
		p	0.78	0.30	0.05	<0.01
HTO (%)	34-45	CONTROL	38.04 \pm 2.43	38.3 \pm 2.29	39.74 \pm 3.33	41.92 \pm 2.84
		COLESTEROL	38.29 \pm 1.47	37.6 \pm 4.16	32.52 \pm 3.12	29.06 \pm 3.11
		p	0.88	0.74	<0.01	<0.01
VCM (fl)	59.6-74.2	CONTROL	68.48 \pm 2.28	68.02 \pm 2.18	69.58 \pm 2.65	71.57 \pm 3.19
		COLESTEROL	65.53 \pm 2.08	63.08 \pm 1.89	64.96 \pm 2.12	68.67 \pm 3.33
		p	0.04	0.01	<0.01	0.17
HCM (pg)	19.5-24.7	CONTROL	21.70 \pm 0.72	21.54 \pm 0.79	21.96 \pm 0.86	23.6 \pm 1.26
		COLESTEROL	20.77 \pm 0.82	21.43 \pm 1.27	22.78 \pm 2.05	24.04 \pm 1.53
		p	0.05	0.86	0.41	0.62
CHCM (g/l)	30.1-37	CONTROL	31.66 \pm 0.88	31.66 \pm 0.5	31.62 \pm 0.68	32.9 \pm 0.45
		COLESTEROL	31.71 \pm 0.76	33.95 \pm 1.5	34.99 \pm 2.31	35.01 \pm 1.08
		p	0.91	0.01	<0.01	<0.01
PLT ($\times 10^9/l$)	240-510	CONTROL	280.6 \pm 40.12	258.25 \pm 58.28	253.8 \pm 36.07	245.67 \pm 20.74
		COLESTEROL	262.0 \pm 36.2	159.6 \pm 40.4	184.7 \pm 44.51	150 \pm 32.02
		p	0.49	0.03	0.01	<0.01

*El mínimo y el máximo valor encontrado en el día 1 del experimento 1.

GB: Recuento de leucocitos; GR: Recuento de eritrocitos; HB: Concentración de hemoglobina; HTO: Valor hematocrito; VCM: Volumen corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CHCM: Concentración corpuscular media de hemoglobina; PLT: Recuento de plaquetas.

En el hemograma, puede verse que los animales del grupo Colesterol presentan progresivamente en el tiempo leucocitosis, anemia y trombocitopenia con respecto al grupo Control.

Tabla IV-4: Evolución del análisis bioquímico sanguíneo en los conejos durante la administración de la dieta hipercolesterogénica. Se muestran los valores de cada uno de los parámetros bioquímicos analizados, en los días 1, 20, 40 y 60 del estudio, expresados en media \pm desviación típica, en el grupo Control ($n=5$) y el grupo Colesterol ($n=10$), indicándose también el nivel de significación (p) para cada parámetro.

PARÁMETRO	RANGO DE REFERENCIA*	GRUPO	DÍA 1	DÍA 20	DÍA 40	DÍA 60
ALB (g/dl)	2.55-4.7	CONTROL	3.34 \pm 0.29	3.44 \pm 0.25	3.41 \pm 0.33	3.04 \pm 0.46
		COLESTEROL	3.51 \pm 0.49	4.43 \pm 0.75	4.15 \pm 0.94	4.55 \pm 0.69
		p	0.42	0.01	0.04	<0.01
ALP (UI/l)	98-699	CONTROL	518.60 \pm 97.11	500 \pm 135.17	445.6 \pm 148.26	277.75 \pm 73.55
		COLESTEROL	505.2 \pm 70.17	342 \pm 71.3	240.09 \pm 102.84	176.03 \pm 24.97
		p	0.79	0.05	<0.01	<0.01
BILT (mg/dl)	0-0.14	CONTROL	0.02 \pm 0.03	0.04 \pm 0.02	0.06 \pm 0.04	0.03 \pm 0.01
		COLESTEROL	0.02 \pm 0.02	0.001 \pm 0.001	0.01 \pm 0.02	0.02 \pm 0.04
		p	0.68	<0.01	<0.01	0.46
UREA (mg/dl)	21.5-47.8	CONTROL	35.36 \pm 7.72	29.94 \pm 5.93	33.52 \pm 5.82	31.05 \pm 5.65
		COLESTEROL	32.41 \pm 6.45	23.34 \pm 4.33	25.65 \pm 2.7	26.97 \pm 6.04
		p	0.49	0.07	<0.01	0.30
CREA (mg/dl)	0.5-1.9	CONTROL	0.99 \pm 0.05	1.13 \pm 0.11	1.24 \pm 0.23	1.34 \pm 0.15
		COLESTEROL	0.92 \pm 0.2	0.82 \pm 0.55	1.25 \pm 0.79	1.47 \pm 0.64
		p	0.33	0.23	0.96	0.69
AST (UI/l)	6-52	CONTROL	22.4 \pm 7.99	13.33 \pm 2.51	18.2 \pm 5.63	14.0 \pm 8.75
		COLESTEROL	24.4 \pm 8.26	30.01 \pm 25.49	30.49 \pm 17.73	40.16 \pm 27.85
		p	0.66	0.31	0.11	0.15
ALT (UI/l)	5-45	CONTROL	19.33 \pm 2.3	23.25 \pm 10.71	26 \pm 11.6	22.75 \pm 5.44
		COLESTEROL	23.7 \pm 5.75	25.61 \pm 22.67	49 \pm 28.05	41.59 \pm 33.73
		p	0.08	0.84	0.29	0.28
PPT (g/dl)	4.2-7.1	CONTROL	5.45 \pm 0.29	5.79 \pm 0.49	5.6 \pm 0.51	5.01 \pm 0.74
		COLESTEROL	5.7 \pm 0.47	15.16 \pm 5.3	17.75 \pm 6.74	18.91 \pm 5.75
		p	0.22	<0.01	<0.01	<0.01
LDH (UI/l)	46-625	COLESTEROL	299.67 \pm 77.18	215.87 \pm 86.74	268.43 \pm 134.07	200.28 \pm 100.6
		CONTROL	303.6 \pm 136.59	252 \pm 77.7	364.75 \pm 73.92	250.5 \pm 43.13
		p	0.94	0.44	0.18	0.37
GLUC (mg/dl)	86-147	CONTROL	129 \pm 10.34	120 \pm 10.7	120.2 \pm 21.41	108.5 \pm 15.42
		COLESTEROL	124 \pm 16.5	102.3 \pm 12.7	102 \pm 19.94	106.88 \pm 14.29
		p	0.49	0.02	0.12	0.86
COL (mg/dl)	28-150	CONTROL	85.4 \pm 26.51	78.6 \pm 25.48	69.4 \pm 29.23	55.5 \pm 28.37
		COLESTEROL	92.9 \pm 33.65	1512.44 \pm 287.93	1564.0 \pm 293.58	1833.22 \pm 306.21
		p	0.65	<0.01	<0.01	<0.01
TRIG (mg/dl)	36-147	CONTROL	84.6 \pm 22.98	72.6 \pm 29.41	85.2 \pm 40.56	67 \pm 9.12
		COLESTEROL	79.7 \pm 31.37	157.3 \pm 63.59	257.14 \pm 126.71	262.2 \pm 114.45
		p	0.74	<0.01	0.01	0.01
HDL-c (mg/dl)	9-106	CONTROL	38.3 \pm 22.41	73.32 \pm 22.44	62.14 \pm 30.25	27.45 \pm 16.24
		COLESTEROL	38.33 \pm 29.3	219.71 \pm 49.17	167.52 \pm 46.42	192.55 \pm 75.99
		p	0.99	<0.01	<0.01	<0.01
LDL-c (mg/dl)	9-95	CONTROL	49.15 \pm 25.02	22.12 \pm 6.28	49.94 \pm 16.45	51.76 \pm 32.91
		COLESTEROL	37.41 \pm 18.8	69.23 \pm 35.61	75.38 \pm 37.01	73.93 \pm 37.8
		p	0.39	0.04	0.28	0.38

*El mínimo y el máximo valor encontrado en el día 1.

ALB: Albúmina; ALP: Fosfatasa alcalina; BILT: Bilirrubina total; CREA: Creatinina; AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; PPT: Proteínas plasmáticas totales; LDH: Lactato deshidrogenasa; GLUC: Glucosa; COL: Colesterol; TRIG: Triglicéridos; HDL-c: Lipoproteínas transportadoras de colesterol de alta densidad; LDL-c: Lipoproteínas transportadoras de colesterol de baja densidad.

Se puede observar que los parámetros que se han modificado a lo largo del estudio, han sido el colesterol y las HDL, los triglicéridos, la albúmina, la fosfatasa alcalina y las proteínas totales del grupo Colesterol, con diferencias significativas respecto a los valores del grupo Control. La albúmina y la fosfatasa alcalina permanecen dentro del rango de normalidad a lo largo del estudio, pero el resto de parámetros se muestran fuera de los límites normales de referencia desde el día 20 de la ingestión de la dieta.

1.3. ECOGRAFÍA VASCULAR

Puesta a punto de la técnica ecográfica

Se realizaron cuatro ecografías vasculares a cada animal a lo largo del estudio, en los días 1, 20, 40 y 60, tanto de la arteria aorta como de la íliaca izquierda.

Para realizar las ecografías se posicionó al animal en decúbito lateral derecho y el transductor colocado en paralelo al plano dorsal del tronco y perpendicular al flanco izquierdo del conejo (Figura IV-1), pudiendo así disponer de una ventana acústica adecuada para realizar los registros ecográficos de las arterias aorta e íliaca izquierda.

En cada uno de los 60 exámenes ecográficos, se realizó la localización de las arterias aorta e íliaca externa izquierda, y la medición del diámetro total y de la luz de las mismas, con el modo ecográfico B (bidimensional) (Figura IV-2). A continuación se verificó la permeabilidad y el correcto flujo de las arterias mediante Doppler color (Figura IV-3). Finalmente, se realizó la evaluación cuantitativa y cualitativa del flujo arterial, mediante Doppler pulsado (Figura IV-4).

La arteria aorta se localizó colocando el transductor en un corte sagital paralelamente a la musculatura sublumbar a nivel de la cuarta y quinta vértebra lumbar. La arteria aorta aparece como una estructura cilíndrica, cuyo interior es anecoico y con paredes fuertemente ecogénicas. Su pulsatilidad es visible en ocasiones. Para la localización de la arteria íliaca externa izquierda, nos desplazamos caudalmente desde la aorta, en el mismo plano sagital hasta su bifurcación. Después, siguiendo nuestro desplazamiento, angulamos a la vez dorsalmente el transductor para localizarla como un vaso de apariencia arqueada que disminuye de diámetro progresivamente en sentido caudal. Al igual que la aorta, su luz interna es anecoica y sus paredes ecogénicas.

La medición del flujo arterial se realizó con el modo ecográfico Doppler pulsado. Se realizó colocando la muestra Doppler en la luz arterial, sobre la imagen bidimensional de un corte longitudinal de la aorta inmediatamente anterior a la bifurcación. Ajustamos el volumen de muestra a la luz de la arteria (aproximadamente 4 milímetros) hasta que obtuvimos un registro de la onda de flujo con, por lo menos, 3-5 picos sistólicos consecutivos de buena calidad acústica y apariencia similar. Este procedimiento se repitió dos veces para obtener una media del valor del flujo. A continuación se repitió el mismo procedimiento después de la bifurcación de la aorta, en la arteria ilíaca externa izquierda. Una vez obtenidas las gráficas, se determinaron el pico de velocidad sistólica (PVS), que es el valor máximo de velocidad que se registra durante la sístole, y la velocidad diastólica terminal (VDT), que es el valor máximo de la velocidad que se registra durante la diástole. Con estas dos medidas calculamos el índice de resistencia (IR), que es una estimación de la resistencia al paso del flujo de sangre, y se define como la diferencia a través del ciclo cardíaco entre el máximo y el mínimo cambio de velocidad Doppler dividido por el máximo. Para ello, se aplica la fórmula $(PVS-VDT)/PVS$ para el cálculo del IR en cada caso.



Figura IV-1: Posicionamiento del animal en decúbito lateral derecho con el transductor colocado en paralelo al plano dorsal del tronco y perpendicular a su flanco izquierdo.

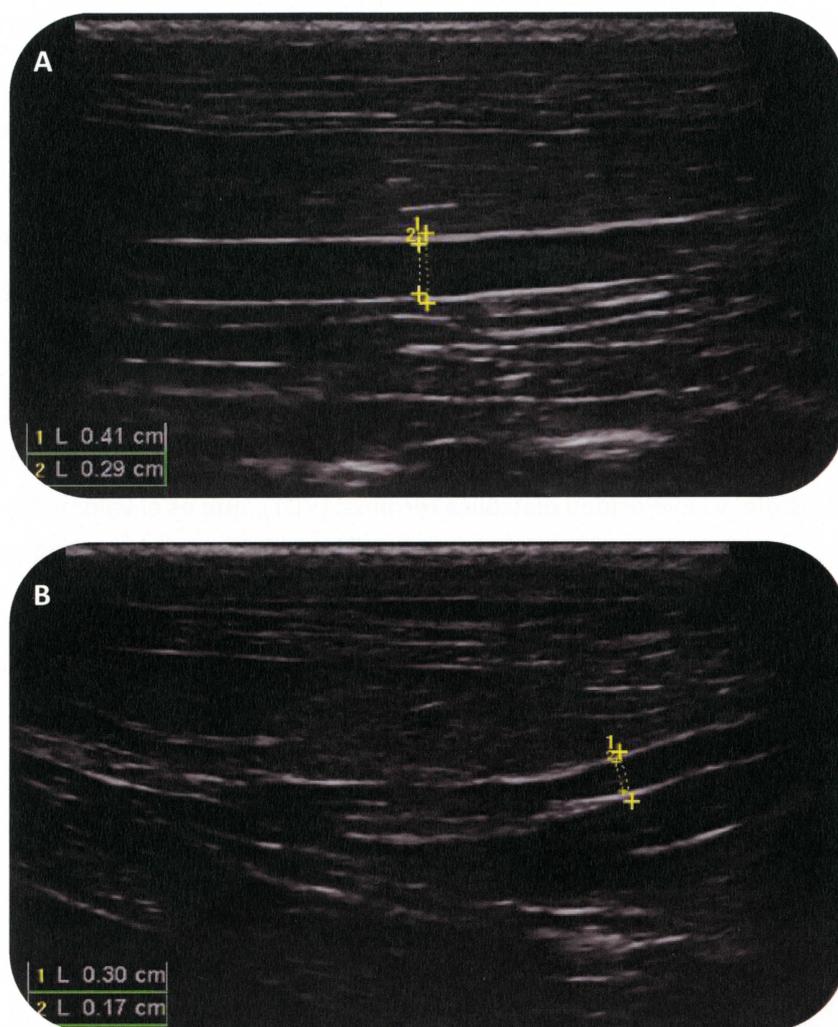


Figura IV-2: Localización ecográfica de las arterias aorta (A) e ilíaca externa izquierda (B) y medición del diámetro total (1) y de la luz (2) de las mismas, mediante modo B (bidimensional).

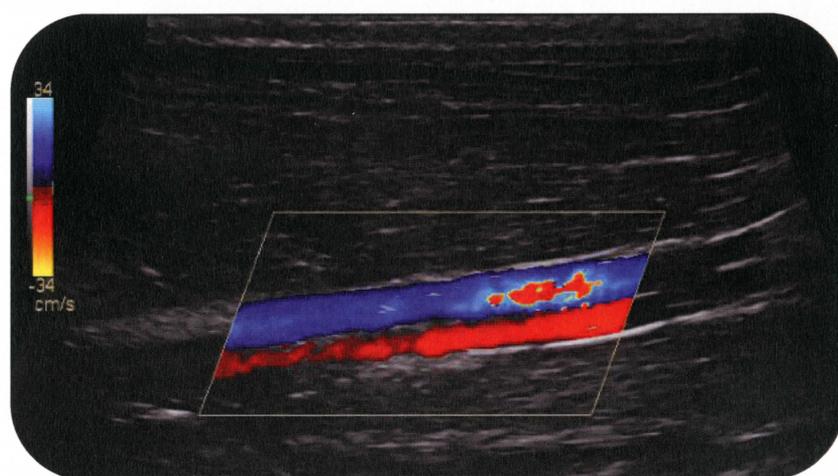


Figura IV-3: Verificación de la permeabilidad y el correcto flujo de la arteria aorta (patrón cromático azul), mediante ecografía Doppler color. Se observa también la vena cava caudal (patrón cromático rojo).

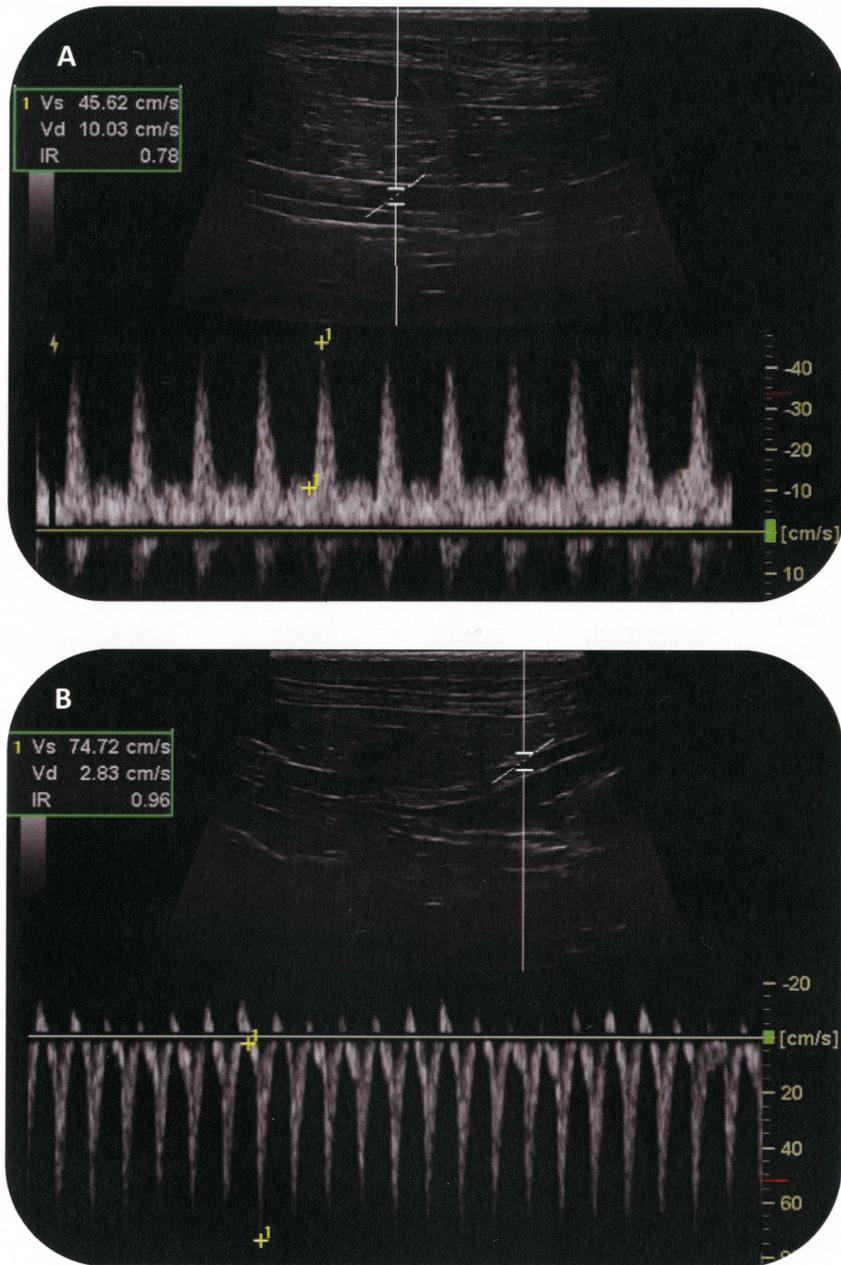


Figura IV-4: Evaluación ecográfica cuantitativa y cualitativa del flujo arterial, mediante Doppler pulsado, en las arterias aorta (A) e ilíaca externa (B). 1, Vs: Velocidad sistólica máxima; Vd: Velocidad diastólica terminal; IR: Índice de resistencia vascular. Obsérvese la distinta disposición de la señal pulsátil arterial por encima (A) o debajo de la línea base (B) en función del ángulo de la toma de muestra Doppler.

Diámetros y valores hemodinámicos arteriales

En la tabla IV-5 se muestra los datos obtenidos mediante ecografía en modo B de los diámetros, la luz y las paredes arteriales de la aorta, a nivel de la cuarta y quinta vértebra lumbar, así como de la arteria ilíaca externa izquierda, inmediatamente después de la bifurcación aórtica.

Tabla IV-5: Evolución de los diámetros, la luz arterial y el grosor de la pared de las arterias aorta e ilíaca externa izquierda en los grupos Control (n=5) y Colesterol (n=10). Se muestran los valores en los días 1, 20, 40 y 60. Los resultados están expresados como media \pm desviación típica, consignando el valor p de significación.

	GRUPO	DÍA 1	DÍA 20	DÍA 40	DÍA 60
DIÁMETRO TOTAL ARTERIA AORTA (mm)	CONTROL	3.2 \pm 0.3	4.1 \pm 0.3	4.0 \pm 0.3	3.9 \pm 0.5
	COLESTEROL	3.2 \pm 0.4	4.0 \pm 0.3	4.0 \pm 0.4	3.5 \pm 0.4
	<i>p</i>	0.67	0.62	0.96	0.16
LUZ ARTERIA AORTA (mm)	CONTROL	2.2 \pm 0.2	2.8 \pm 0.3	3.0 \pm 0.2	2.9 \pm 0.4
	COLESTEROL	2.3 \pm 0.3	2.8 \pm 0.3	2.7 \pm 0.4	2.4 \pm 0.4
	<i>p</i>	0.62	0.90	0.22	0.05
PARED ARTERIA AORTA (mm)	CONTROL	0.6 \pm 0.01	0.63 \pm 0.1	0.52 \pm 0.1	0.54 \pm 0.1
	COLESTEROL	0.54 \pm 0.1	0.62 \pm 0.1	0.57 \pm 0.1	0.55 \pm 0.1
	<i>p</i>	0.2	0.8	0.3	0.8
DIÁMETRO TOTAL ARTERIA ILÍACA (mm)	CONTROL	2.5 \pm 0.6	2.8 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2
	COLESTEROL	2.4 \pm 0.4	2.8 \pm 0.5	2.9 \pm 0.3	2.9 \pm 0.4
	<i>p</i>	0.73	0.90	0.06	0.60
LUZ ARTERIA ILÍACA (mm)	CONTROL	1.6 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1
	COLESTEROL	1.5 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3
	<i>p</i>	0.41	1.00	0.33	0.50
PARED ARTERIA ILÍACA (mm)	CONTROL	0.48 \pm 0.1	0.56 \pm 0.05	0.56 \pm 0.1	0.56 \pm 0.1
	COLESTEROL	0.46 \pm 0.05	0.55 \pm 0.1	0.56 \pm 0.1	0.62 \pm 0.1
	<i>p</i>	0.5	0.8	1	0.3

Se observan diferencias significativas en la luz arterial de la aorta, siendo ésta más estenótica en el grupo Colesterol (0.24 cm) que en el grupo Control (0.29 cm) ($p=0.05$), en el día 60 al final de la administración de la dieta. La luz de la arteria ilíaca de los animales del grupo colesterol también es mayor que la del grupo control, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. No existen diferencias significativas en el grosor de la pared de

ninguna de las dos arterias, aunque en ambos casos, se observa mayor grosor en las arterias del grupo Colesterol en el día 60.

A continuación, la tabla IV-6 muestra los datos obtenidos de la evaluación ecográfica del flujo arterial mediante Doppler pulsado, tanto en la arteria aorta como en la íliaca externa izquierda.

Tabla IV-6 Evolución del flujo arterial en la aorta e íliaca externa izquierda en los grupos Control (n=5) y Colesterol (n=10). Se muestran los valores en los días 1, 20, 40 y 60. Los resultados están expresados como media \pm desviación típica, consignando el valor *p* de significación.

	GRUPO	DÍA 1	DÍA 20	DÍA 40	DÍA 60
PVS AORTA (cm/s)	CONTROL	42.87 \pm 5.55	58.15 \pm 6.35	35.19 \pm 6.65	44.47 \pm 16.44
	COLESTEROL	42.74 \pm 10.5	50.29 \pm 17.71	48.83 \pm 11.28	60.51 \pm 13.96
	<i>p</i>	0.98	0.36	0.03	0.07
VDT AORTA (cm/s)	CONTROL	9.62 \pm 1.94	11.90 \pm 1.58	6.82 \pm 1.57	7.51 \pm 3.94
	COLESTEROL	9.51 \pm 2.88	9.12 \pm 3.83	10.16 \pm 2.89	13.56 \pm 4.99
	<i>p</i>	0.94	0.15	0.03	0.03
IR AORTA	CONTROL	0.77 \pm 0.06	0.79 \pm 0.03	0.81 \pm 0.02	0.84 \pm 0.05
	COLESTEROL	0.78 \pm 0.03	0.82 \pm 0.04	0.79 \pm 0.04	0.78 \pm 0.05
	<i>p</i>	0.73	0.24	0.43	0.08
PVS ILÍACA (cm/s)	CONTROL	42.30 \pm 8.18	56.35 \pm 19.5	56.70 \pm 20.88	62.24 \pm 14.00
	COLESTEROL	46.68 \pm 14.41	44.53 \pm 21.56	41.72 \pm 13.63	48.61 \pm 14.57
	<i>p</i>	0.54	0.32	0.11	0.11
VDT ILÍACA (cm/s)	CONTROL	8.00 \pm 3.00	8.38 \pm 3.09	8.86 \pm 5.11	8.14 \pm 4.28
	COLESTEROL	8.38 \pm 3.25	6.54 \pm 3.96	7.37 \pm 2.8	7.49 \pm 1.89
	<i>p</i>	0.83	0.38	0.47	0.68
IR ILÍACA	CONTROL	0.81 \pm 0.06	0.85 \pm 0.03	0.85 \pm 0.06	0.87 \pm 0.06
	COLESTEROL	0.81 \pm 0.05	0.85 \pm 0.05	0.82 \pm 0.05	0.84 \pm 0.03
	<i>p</i>	0.92	0.91	0.35	0.28

PVS: pico de velocidad sistólica; VDT: velocidad diastólica terminal; IR: índice de resistencia

Se observan diferencias significativas en el PVS de la aorta en el día 40 y en la VDT de la aorta los días 40 y 60, siendo estos parámetros más elevados en el grupo colesterol que en el grupo control ($p=0.03$). No se observan diferencias significativas en los valores de la arteria íliaca ni en los índices de resistencia de ninguna de las dos arterias.

1.4. TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA

Se procedió a la anestesia de los animales como se describe en el apartado 4 de Material y Métodos. Una vez anestesiados, se posicionaron en decúbito dorsal (Figura IV-5), y se realizaron los estudios tomográficos.

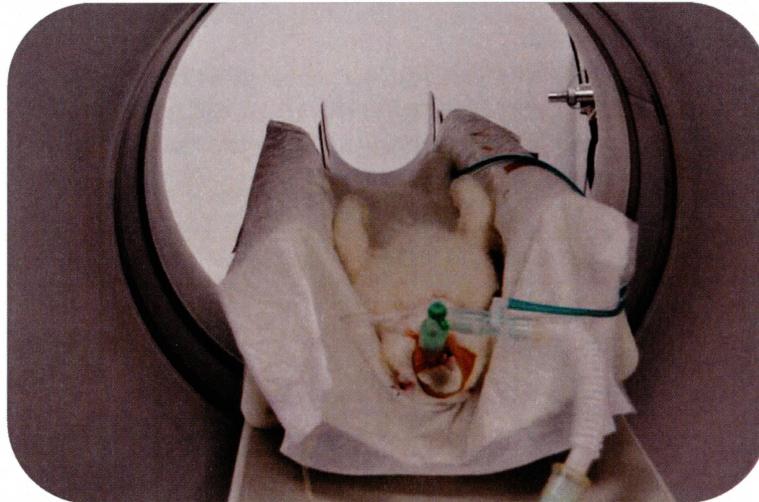


Figura IV-5: Posicionamiento del conejo en decúbito dorsal en el centro del pórtico sobre la mesa del equipo de tomografía antes de la adquisición de las imágenes.

Los estudios tomográficos en vacío sin contraste se realizaron a modo de control interno con el fin de fijar los límites anatómicos para la adquisición post-contraste posterior, así como detectar posibles anomalías en los animales. En todos los casos los resultados de los estudios tomográficos se extrapolaron a partir de los estudios post-contraste.

Se realizaron las adquisiciones volumétricas tomográficas helicoidales de los trayectos arteriales completos entre las arterias carótida e ilíaca externa izquierda en los grupos Colesterol (n=10) y Control (n=5), ofreciendo así una imagen global de la aorta en el plano curvo con diferentes rotaciones planares (Figuras IV-6 y IV-7), permitiendo evaluar así su permeabilidad. La lectura de las imágenes se llevó a cabo por un único observador sin conocer a qué grupo pertenecía cada animal. En todos los individuos se observó una correcta permeabilidad en las luces arteriales, sin defectos de llenado en la columna de contraste tanto en las arterias carótidas como en la aorta y la ilíaca izquierda, no apreciándose estenosis intraluminal. Las paredes de las arterias en ambos grupos presentaron una morfología similar, no pudiéndose discriminar las lesiones parietales ateromatosas en el grupo Colesterol.

Las Figuras IV-6 y IV-7 muestran a modo de ejemplo tres imágenes de la modelización tomográfica aórtica en un conejo del grupo Control y otro del grupo Colesterol.

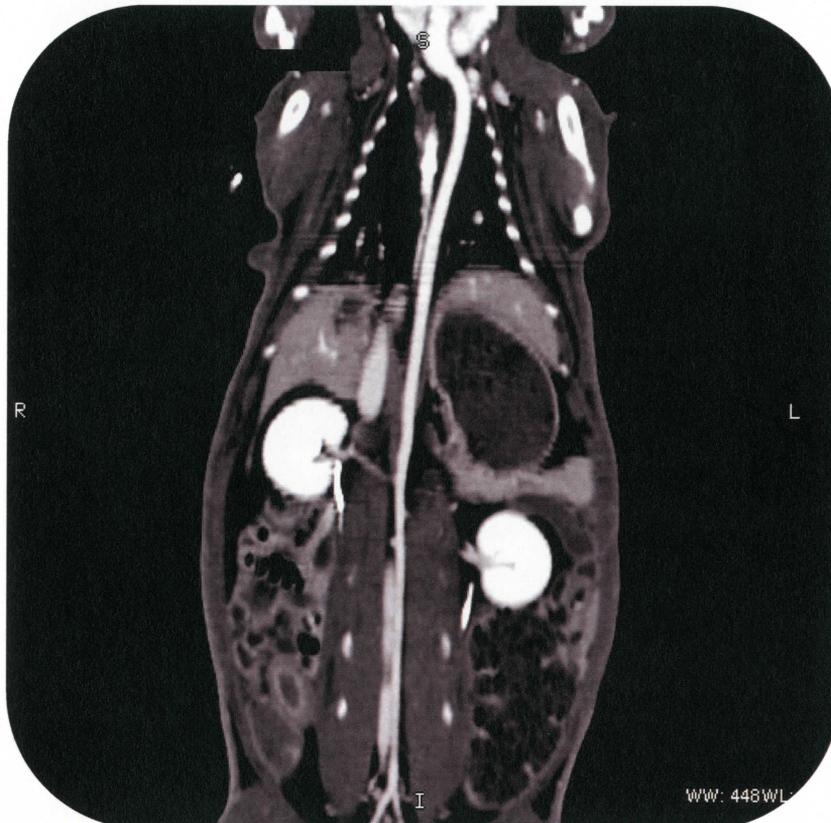


Figura IV-6: Modelización tomográfica de la arteria aorta tomada en el plano dorsal de un conejo del grupo Colesterol. Obsérvese el perfil anatómico del vaso que, lleno de contraste yodado (Iodixanol, 320 mgI₂ / ml) y sin defectos de llenado, muestra la ausencia de estenosis luminal o irregularidades parietales. Anchura y longitud de ventana tomográfica: W= 448 /L= 215 (W: width, L: length).

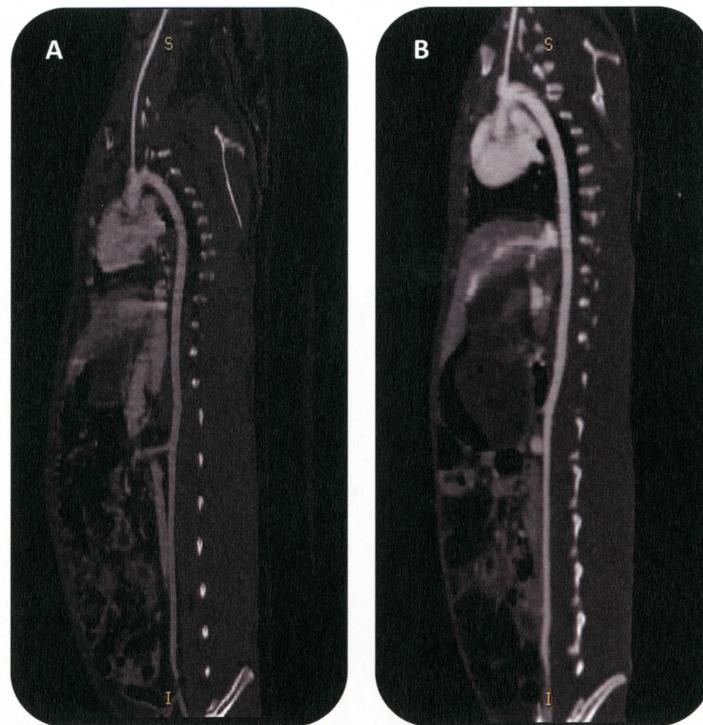


Figura IV-7: Modelización tomográfica comparativa de ambas arterias aortas tomada en el plano sagital entre un conejo Control (A) y otro Colesterol (B). Obsérvese el perfil anatómico de ambas arterias que, llenas de contraste yodado (Iodixanol, 320 mgI₂ / ml) radiopaco, no muestran alteraciones de la permeabilidad ni presencia de estenosis luminal en ambos individuos. Las anchuras y longitudes de las ventanas tomográficas son W= 1298 / L= 477 para A y W= 968 / L=373 para B.

Asimismo, se realizaron modelizaciones multiplanares de la arteria aorta en ambos grupos, tomando como límites anatómicos el trayecto entre las arterias carótida hasta la íliaca externa izquierda. La imagen vascular rectilínea que se obtuvo representa una elongación artefactual de la arteria aorta, que se asocia a una gráfica que muestra la variación de los diámetros arteriales a lo largo de su trayecto en sentido craneocaudal. Todas las gráficas diametrales mostraron un perfil similar en los individuos de ambos grupos, mostrando una luz arterial máxima en el área del cayado aórtico, y progresivamente decreciente en sentido craneocaudal. Las figuras IV-8 y IV-9 se incluyen a modo de ejemplo de este tipo de modelización.

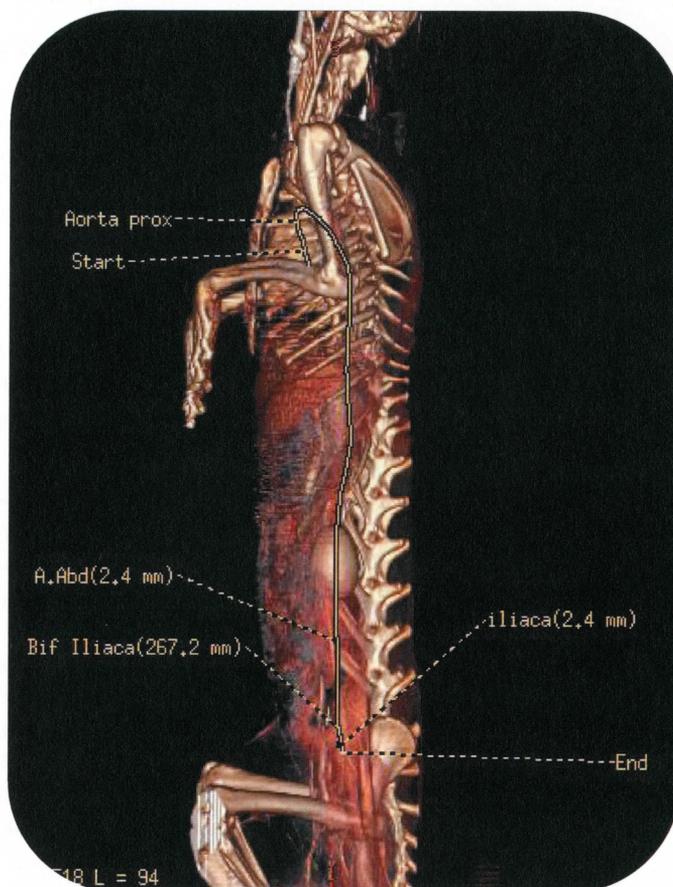


Figura IV-8: Reconstrucción tomográfica 3D de un conejo del grupo Control, mostrando el trayecto vascular (línea amarilla) seleccionado por el software en el transcurso de la modelización multiplanar de la arteria aorta en su elongación artefactual (ver Figura IV-9). Anchura y longitud de ventana tomográfica: $W=518 / L=94$.

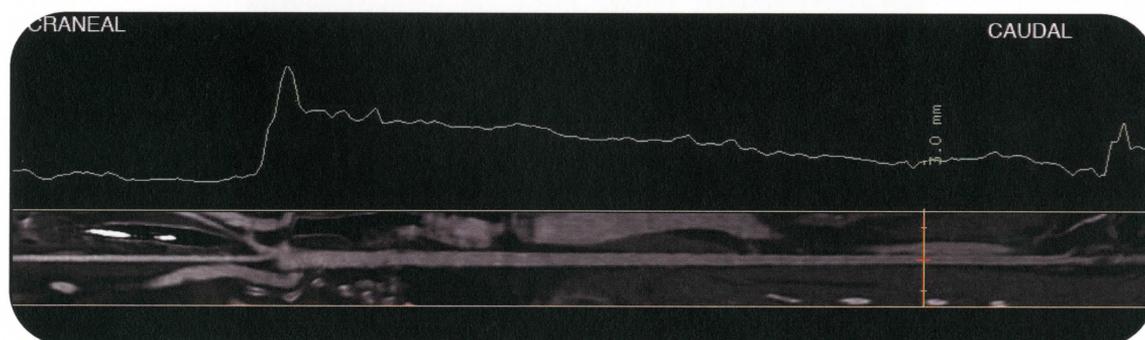


Figura IV-9: Representación tomográfica de la arteria aorta como imagen artefactual elongada dispuesta en paralelo a su gráfica diametral (representada con un trazado de color verde) en un conejo del grupo Colesterol. Obsérvese la variación normal de los diámetros de las arterias, mostrando el aplanamiento de la gráfica en el área carotídea, el pico máximo en la región del cayado y la variación decreciente en sentido craneocaudal del diámetro arterial aórtico. No se observan estenosis intraluminales. Anchura y longitud de ventana tomográfica: $W=1288 / L=477$, después de la administración de contraste intravenoso.

Los valores de los diámetros de las luces aórticas y los propios de las arterias ilíacas izquierdas calculados tomando sus secciones tomográficas transversales a nivel de L4-L5 e inmediatamente después de la bifurcación aórtica respectivamente, y las áreas arteriales en cortes transversales de las mismas se muestran en la Tabla IV-7. Estas medidas se realizaron después de la administración de contraste intravenoso. Asimismo, dos ejemplos del cálculo diametral arterial se ilustran en las figuras IV-10 y IV-11.

Tabla IV-7: Diámetros y áreas lumbales en secciones tomográficas transversales de la aorta (a nivel de L4-L5) e ilíaca externa izquierda (inmediatamente caudal de la bifurcación aórtica) en el día 60 (Grupo Control; n=5 Grupo Colesterol, n=10). Los resultados están expresados como media \pm desviación típica, consignando el valor p de significación.

	CONTROL	COLESTEROL	P
Diámetro arterial de aorta en L4-L5 (mm)	3.44 \pm 0.69	3.09 \pm 0.37	0.21
Área luminal de aorta en L4-L5 (mm ²)	10.76 \pm 2.55	7.59 \pm 1.65	0.01
Diámetro arterial en Ilíaca externa izquierda (mm)	2.62 \pm 0.76	2.54 \pm 0.64	0.83
Área luminal de Ilíaca externa izquierda (mm ²)	5.74 \pm 3.12	5.36 \pm 2.9	0.82

Se observan diferencias significativas entre los dos grupos en el área luminal de la arteria aorta a nivel de L4-L5 ($p=0.01$), siendo esta área mayor en el grupo Control que en el grupo Colesterol. El área de la arteria ilíaca del grupo Control también es mayor que la del grupo Colesterol, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

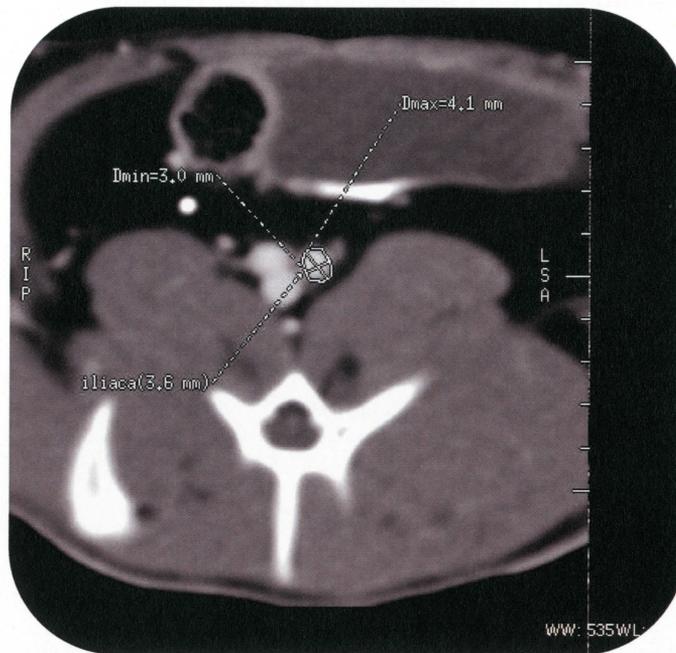


Figura IV-10: Imagen tomográfica transversal del abdomen de un conejo del grupo Colesterol obtenida a nivel de L6 después de la administración de contraste yodado intravenoso. Obsérvese la delineación de la arteria ilíaca izquierda (contorneada circularmente con una línea continúa) y la obtención de los diámetros luminales mínimo y máximo, así como su media. Anchura y longitud de ventana tomográfica: W= 535 / L=215.

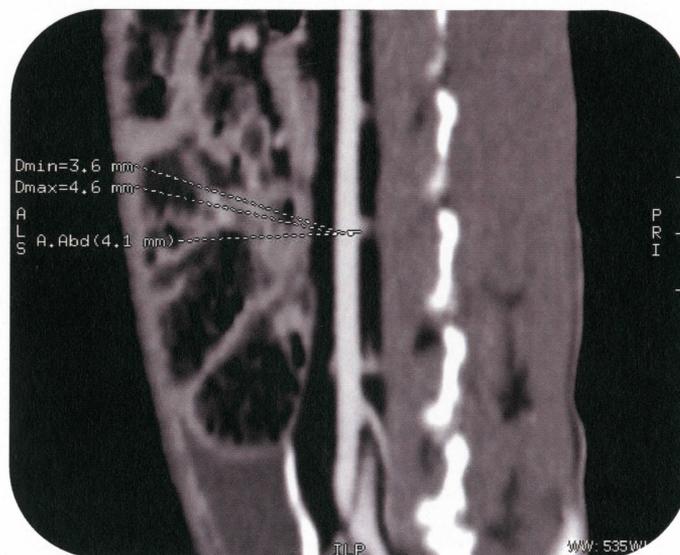


Figura IV-11: Imagen tomográfica de una reconstrucción longitudinal del abdomen caudal observándose el perfil de la arteria aorta abdominal en un conejo del grupo Colesterol después de la administración de contraste intravenoso. Obsérvese la toma de los diámetros arteriales mínimo, máximo y medio a nivel de L4-L5. Anchura y longitud de ventana tomográfica: W= 535 / L= 176.

1.5. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL HÍGADO

Tras el sacrificio de los animales y la necropsia de los mismos, se realizó la extracción y el pesaje de los hígados, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla IV-8):

Tabla IV-8: Peso en gramos de los hígados en el grupo Control ($n=5$) y el grupo Colesterol ($n=10$) y, expresados en media \pm desviación típica.

CONTROL	COLESTEROL	<i>p</i>
105.9 \pm 4.5	148.1 \pm 21.7	<0.001

Además de la hepatomegalia observada, en todos los individuos del grupo Colesterol se apreció un cambio intenso de coloración hacia el amarillo, así como un incremento de la friabilidad en comparación con el grupo Control. A continuación se muestra una imagen del aspecto macroscópico de un hígado del grupo Control y otro del grupo Colesterol (Figura IV-12) y otra imagen microscópica de un hígado del grupo Colesterol (Figura IV-13).

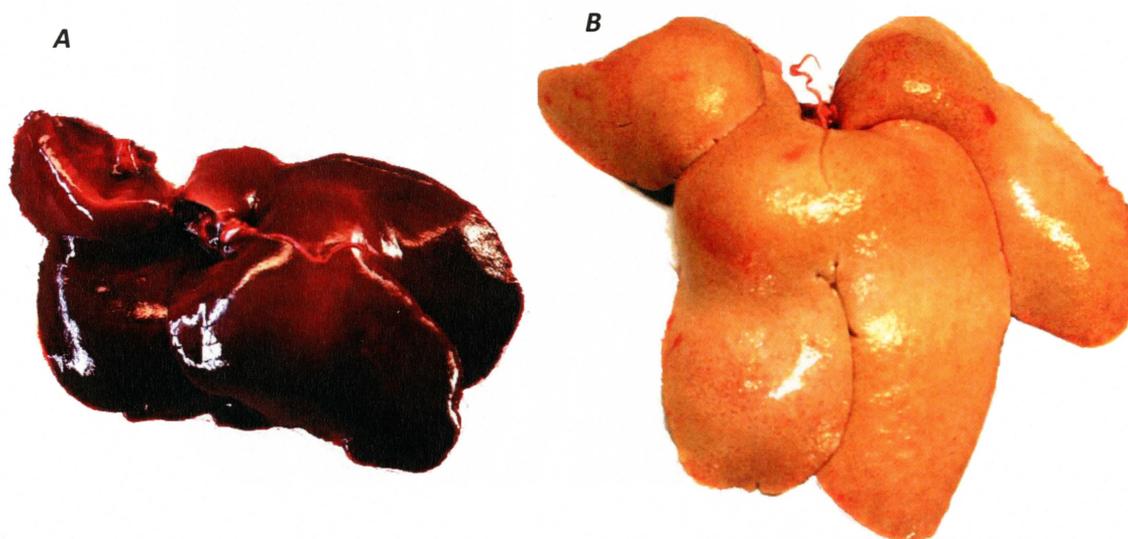


Figura IV-12: Imagen macroscópica de hígados de conejos pertenecientes al grupo Control (A) y Colesterol tras 60 días de dieta hiperlipídica (B). Obsérvese la hepatomegalia grave y la coloración amarillenta compatible con lipidosis y degeneración grasa hepática.

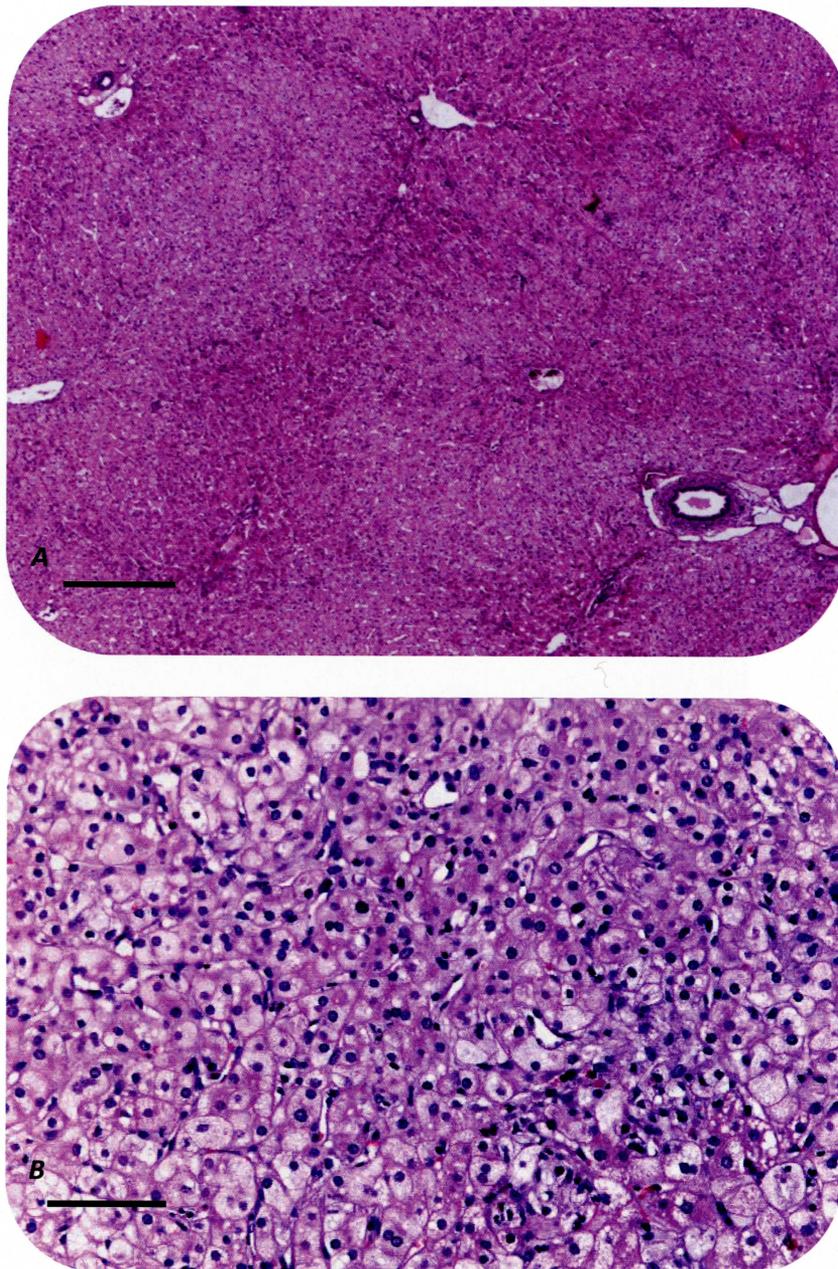


Figura IV-13: Imagen microscópica del parénquima hepático de un conejo perteneciente al grupo Colesterol tras 60 días de dieta hiperlipídica. Obsérvese el cúmulo de lípidos y vacuolización citoplasmática en los hepatocitos mostrando una severa degeneración grasa (Tinción Hematoxilina-Eosina; A: ———= 200 μ m; B: ———=100 μ m).

1.6. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA LESIÓN ATEROMATOSA ARTERIAL

Se realizó la tinción Oil Red-O en las 15 muestras de arteria, observándose la tinción positiva en todos los animales del grupo Colesterol (n=10), y negativa en todos los del grupo Control (n=5) (Figura IV-14). Mediante el programa analizador de imágenes ImageJ se calculó el porcentaje de íntima afectada de la arteria aorta de los conejos Colesterol, que fue de $70,75 \pm 20,52 \%$.



Figura IV-14: Imágenes de tinción Oil Red-O en las íntimas arteriales de la arteria aorta abdominal. Obsérvese la tinción negativa en un conejo del grupo Control (A) y positiva en uno del grupo Colesterol (B).

Las lesiones observadas en las arterias del grupo Colesterol siguen la misma distribución, siendo más extensas en la zona del cayado aórtico, y disminuyendo progresivamente hasta la bifurcación aórtica (ver tabla IV-9, y figuras IV-15 y IV-16). Además se observa que, a medida que avanzamos por la aorta descendente, y existe menor porcentaje de íntima afectada, las lesiones se distribuyen con mayor intensidad alrededor de cada una de las ramificaciones de la arteria (Figura IV-17).

Es en la zona del cayado de la aorta donde existe mayor porcentaje afectado de la íntima arterial (media de 94.11 %), observándose dos animales con el 100% de la íntima con lesión. La mínima lesión observada es en la íliaca izquierda (media de 36.82%), siendo de un 13% en el conejo con la lesión menos extensa.

Tabla IV-9: Evidencia de depósito de grasa en la íntima arterial de los conejos respecto del total de la circunferencia del vaso en las 6 áreas anatómicas evaluadas. Tinción de Oil Red-O tras la apertura longitudinal del vaso tras 60 días de administración de la dieta hipercolesterogénica. Resultado expresado en porcentaje medio \pm desviación típica.

ÁREA ANATÓMICA	% DEPÓSITO LIPÍDICO
CARÓTIDA	59.85 \pm 16.27
CAYADO AÓRTICO	94.11 \pm 9.01
AORTA TORÁCICA	82.63 \pm 15.87
AORTA ABDOMINAL	54.24 \pm 15.32
BIFURCACIÓN ILÍACA	42.63 \pm 10.9
ILÍACA EXTERNA IZQUIERDA	42.08 \pm 12.08

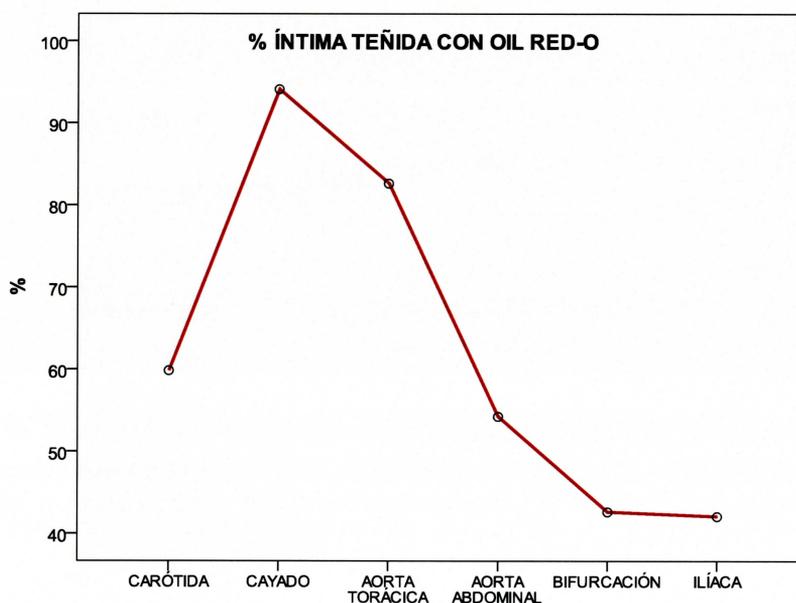


Figura IV-15: Medias de los porcentajes de área íntima teñida con la tinción Oil Red-O en las 6 zonas arteriales estudiadas, representándose gráficamente cómo va disminuyendo el porcentaje de tinción a medida que se avanza en sentido craneocaudal a lo largo de la arteria.

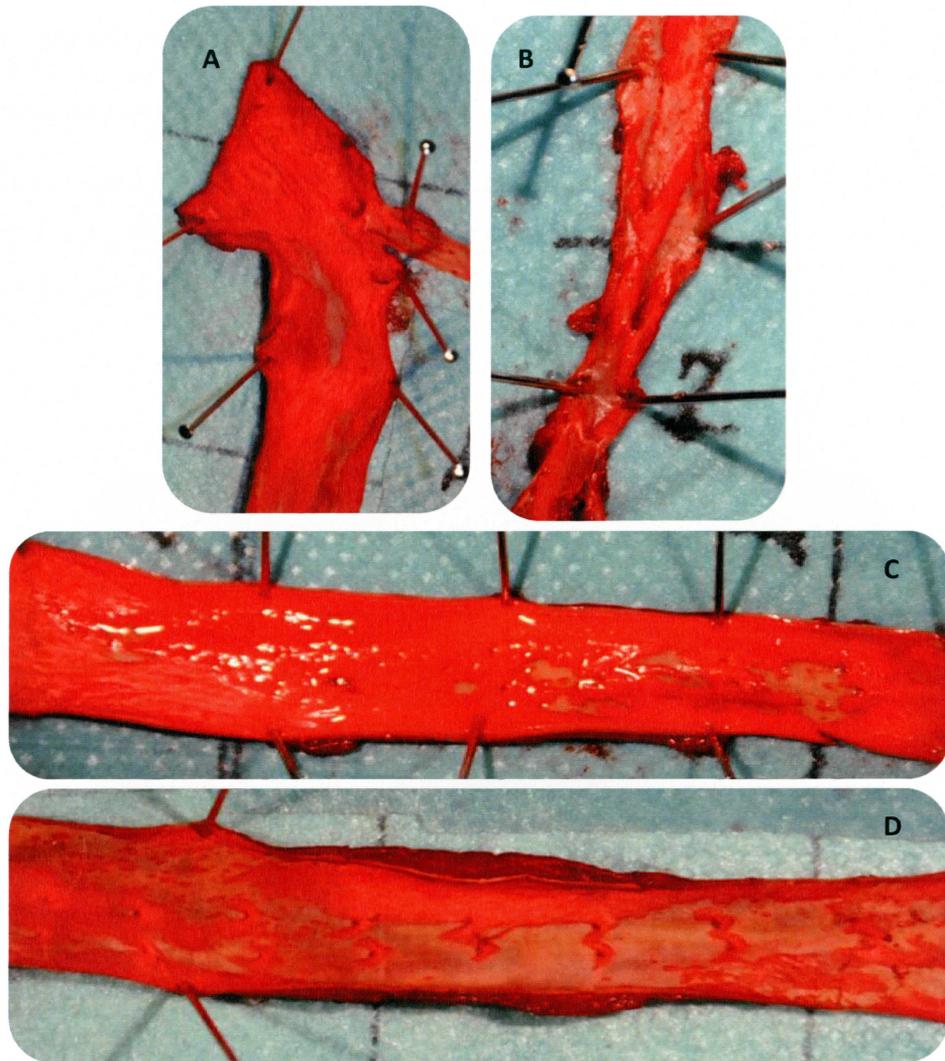


Figura IV-16: Imágenes de tinción Oil Red-O en distintos segmentos arteriales de conejos del grupo Colesterol. Se observan diferentes extensiones de íntima afectadas por depósito de grasa en cayado aórtico (A), aorta torácica (C), aorta abdominal (D) y bifurcación e íliaca externa izquierda (B).

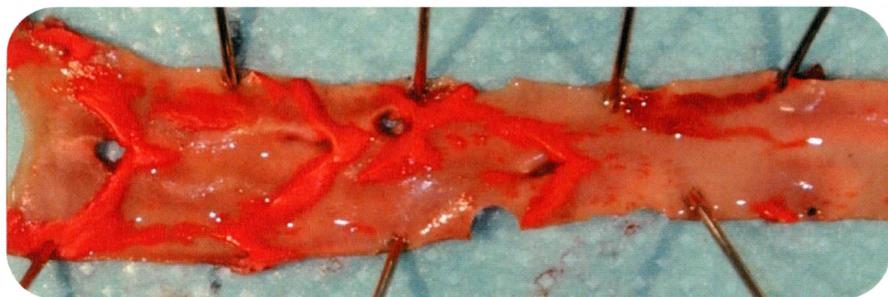


Figura IV-17: Apertura longitudinal de la aorta abdominal de un conejo del grupo Colesterol, en la que se observa la lesión coloreada con la tinción Oil Red-O distribuida alrededor de sus ramificaciones arteriales.

1.7. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LA LESIÓN ATEROMATOSA ARTERIAL

Se realizó el estudio microscópico de las 12 secciones arteriales que se tomaron de cada conejo con el fin de clasificarlas según el grado de lesión encontrado. Los conejos del grupo Control no presentaron lesiones en ningún caso (Figura IV-18). En los conejos del grupo Colesterol se encontraron 2 tipos de lesiones ateromatosas, *tempranas* y *avanzadas*, distribuidas a lo largo de las arterias. No se encontró ninguna lesión *complicada*.

Lesiones tempranas

Las *lesiones tempranas* se caracterizan por la presencia de abundantes células espumosas organizadas en múltiples hileras en la íntima arterial, con algunas células musculares lisas intercaladas entre éstas. Apenas se observan lípidos extracelulares (Figura IV-19). En la mayoría de ocasiones se trata de lesiones concéntricas que afectan el 100% de la membrana elástica interna (MEI).

Lesiones avanzadas

Las *lesiones avanzadas* se caracterizan por una desorganización en la íntima arterial de las células espumosas. Existe depósito de lípidos extracelulares formando un núcleo lipídico, que además está rodeado de una capa de células de músculo liso (CML). Además, existe un evidente desdoblamiento de la MEI y un adelgazamiento de la capa muscular en el lugar de la lesión, en especial en las zonas de gran proliferación. En algunos casos, la capa del ateroma es más fibrosa, y existe en general un claro predominio fibroso frente al predominio lipídico de las lesiones tempranas (Figuras IV-20 y IV-21).

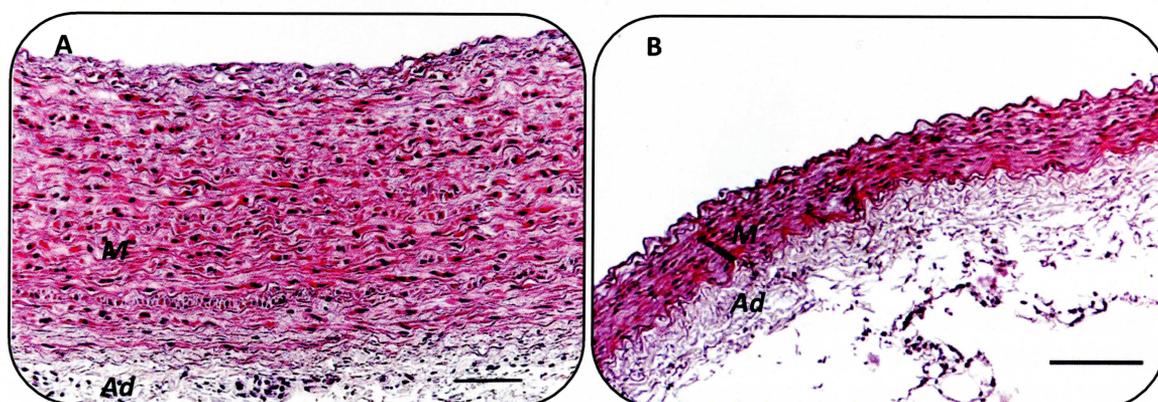


Figura IV-18: Arteria aorta (A) e iliaca izquierda (B) de conejo del grupo Control (Tinción Hematoxina-Eosina (H-E); M: media, Ad: adventicia; ———= 100 µm).

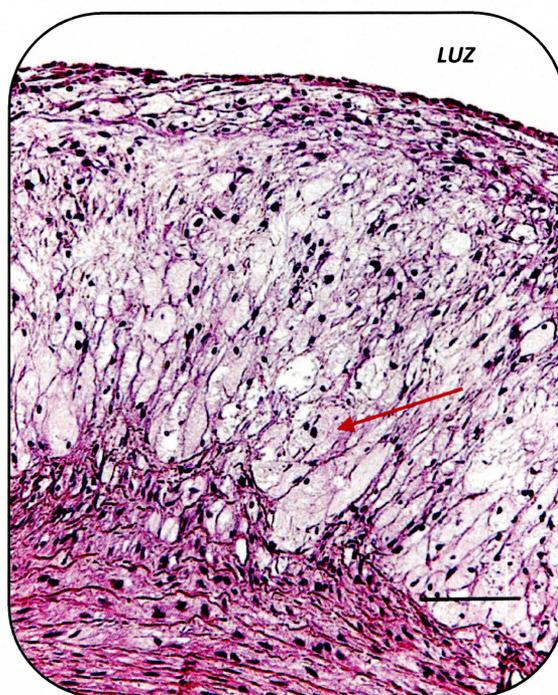


Figura IV-19: Lesión ateromatosa temprana en el cayado aórtico donde se observan abundantes células espumosas en la íntima arterial (flecha roja) (Tinción H-E; ———= 50 μ m).

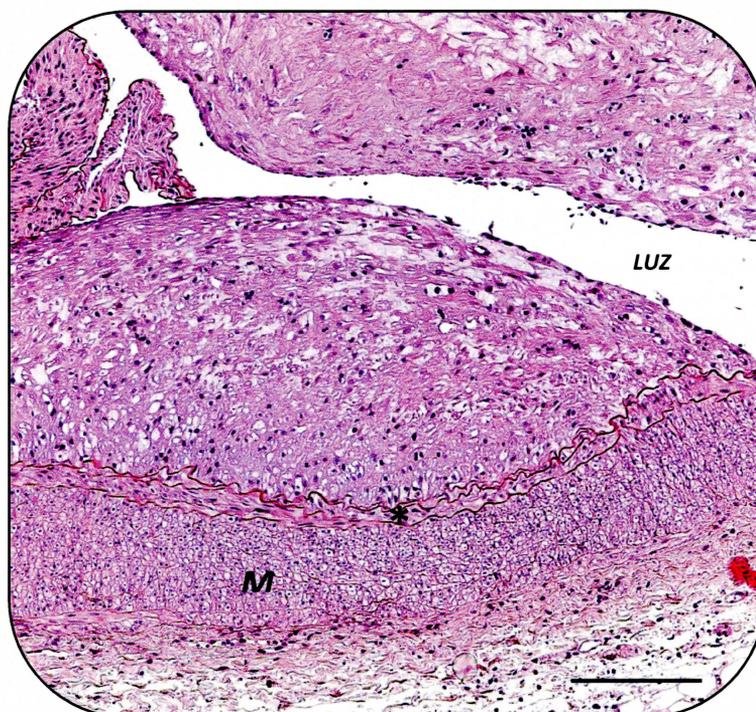


Figura IV-20: Lesión ateromatosa avanzada en la arteria ilíaca donde se observa desorganización en la íntima, depósito de lípidos extra e intracelulares, desdoblamiento de la MEI (*) y adelgazamiento de la capa muscular (M) (Tinción H-E; ———= 100 μ m).

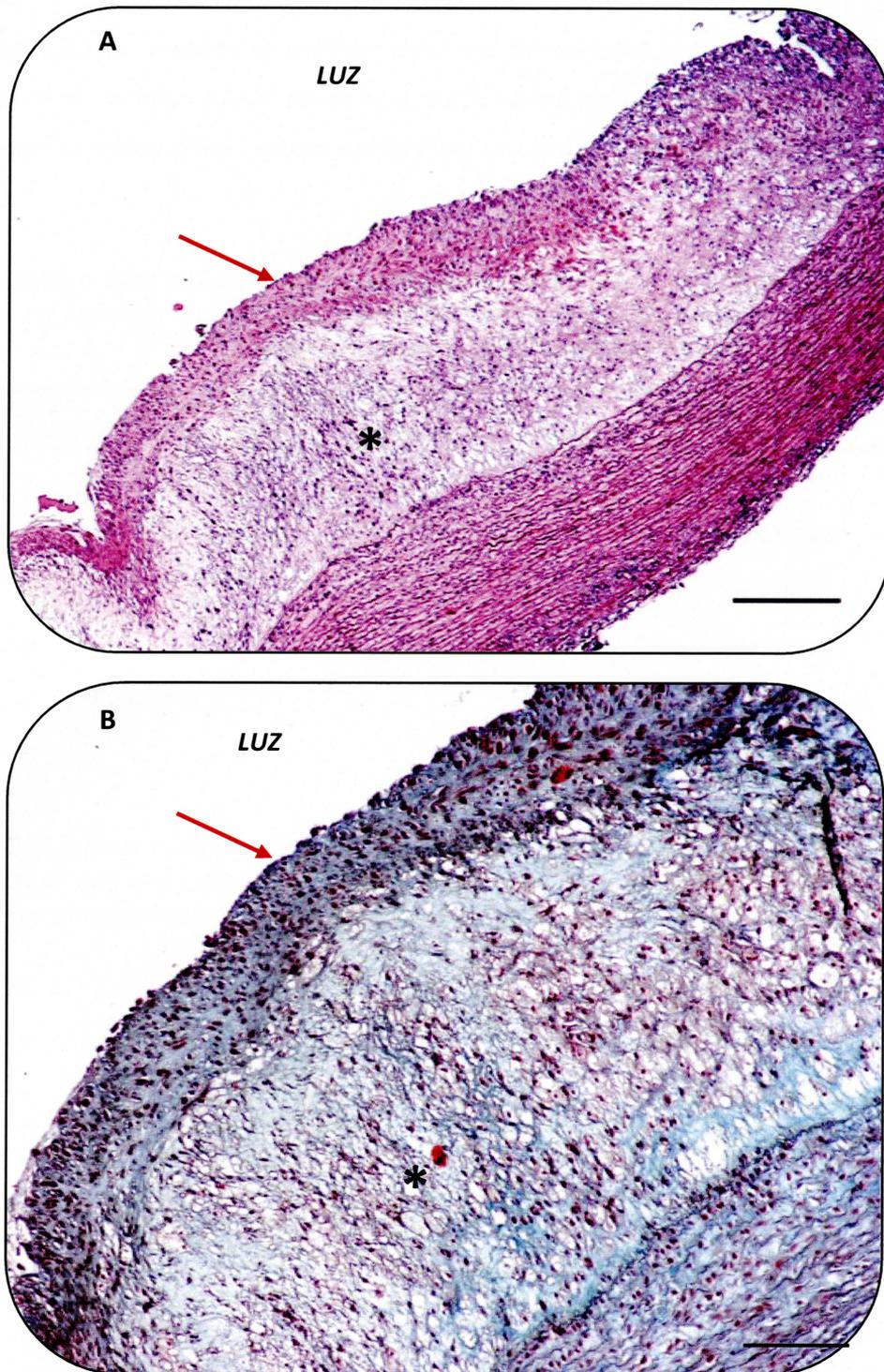


Figura IV-21: Lesión ateromatosa avanzada en la íntima del cayado aórtico donde se observa un núcleo lipídico (*) rodeado de capa de fibroateroma (flecha) (A: Tinción H-E; B: Tinción Masson Trichrome Goldner; ———=100 μ m).

La tabla IV-10 y la figura IV-22 muestran la distribución regional de las lesiones ateromatosas en las distintas zonas arteriales estudiadas. Puede observarse que las zonas del cayado y la aorta torácica presentan lesiones en todos los animales en mayor o menor grado. Las lesiones *tempranas* se observan en un mayor número de animales en el cayado aórtico, mientras que las lesiones *avanzadas* se distribuyen en un mayor número de animales en la aorta abdominal y la bifurcación ilíaca. No se observan lesiones *complicadas* en ninguna de las áreas estudiadas.

Tabla IV-10: Distribución y grado de lesión ateromatosa según el área anatómica en las muestras de los conejos del grupo Colesterol (n=10). Los datos se expresan en número de animales según la zona de estudio y el tipo de lesión encontrado.

ÁREA ANATÓMICA	SIN LESIÓN	LESIONES TEMPRANAS	LESIONES AVANZADAS	LESIONES COMPLICADAS
CARÓTIDA A	6	3	1	0
CARÓTIDA B	3	3	4	0
CAYADO A	0	9	1	0
CAYADO B	0	8	2	0
AORTA TORÁCICA A	0	4	6	0
AORTA TORÁCICA B	0	3	7	0
AORTA ABDOMINAL A	0	1	9	0
AORTA ABDOMINAL B	1	1	8	0
BIFURCACIÓN ILÍACA A	2	2	6	0
BIFURCACIÓN ILÍACA B	2	1	7	0
ILÍACA EXTERNA IZQUIERDA A	0	2	8	0
ILÍACA EXTERNA IZQUIERDA B	3	1	6	0

A: muestra craneal; B: muestra caudal

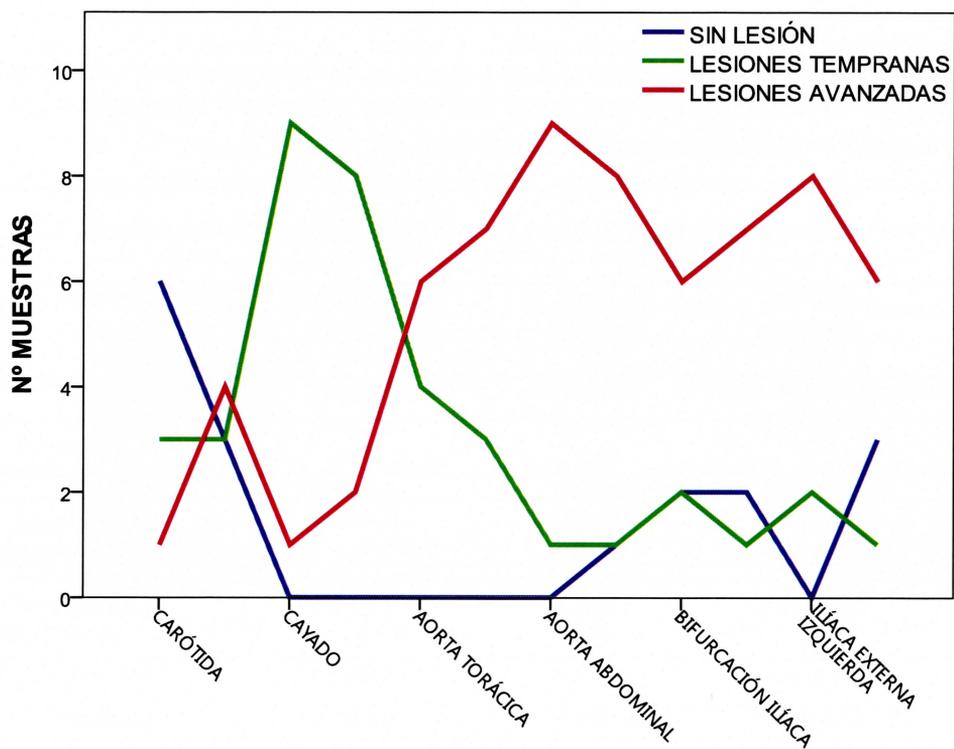


Figura IV-22: Representación gráfica de la distribución de las lesiones arteriales agrupadas según el tipo de ateroma y área anatómica en las muestras de los conejos del grupo Colesterol. No se observa ninguna muestra con lesiones complicadas.

A continuación se exponen los resultados obtenidos del análisis microscópico cuantitativo de las 12 secciones arteriales (Tablas IV-11 y IV-12).

Tabla IV-11: Perímetro de MEI, capa media y área luminal en las 12 secciones arteriales, para los grupos Control (n=5) y Colesterol (n=10). Datos expresados en media \pm desviación típica. Se indica el nivel de significación (p) para cada parámetro.

ÁREA ANATÓMICA	GRUPO	PERÍMETRO MEI (mm)	CAPA MEDIA (mm)	ÁREA LUMINAL (mm ²)
CARÓTIDA A	CONTROL	2.2 \pm 0.15	0.07 \pm 0.001	0.39 \pm 0.05
	COLESTEROL	2.09 \pm 0.22	0.10 \pm 0.01	0.35 \pm 0.07
	<i>p</i>	0.35	<001	0.38
CARÓTIDA B	CONTROL	2.24 \pm 0.31	0.08 \pm 0.01	0.41 \pm 0.11
	COLESTEROL	2.84 \pm 0.84	0.12 \pm 0.02	0.69 \pm 0.45
	<i>p</i>	0.2	0.03	0.2
CAYADO A	CONTROL	8.14 \pm 1.12	0.30 \pm 0.02	5.35 \pm 1.50
	COLESTEROL	8.97 \pm 0.88	0.25 \pm 0.08	6.47 \pm 1.23
	<i>p</i>	0.2	0.1	0.3
CAYADO B	CONTROL	7.26 \pm 1.02	0.17 \pm 0.01	4.26 \pm 1.24
	COLESTEROL	7.90 \pm 1.1	0.20 \pm 0.05	5.05 \pm 1.40
	<i>p</i>	0.3	0.2	0.3
AORTA TORÁCICA A	CONTROL	5.59 \pm 1.39	0.15 \pm 0.01	2.61 \pm 1.21
	COLESTEROL	6.64 \pm 0.57	0.15 \pm 0.02	3.53 \pm 0.60
	<i>p</i>	0.2	0.8	0.2
AORTA TORÁCICA B	CONTROL	5.59 \pm 1.26	0.12 \pm 0.01	2.58 \pm 1.19
	COLESTEROL	6.22 \pm 0.73	0.15 \pm 0.03	3.12 \pm 0.75
	<i>p</i>	0.2	0.1	0.3
AORTA ABDOMINAL A	CONTROL	4.73 \pm 0.10	0.09 \pm 0.01	1.79 \pm 0.07
	COLESTEROL	5.27 \pm 0.80	0.11 \pm 0.01	2.26 \pm 0.64
	<i>p</i>	0.3	0.1	0.3
AORTA ABDOMINAL B	CONTROL	4.13 \pm 0.61	0.08 \pm 0.01	1.36 \pm 0.45
	COLESTEROL	3.77 \pm 0.72	0.09 \pm 0.01	1.17 \pm 0.41
	<i>p</i>	0.6	0.3	0.6
BIFURCACIÓN ILÍACA A	CONTROL	3.59 \pm 0.45	0.08 \pm 0.02	1.03 \pm 0.32
	COLESTEROL	3.21 \pm 0.43	0.09 \pm 0.02	0.83 \pm 0.22
	<i>p</i>	0.4	0.3	0.4
BIFURCACIÓN ILÍACA B	CONTROL	3.44 \pm 0.45	0.10 \pm 0.02	0.95 \pm 0.15
	COLESTEROL	3.47 \pm 0.45	0.10 \pm 0.01	0.97 \pm 0.26
	<i>p</i>	0.9	0.9	0.8
ILÍACA EXTERNA IZQUIERDA A	CONTROL	2.84 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01	0.64 \pm 0.02
	COLESTEROL	2.86 \pm 0.39	0.13 \pm 0.04	0.66 \pm 0.16
	<i>p</i>	0.9	0.04	0.8
ILÍACA EXTERNA IZQUIERDA B	CONTROL	2.18 \pm 0.22	0.06 \pm 0.01	0.38 \pm 0.07
	COLESTEROL	2.31 \pm 0.46	0.08 \pm 0.01	0.44 \pm 0.18
	<i>p</i>	0.6	0.05	0.6

A: muestra craneal; B: muestra caudal; MEI: membrana elástica interna

Tabla IV-12: Perímetro afectado de MEI (mm), altura (mm) y área de lesión (mm²), porcentaje de lesión ateromatosa, porcentaje de estenosis luminal y cociente íntima/media en las 12 secciones arteriales del grupo Colesterol (n=10) *. Datos expresados en media ± desviación típica.

ÁREA ANATÓMICA	PERÍMETRO AFECTADO (mm)	ALTURA LESIÓN (mm)	ÁREA LESIÓN (mm ²)	% PERÍMETRO AFECTADO	% ESTENOSIS LUMINAL	ÍNTIMA/MEDIA
CARÓTIDA A	0.08±0.01	0.003±0.001	0.06±0.03	3.39±0.39	0.89±0.24	0.59±0.29
CARÓTIDA B	2.59±1.16	0.29±0.11	0.45±0.35	81.06±15.75	50.49±19.37	2.23±0.77
CAYADO A	8.77±1.03	0.34±0.07	1.65±0.69	97.85±6.44	26.58±13.71	1.66±0.87
CAYADO B	6.93±1.7	0.25±0.07	1.01±0.36	87.00±13.18	20.35±6.14	1.33±0.46
AORTA TORÁCICA A	4.76±1.93	0.20±0.05	0.67±0.50	71.3±26.97	18.82±12.32	1.32±0.39
AORTA TORÁCICA B	4.16±1.53	0.15±0.05	0.38±0.24	66.75±22.8	12.43±7.65	1.04±0.38
AORTA ABDOMINAL A	3.01±0.95	0.13±0.04	0.21±0.12	57.21±16.04	10.25±6.37	1.23±0.49
AORTA ABDOMINAL B	1.78±1.04	0.09±0.05	0.12±0.10	46.95±20.75	10.53±7.02	1.06±0.73
BIFURCACIÓN ILÍACA A	1.31±0.90	0.09±0.03	0.08±0.06	39.69±26.69	9.42±7.23	1.12±0.51
BIFURCACIÓN ILÍACA B	1.53±0.49	0.13±0.02	1.11±0.03	44.15±11.8	12.01±3.84	1.28±0.21
ILÍACA IZQUIERDA A	1.40±0.70	0.14±0.06	0.14±0.09	49.35±23.81	22.1±14.61	1.11±0.5
ILÍACA IZQUIERDA B	0.61±0.52	0.06±0.03	0.03±0.04	24.45±15.31	5.95±5.28	0.76±0.45

A: muestra craneal; B: muestra caudal; MEI: membrana elástica interna

*Las medidas de estos parámetros en el grupo Control fueron 0 en todos los casos, ya que no se observaron lesiones en ninguna muestra.

Como puede verse de la información contenida en la Tabla IV-11, los perímetros arteriales y el área luminal en las distintas áreas anatómicas son similares en sus dimensiones ($p>0,05$) en todos los casos en el grupo Colesterol y el Control. En cuanto a la capa arterial media, su grosor es significativamente diferente ($p\leq 0,05$) en el área carotídea y de la ilíaca externa, siendo mayor en el grupo Colesterol que en Control en todas las muestras.

Según la Tabla IV-12, las dimensiones máximas (altura y área) de la lesión ateromatosa se sitúan en la porción caudal de la carótida y el cayado aórtico, para luego ir progresivamente

decreciendo en sentido caudal hasta llegar a la bifurcación aórtica (porción caudal) e ilíaca externa (porción craneal), donde vuelven a aumentar de manera considerable. En cuanto al porcentaje de perímetro de MEI afectado, puede observarse que es máximo en el cayado aórtico (97.85%), disminuyendo progresivamente a medida que se avanza en sentido craneocaudal a lo largo de la arteria. Se observa también un leve aumento en la parte más caudal de la bifurcación y la más craneal de la arteria ilíaca. En el caso de las arterias carótida e ilíaca externa, se observa mayor afección de la MEI en las muestras más cercanas al cayado y la bifurcación respectivamente. Además, se observan lesiones concéntricas en 17 de las muestras observadas (Figura IV-23). Estas muestras, que presentan un 100% de MEI afectada se corresponden con la zona del cayado aórtico, la aorta torácica y la carótida externa en su porción más caudal. En la aorta abdominal e ilíaca externa no se han observado lesiones concéntricas.

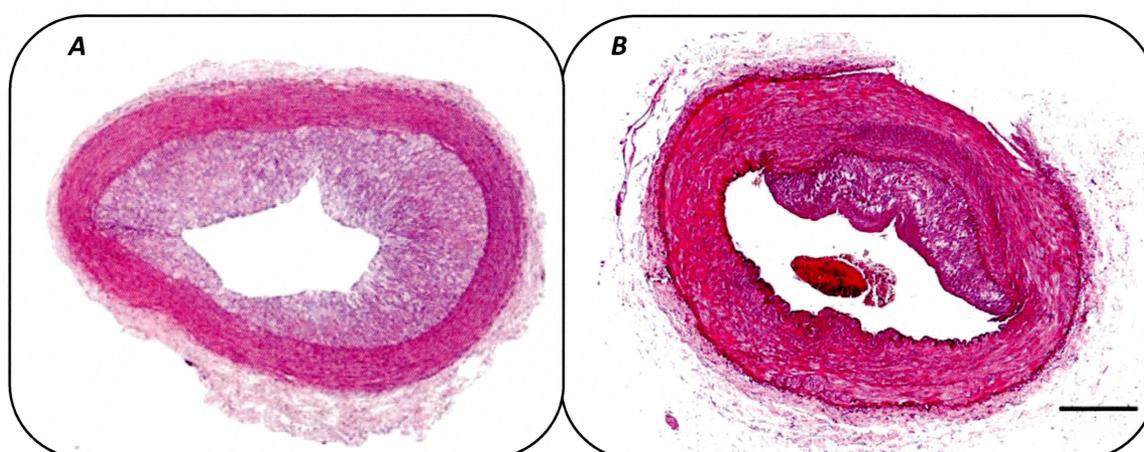


Figura IV-23: Lesión concéntrica (A) y excéntrica (B) en arteria carótida de conejos del grupo Colesterol (Tinción H-E; —=200 μ m).

En cuanto al porcentaje de estenosis de la luz arterial, se observa la misma progresión, obteniéndose los valores medios más altos de estenosis luminal en la porción caudal de la arteria carótida (50.48% de estenosis) y en el cayado aórtico, a la salida del corazón (26.58% de estenosis). El valor máximo de estenosis se observa en una muestra caudal de la carótida, en la zona más cercana a la ramificación de la aorta, siendo ésta de un 82.89%. La menor estenosis observada se localiza en la aorta abdominal, siendo ésta de 0.21%.

El cociente íntima /media indica que las lesiones más gruesas en relación al grosor de la capa media, se localizan en el cayado y en la ramificación de la carótida, presentando un cociente medio de 1.66 y 2.23 respectivamente. Se trata de placas que miden de media 0.34 y

0.29 mm de grosor. En la aorta torácica y abdominal el índice está alrededor de 1, con lo que el grosor de la lesión es similar al de la capa media. Finalmente, el cociente íntima/ media es menor de 1 en la porción más craneal de la carótida y en la parte final de la ilíaca, siendo por tanto, lesiones más delgadas en estas zonas.

La figura IV-24 muestra los parámetros obtenidos del análisis morfométrico de las muestras del grupo Control (Tabla IV-12), a fin de representar de manera gráfica cómo evolucionan estos parámetros a medida que se avanza en sentido craneocaudal por las arterias carótida, aorta e ilíaca.

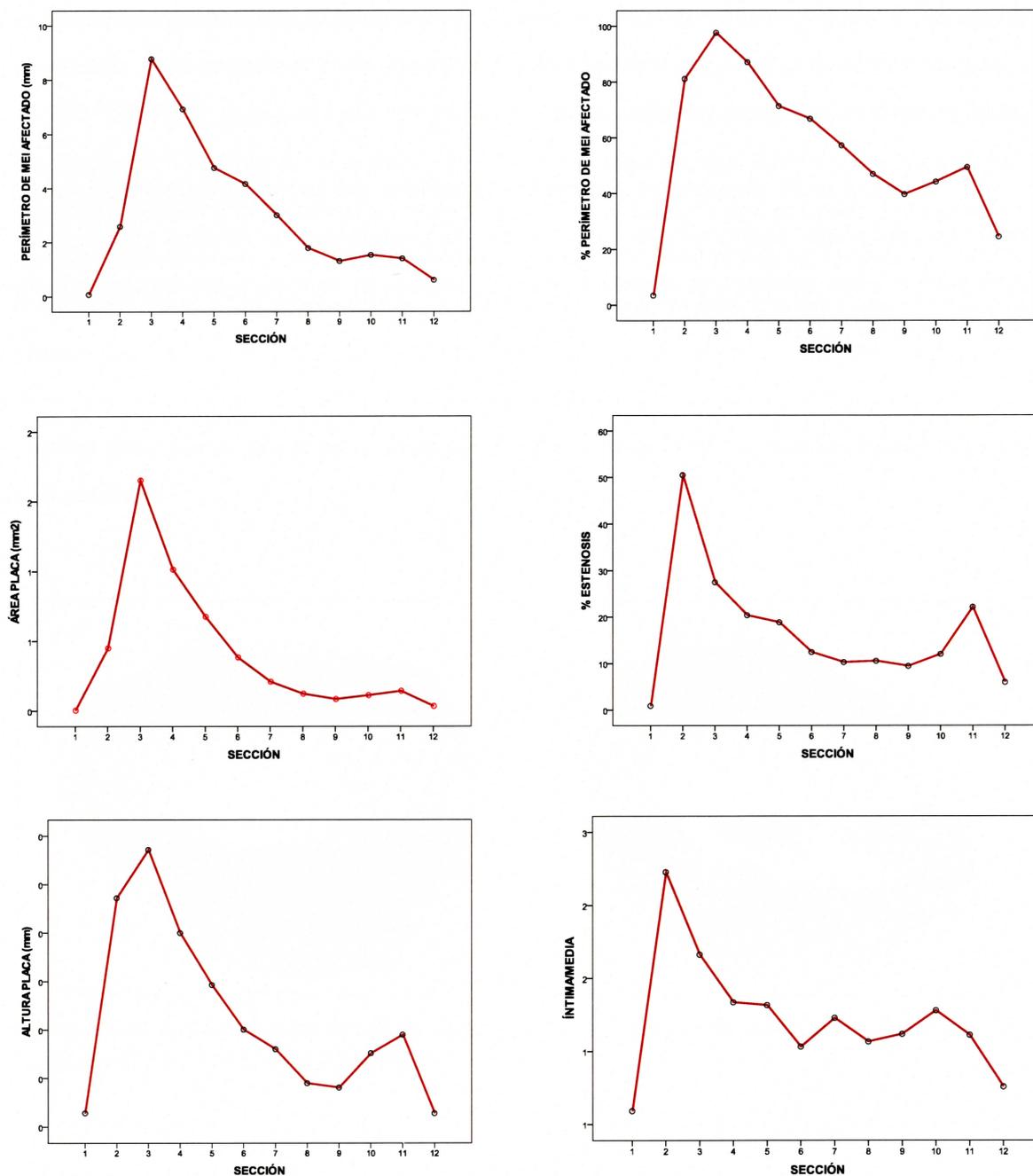


Figura IV-24: Evolución de los parámetros cuantificadores del ateroma en las distintas secciones arteriales en el grupo Colesterol ($n=10$) (1 y 2: carótida; 3 y 4: cayado aórtico; 5 y 6: aorta torácica; 7 y 8: aorta abdominal; 9 y 10: bifurcación aórtica; 11 y 12: íliaca externa izquierda).

2. TÉCNICA DE LESIÓN EN LA ARTERIA ILÍACA IZQUIERDA MEDIANTE ABORDAJE TRANSCAROTÍDEO EN EL CONEJO. OPTIMIZACIÓN E INCIDENCIAS

En la primera parte de los resultados se ha descrito el modelo experimental de arteriosclerosis en conejos mediante la utilización de dieta hiperlipídica. Se han descrito los cambios observados en los parámetros sanguíneos y se han valorado dos técnicas de imagen para comparar los grupos Colesterol y Control. Finalmente, mediante el estudio histológico de las muestras de grupo Colesterol se han descrito las lesiones que se desarrollan con nuestro modelo. Así, se ha comprobado que no se desarrollan lesiones complicadas únicamente con la administración de dieta hiperlipídica. A fin de poder provocar este tipo de lesiones, se puso a punto la técnica de denudación endotelial en el conejo, que pasamos a comentar a continuación.

2.1. ANESTESIA

Los 36 animales se sedaron con el protocolo detallado en el apartado de Material y Métodos, realizándose esta parte sin incidencias. A continuación, tras la inducción con propofol, se produjeron 4 bajas por apnea (11,1% de mortalidad).

De los 32 animales restantes se intubaron 21 animales, los cuales fueron mantenidos con isoflurano como anestesia inhalatoria (65,63%). Los otros 11 conejos que no fueron intubados, se mantuvieron con infusión continua de propofol (34,37%). Durante todo el proceso de la intervención, no se produjeron bajas atribuibles al mantenimiento anestésico.

2.2. CATETERIZACIÓN TRANSCAROTÍDEA DE LA ARTERIA ILÍACA IZQUIERDA

El animal se posicionó en decúbito dorsal, con las extremidades anteriores reclinadas caudalmente y un saco de arena en la región dorsal del cuello para facilitar su extensión. Se incidió la piel siguiendo la línea ventral media, desde la laringe hasta el relieve del manubrio esternal. La retracción lateral de la piel permitía visualizar la fascia superficial y el delgado músculo esfínter superficial del cuello, caracterizado por la disposición transversal de sus fibras. Este músculo, por su escasa importancia clínica y su estructura muy fina, se incide y separa junto con la piel y fascia superficial. Tras retraer lateralmente el músculo esfínter superficial del cuello, aparecían los músculos esternocéfálicos y esternohioideo de ambos lados, que se incidieron siguiendo longitudinalmente la línea intermuscular y se lateralizaron.

Lateralizando la tráquea (en este caso para buscar la carótida izquierda) junto con el nervio laríngeo recurrente izquierdo y la vena tiroidea caudal hacia el lado derecho, quedó expuesta la vaina carotídea izquierda, delimitada por el músculo largo de la cabeza y músculo largo del cuello. En la vaina carotídea izquierda se encuentran el tronco vagosimpático, la arteria carótida y la vena yugular interna izquierdas. Disecando con cuidado la arteria carótida, se separó del resto de los componentes de la vaina carotídea izquierda y se exteriorizó para su cateterización (Figura IV-25).

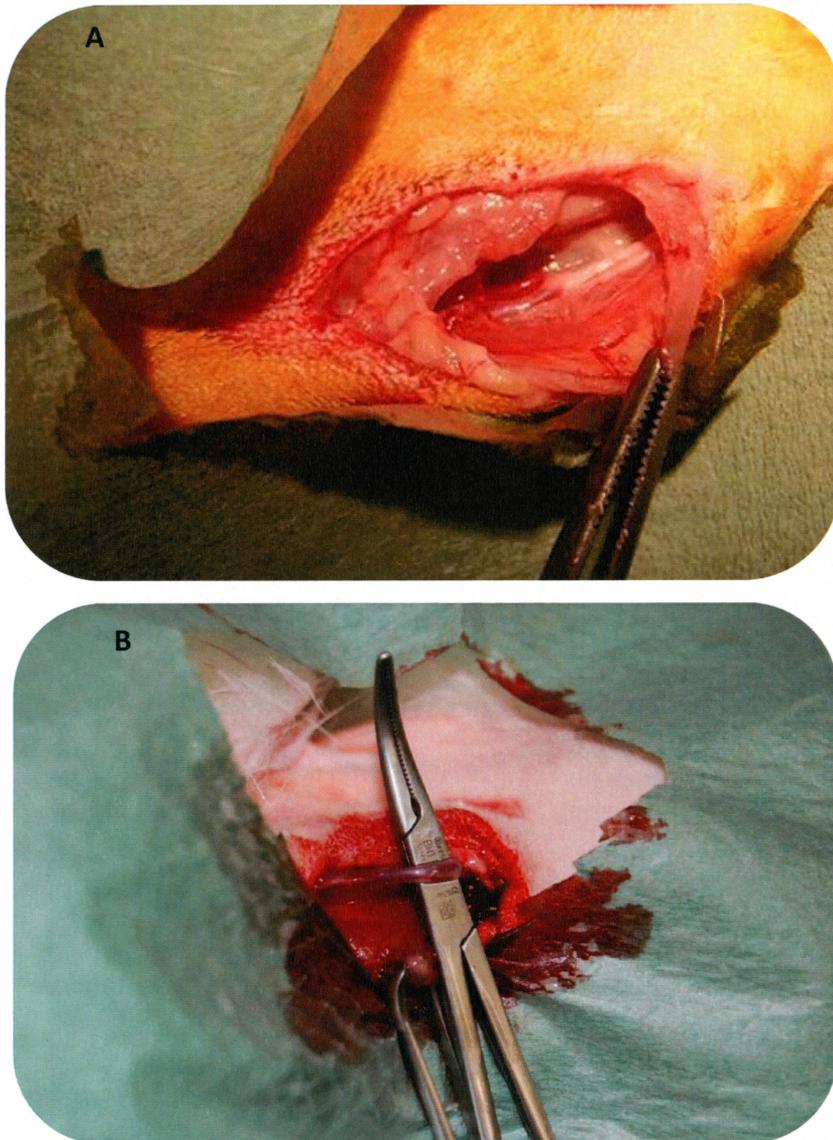


Figura IV-25: Vaina carotídea, observada tras incidir el músculo superficial del cuello y lateralizar la tráquea (A). Aspecto de la arteria carótida izquierda expuesta y preparada para su cateterización (B).

La cateterización arterial de la carótida se realizó siguiendo la técnica de Seldinger. En primer lugar, se puncionó la arteria con una aguja con fiador con cánula exterior de material biocompatible. La aparición de un pequeño volumen de sangre en el fiador asegura el éxito de la punción. A continuación se retiró el fiador, introduciendo la guía a través de la cánula (Figura IV-26) y comprobando su posición dentro de la arteria realizando una inyección de contraste bajo fluoroscopia. Una vez la guía da suficiente soporte, la cánula debe retirarse, oprimiendo con los dedos por encima y por debajo de la salida de la guía para evitar el sangrado por el punto de punción. En este momento solo la guía está dentro de la arteria. Por último, se colocó un introductor provisto de válvula antirreflujo que permitía un intercambio seguro de catéteres y guías sin forzar el punto de inserción arterial. El introductor llegaba hasta el cayado aórtico, y fue entonces cuando se introdujo de nuevo la guía orientándola apropiadamente hacia la aorta abdominal. Una vez allí, el flujo sanguíneo ayudó a avanzar la guía hasta la bifurcación aórtica, alcanzando la arteria ilíaca externa izquierda. Todo el procedimiento fue controlado mediante fluoroscopia (Figura IV-27 y IV-28).

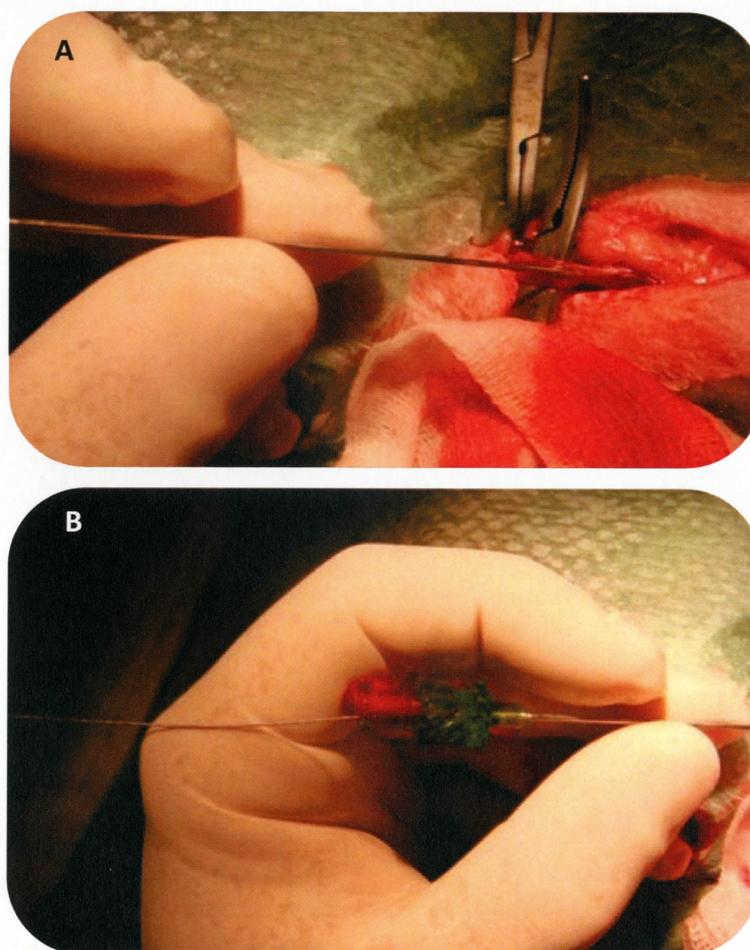


Figura IV-26: Colocación del catéter en la arteria carótida externa (A) e introducción de la guía en la arteria carótida (B).

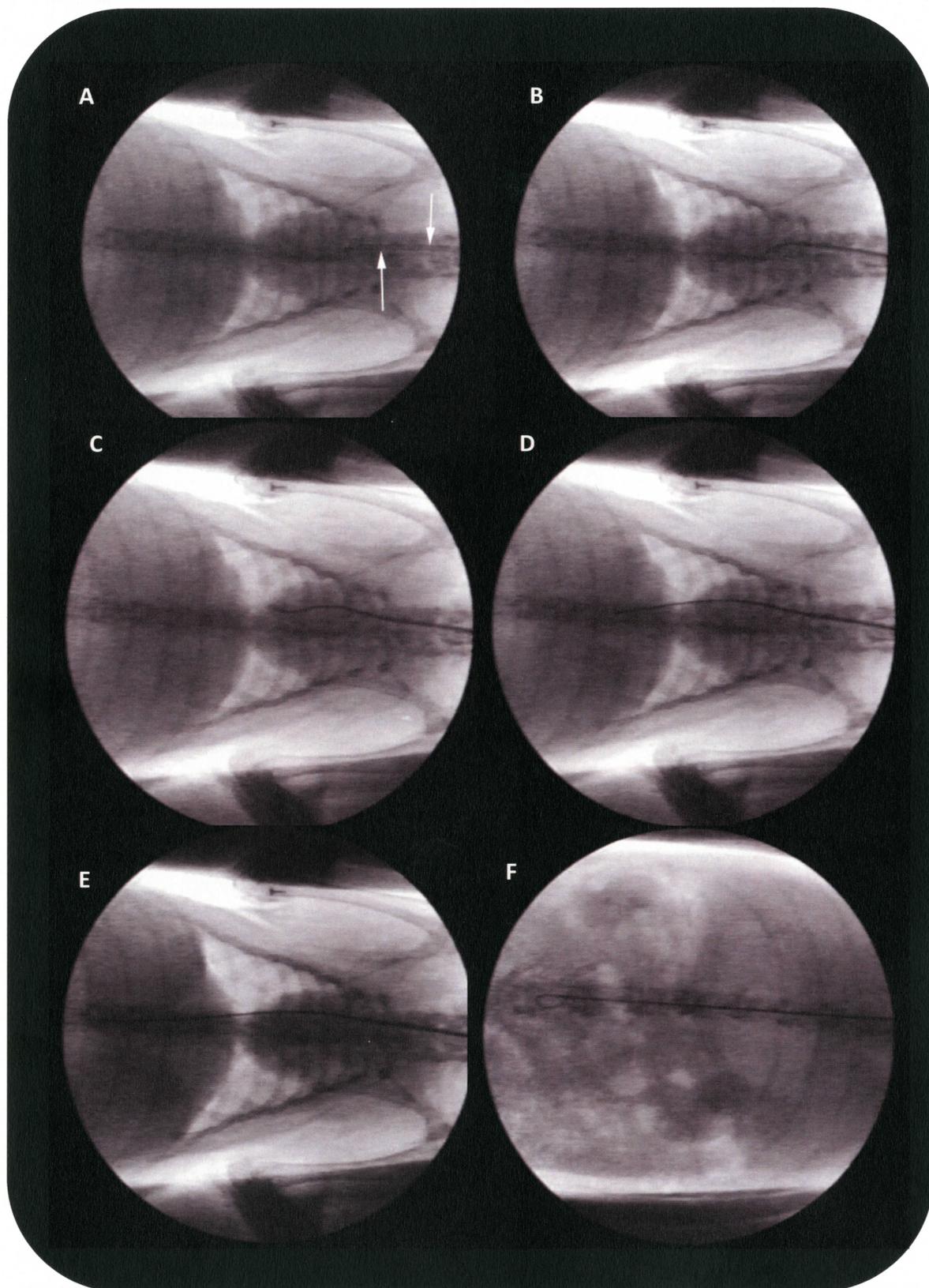


Figura IV-27: Secuencia fluoroscópica en la que se observa el extremo del introductor (flechas blancas) entrando por la arteria carótida (A), y la guía llegando al cayado aórtico (B) y avanzando a través de la aorta descendente (C, D, E, F).

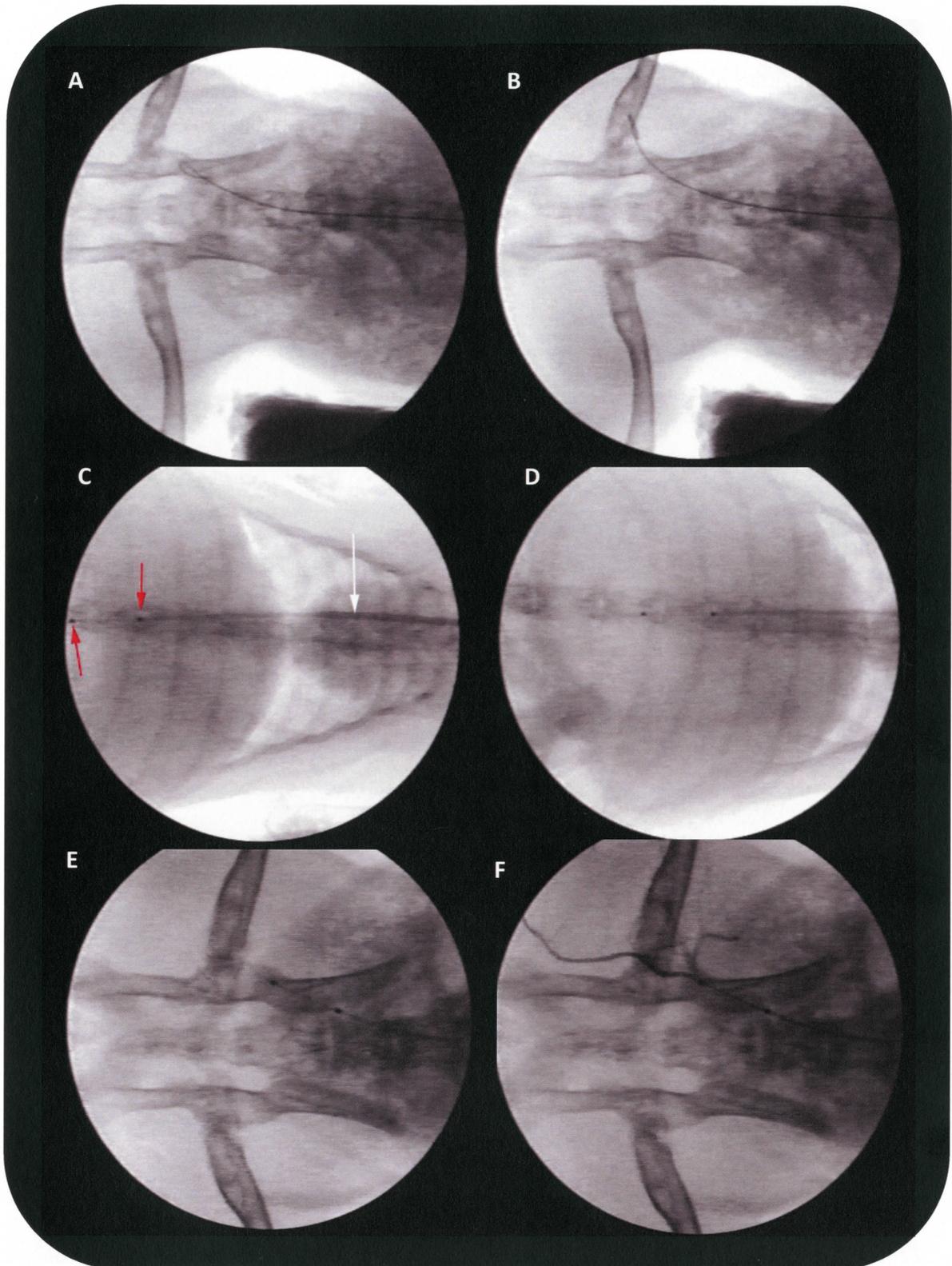


Figura IV-28: Secuencia fluoroscópica en la que se observa la guía alojada en la arteria iliaca izquierda (A y B), el catéter de balón avanzando por aorta descendente (C y D) y llegando a arteria iliaca izquierda (E), momento en el que se realiza una arteriografía (F). Las flechas rojas señalan el extremo del catéter y la flecha blanca señala el introductor.

2.3. ARTERIOGRAFÍA NO SELECTIVA DE LA BIFURCACIÓN AÓRTICA

Se realizaron arteriografías no selectivas bajo guía fluoroscópica para comprobar la permeabilidad del trayecto arterial antes de la angioplastia. En la figura IV-29 se describe la anatomía arteriográfica de la bifurcación aórtica y región pélvica en el conejo.

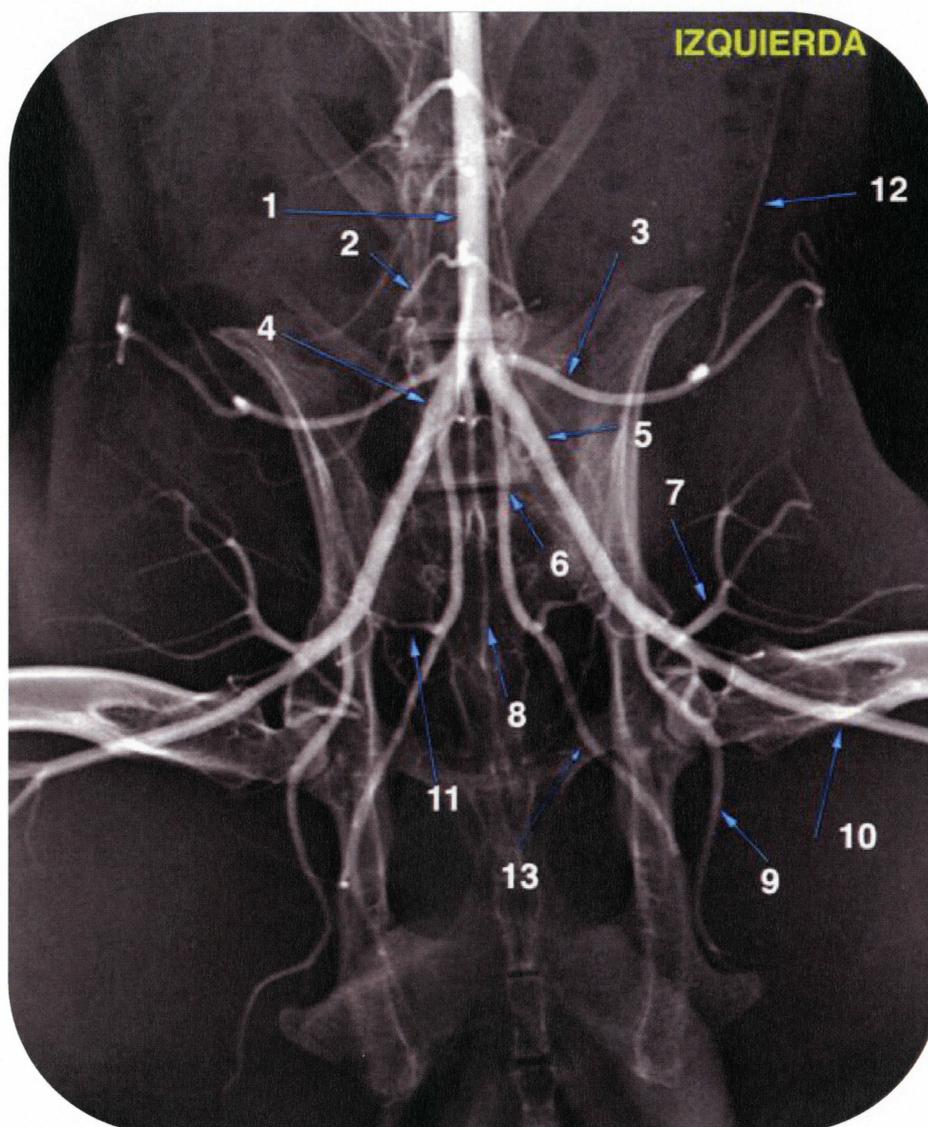


Figura IV-29: Anatomía arteriográfica de la bifurcación aórtica. 1: Aorta abdominal. 2: Dorsal lumbar. 3: Circunfleja iliaca profunda. 4: Iliaca común. 5: Iliaca externa. 6: Iliaca interna. 7: Femoral profunda. 8: Sacra media. 9: Circunfleja femoral medial. 10: Femoral. 11: Glútea caudal. 12: Rama craneal de la circunfleja iliaca profunda. 13: Pudenda.

Se han identificado 12 arterias derivadas directa o indirectamente de la aorta abdominal en las proyecciones radiográficas ventrodorsales de la pelvis del conejo. Próximas a la bifurcación aórtica pueden identificarse varias *arterias dorsales lumbares* que, de manera segmentaria y saliendo directamente de la aorta, siguen un trayecto dorsal y se dirigen hacia la columna vertebral lumbar. La *arteria sacra media*, considerada como la continuación de la aorta, va disminuyendo progresivamente su grosor hasta desaparecer a nivel de la 3ª vértebra sacra. Las *arterias circunflejas ilíacas profundas*, que se dirigen a irrigar los músculos anchos del abdomen, son las últimas ramas de la aorta antes de que ésta se divida en la bifurcación aórtica. La porción más caudal de la aorta abdominal se divide en 2 *arterias ilíacas comunes* a nivel del último espacio intervertebral lumbar L6-L7. Estas arterias ilíacas comunes son muy cortas, perdiendo enseguida su nombre al emitir las *arterias ilíacas externas e internas* de disposición lateral y medial respectivamente. La arteria ilíaca externa avanza en sentido caudal dispuesta medialmente al ala ilíaca en la cavidad pélvica hasta que, cranealmente al acetábulo del coxal, emite dos ramas. La primera de ellas, la *arteria circunfleja femoral medial* se dirige caudalmente situándose lateralmente al isquion. Más caudalmente, se emite la segunda rama procedente de la ilíaca externa, la *arteria femoral profunda*, que se dirige craneal y distalmente por el muslo. Una vez que la arteria ilíaca externa emite estas dos ramas principales, cambia su nombre y avanza por el aspecto medial y caudal del muslo como *arteria femoral*. Por su parte, la otra rama de la arteria ilíaca común, la *arteria ilíaca interna*, es emitida medialmente dirigiéndose en sentido caudal cerca de la línea media sacra, para después desplazarse ligeramente en sentido lateral al tiempo que emite la *arteria glútea caudal* que, de orientación ortogonal a la arteria ilíaca interna, se distribuye por el aspecto caudal de la musculatura glútea. Por último, la arteria ilíaca interna se continúa como *arteria pudenda* siguiendo un trayecto caudolateral hasta disminuir progresivamente de tamaño en el área del cuerpo isquiático.

2.4. DENUDACIÓN ENDOTELIAL DE LA ARTERIA ILÍACA IZQUIERDA

Una vez situada la guía en la arteria ilíaca izquierda, se introdujo el catéter de angioplastia sobre la guía, avanzándolo con cuidado hasta llegar a la arteria ilíaca izquierda. Una vez alojado el balón en el interior de la arteria, y realizada la dilatación del balón con el manómetro de precisión, se movió con movimientos cortos y firmes hacia delante y hacia atrás, tres veces durante tres o cuatro segundos, provocando la denudación endotelial deseada. Por último, se realizó el desinflado del balón de angioplastia para extraer el catéter

balón con total seguridad. El avance, la colocación, la dilatación, el movimiento y el desinflado del balón, se realizaron mediante control fluoroscópico (Figura IV-30).

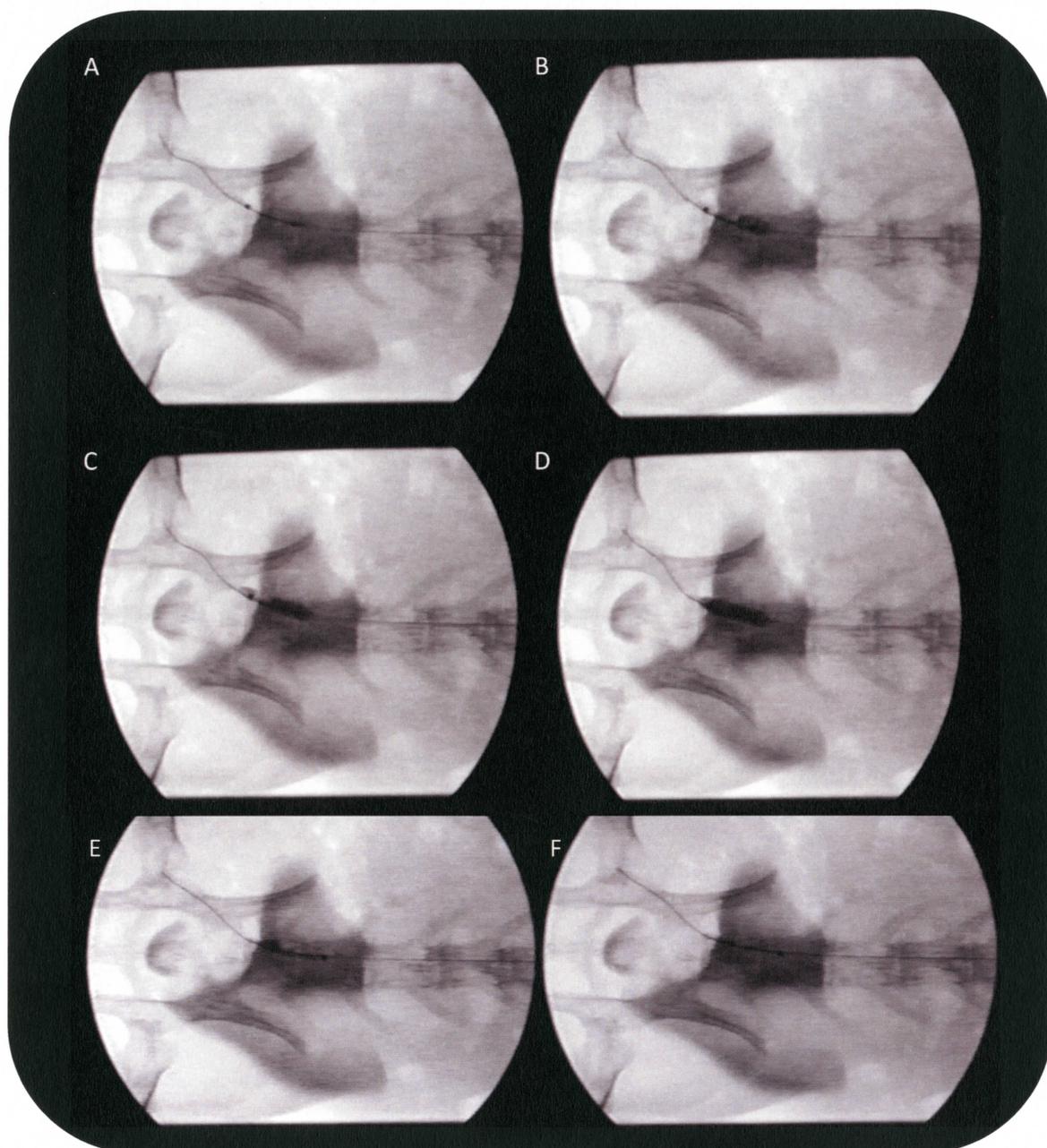


Figura IV-30: Secuencia fluoroscópica durante la colocación del catéter en la arteria iliaca izquierda (A), el inflado del balón (B, C y D) y desinflado del mismo (E y F).

A continuación se muestra una imagen fluoroscópica post-denudación en la que puede observarse la diferencia de diámetros entre las arterias ilíacas izquierda y derecha (Figura IV-31).

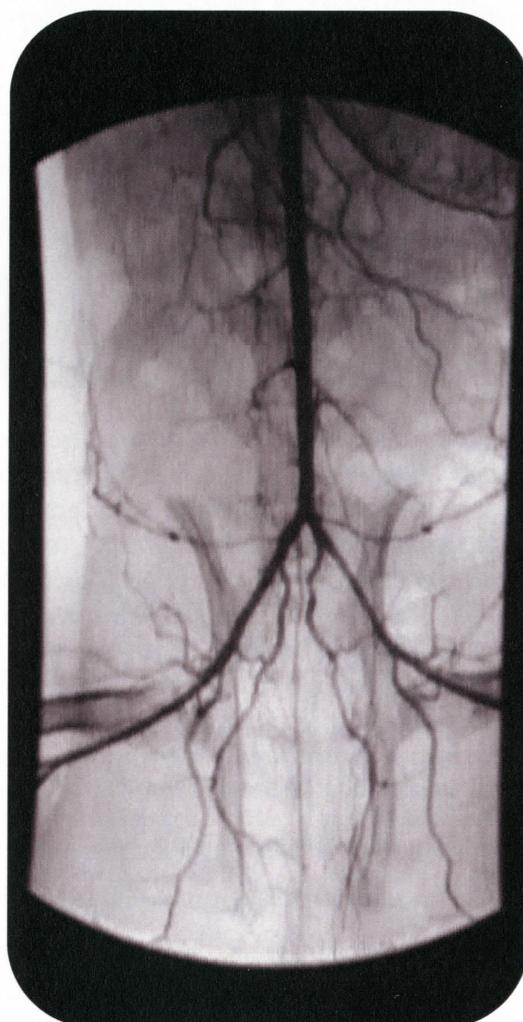


Figura IV-31: Imagen fluoroscópica de la efectividad de la denudación mediante arteriografía no selectiva en la bifurcación aórtica.

Para confirmar la efectividad de la denudación, una vez extraído el catéter de balón, se administró contraste intravenoso por el introductor y se realizó una arteriografía pélvica que evaluaba la estenosis de la arteria ilíaca izquierda y descartaba la aparición de complicaciones mayores (rotura de la arteria o trombosis) que invalidarían el caso para estudios posteriores. Sobre la arteriografía se midieron los diámetros de la arteria aorta (un centímetro craneal a la bifurcación) y de las ilíacas izquierda y derecha (un centímetro caudal a la bifurcación) (Figura IV-32).

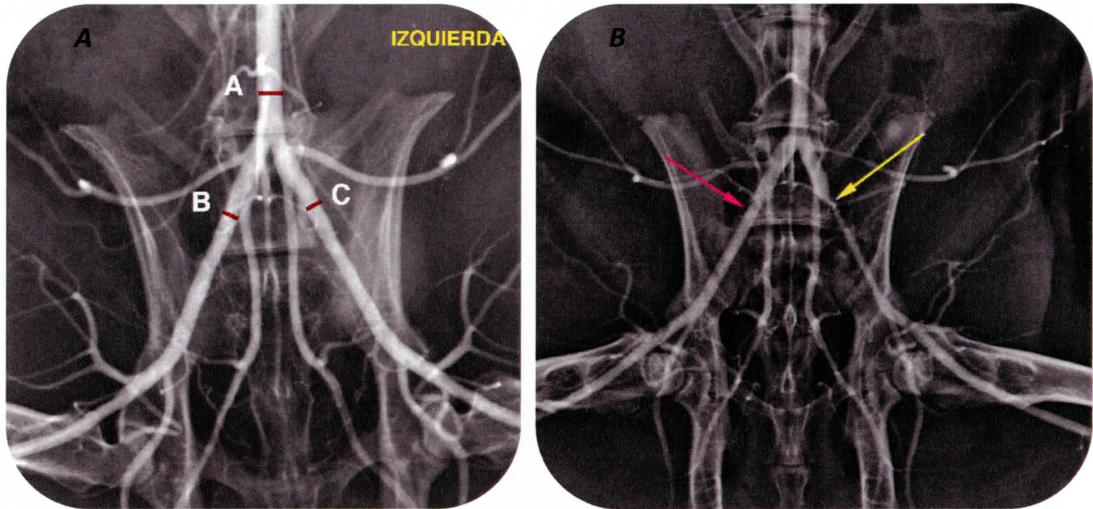


Figura IV-32: Arteriografía normal de la bifurcación aórtica en el conejo (A). Se indica la medición de los distintos diámetros arteriales, que se llevó a cabo tras el procedimiento de denudación de la ilíaca externa izquierda (A: Diámetro arteria aorta, B: Diámetro arteria ilíaca externa derecha, C: Diámetro arteria ilíaca externa izquierda). Arteriografía tras la denudación (B). La flecha roja señala la arteria ilíaca derecha y la flecha amarilla la izquierda. Se puede observar la estenosis post-denudación, confirmando así la correcta realización de la lesión arterial con el catéter de balón.

La comparación de los resultados obtenidos de las mediciones de los diámetros arteriales entre los Grupos A y B se muestra en la Tabla IV-13. Como puede observarse, no existen diferencias significativas entre los dos catéteres utilizados, aunque sí hay diferencias ($p < 0.001$) entre las arterias ilíacas izquierda y derecha en ambos grupos.

Tabla IV-13: Diámetros arteriales (mm) medidos sobre la arteriografía y expresados como media \pm desviación típica, de las arterias aorta e ilíacas derecha e izquierda inmediatamente después de la denudación endotelial realizada en la arteria ilíaca izquierda.

	DIÁMETRO AORTA (mm)	DIÁMETRO ILÍACA DERECHA (mm)	DIÁMETRO ILÍACA IZQUIERDA (mm)	p^*
GRUPO A (n=20)	2.79 \pm 0.63	2.19 \pm 0.44	1.17 \pm 0.29	<0.001
GRUPO B (n=10)	3.07 \pm 0.81	2.43 \pm 0.73	1.39 \pm 0.89	<0.001
p	0.30	0.26	0.46	

*: p entre el diámetro de la ilíaca derecha y la izquierda.

GRUPO A: balón de 2.5mm, inflado a 12 atm; GRUPO B: balón de 3 mm, inflado a 6 atm.

2.5. INCIDENCIAS Y MORTALIDAD

Para la técnica de la denudación, los 32 animales se dividieron en dos grupos, con el objetivo de poder determinar cuál de los balones era el más adecuado para la realización de la técnica. En el primer grupo, llamado grupo A (n=20), se utilizó un balón de 2,5 mm de diámetro de inflado máximo, a una presión de 12 atmósferas. En el segundo grupo, llamado grupo B (n=12), se utilizó un balón de 3 mm de diámetro de inflado máximo, a una presión de 6 atmósferas.

Con respecto al procedimiento de la denudación, entre los 32 animales objeto del estudio se registraron un total de 10 incidencias (31,25 %) *letales y no letales*.

En la Tabla IV-14 puede verse el registro de *incidencias no letales* que se observaron durante la denudación en ocho casos distintos, las cuales no impidieron la realización del procedimiento de manera correcta (Figuras IV-33 y IV-34).

Tabla IV-14: *Incidencias no letales sucedidas durante la denudación arterial en ocho animales*

NÚMERO DE CASOS	INCIDENCIA
1	Perforación traqueal durante la inducción anestésica (balón 3mm/6atm)
3	Espasmólisis con obstrucción completa por trombosis de la arteria ilíaca externa e ilíaca común tras el inflado de balón (Figuras IV-30 y IV-31) (balón 2,5mm/12atm)
3	Hemorragia carotídea moderada durante la cateterización de la misma (balón 2,5mm/12atm)
1	Acceso quirúrgico por carótida derecha (balón 2,5mm/12atm)

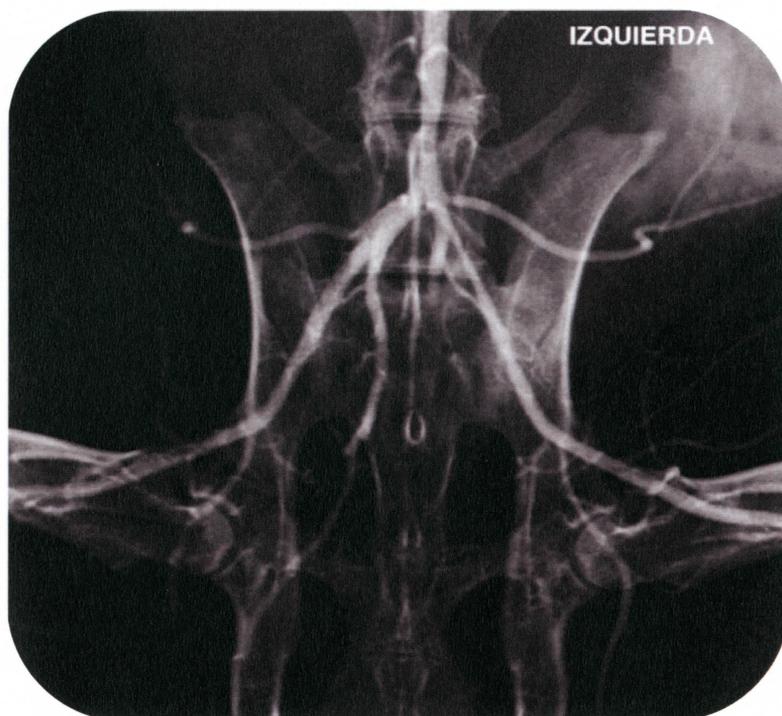


Figura IV-33: Incidencia no letal: Obstrucción de la arteria ilíaca interna izquierda tras la denudación, que no puede verse en la imagen. Obsérvese la reducción de diámetro de la arteria ilíaca externa del mismo lado debido al efecto del espasmo arterial (balón 2,5mm/12atm).

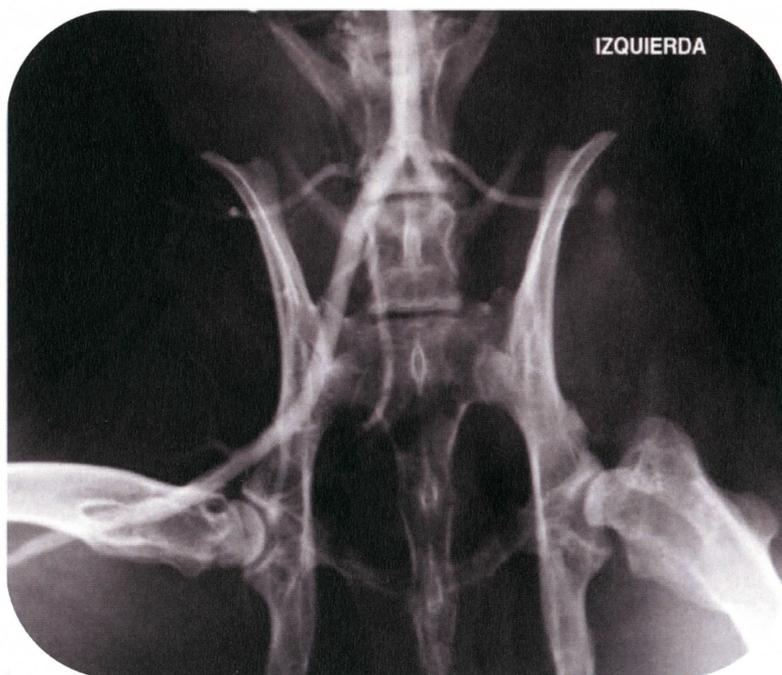


Figura IV-34: Incidencia no letal: Obstrucción de la arteria ilíaca común izquierda tras la denudación. Obsérvese la ausencia de visualización de ambas arterias ilíacas en el lado izquierdo (balón 2,5mm/12atm).

En el Grupo A (Balón de 2.5 mm, inflado a 12 atm), no se observaron incidencias letales, anestesiándose 14 animales con isofluorano (70%) y 6 animales con propofol en infusión continua (30%).

En el Grupo B (balón de 3 mm, inflado a 6 atm), 7 animales se anestesiaron con isofluorano (58,33%) y 5 conejos con propofol en infusión continua (41,67%). De entre los siete animales anestesiados con isofluorano, se observaron dos *incidencias letales*, una por la rotura del balón y consecuentemente de la arteria ilíaca izquierda (Figura IV-35) y otro por perforación iatrogénica de la aorta descendente. En el resto de los conejos no se observaron incidencias.

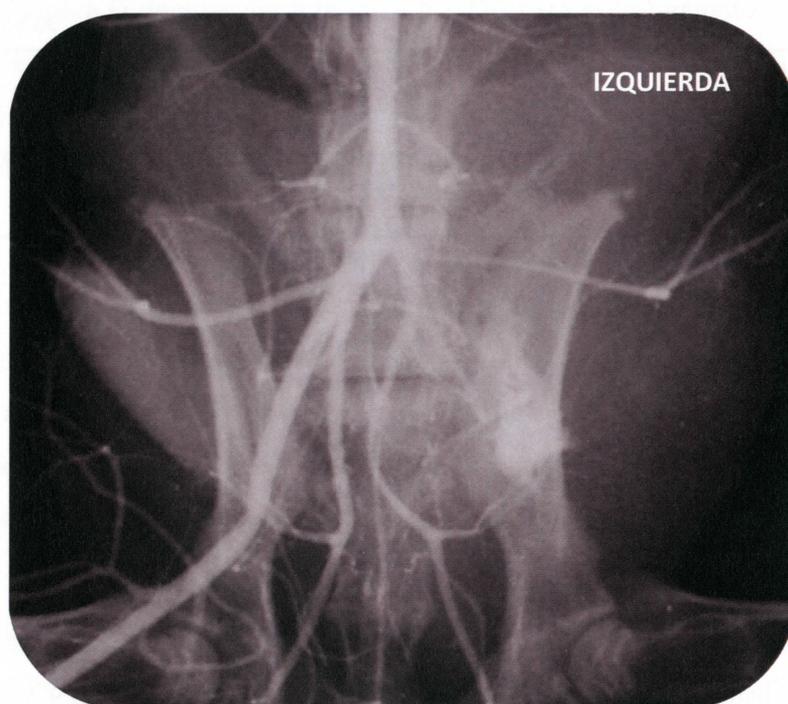


Figura IV-35: Incidencia letal: Rotura de la arteria ilíaca izquierda tras la denudación. Obsérvese la acumulación del contraste fuera del árbol arterial (balón 3mm/6atm).

En las Tablas IV-15 y IV-16 se muestran las causas y el porcentaje de mortalidad en los conejos distribuidos según el momento de la baja y el tipo de catéter utilizado.

Tabla IV-15: Porcentaje de mortalidad en conejos tras denudación de la arteria ilíaca izquierda según el momento en que ocurrió la baja (n inicial= 36; n post-denudación= 25).

Momento de la baja	Número de animales afectados	% Mortalidad
Sedación	0	0
Inducción anestésico	4	11.1
Mantenimiento anestésico	0	0
Mala técnica en denudación	2	5.5
Recuperación anestésica en postoperatorio	5	13.9
Total	11	30.5

Tabla IV-16: Porcentaje de mortalidad y momento en el que se producen las bajas de los conejos distribuidos según tipo de catéter utilizado.

Diámetro de catéter (mms) / presión de balón (atm)	n inicial	Bajas por rotura arterial	Bajas durante la recuperación anestésica en postoperatorio	n post denudación	Mortalidad (%)
2.5 / 12	20	0	3	17	15 %
3 / 6	12	2	2	8	33.3 %
Total	32	2	5	25	21.9 %

Se observa como los momentos más críticos del procedimiento son la inducción y la recuperación anestésica, fases en las que se produce un 11.1 y un 13.9 % de mortalidad respectivamente. Además, se observa una mayor mortalidad total con la utilización del catéter de 3 mm que con el de 2.5 mm.

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EFICACIA DE DOS TÉCNICAS DE RADIOLOGÍA INTERVENCIONISTA EN EL TRATAMIENTO DE LA ESTENOSIS ARTERIAL INDUCIDA EN EL CONEJO: CRIOPLASTIA vs. ANGIOPLASTIA CONVENCIONAL

En el apartado anterior se ha puesto a punto la técnica de la denudación arterial de la arteria ilíaca externa izquierda en el conejo, mediante abordaje transcarotídeo. Considerando los resultados obtenidos, se ha elegido el catéter de balón de 2,5 milímetros de diámetro y 12 atmósferas para el desarrollo del siguiente experimento, en el cual se comparan dos técnicas endovasculares en el tratamiento de la estenosis arterial en conejos hiperlipídicos.

La mortalidad fue elevada, teniendo bajas tanto en los procedimientos de angioplastia realizados (día 1 para la denudación arterial, y día 120 para el tratamiento) como durante la estabulación de los animales. Así, el número de animales fue de 78 en el día 1 del estudio, 41 animales en el día 60 de revisión, 32 animales en el día 120 del tratamiento, y 26 animales concluyeron el estudio el día 150. De estos 26 animales, 12 eran del grupo Control, 6 animales del grupo ATP y 8 animales del grupo Crioplastia.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación, divididos en cuatro apartados. En primer lugar, los análisis hematológicos y bioquímicos que evalúan el bienestar de los animales y el efecto de la dieta administrada. A continuación, los resultados obtenidos de las ecografías arteriales realizadas para valorar cambios parietales y de flujo en la arteria ilíaca izquierda. En tercer lugar se muestran los resultados de las ecografías de la arteria ilíaca derecha y las arteriografías realizadas el día 120 del estudio, con el objetivo de valorar el efecto de la denudación y la dieta a largo plazo. Finalmente, los resultados del examen histopatológico de los hígados y las arterias de cada uno de los grupos de estudio.

3.1. ANÁLISIS SANGUÍNEOS

A continuación, se representan los valores de hematología y bioquímica sanguínea (Tablas IV-17 y IV-18) medidos a lo largo del estudio, con su rango de referencia y los valores obtenidos expresados en media \pm desviación típica.

Tabla IV-17: Evolución de los valores hematológicos en conejos a lo largo del ensayo terapéutico. La administración de la dieta colestero génica tiene lugar entre los días 1 a 60 de la experiencia, pasando a ser sustituida por un pienso estándar entre los días 60 a 150. $n=78$ (día 1), $n=41$ (día60), $n=32$ (día 120) y $n=26$ (día 150).

PARÁMETRO	RANGO DE REFERENCIA*	DÍA 1	DÍA 60	DÍA 120	DÍA 150
GB ($\times 10^9/l$)	4.4-9.2	4.68 \pm 1.61	8.89 \pm 2.17	6.98 \pm 2.96	6.94 \pm 2.62
GR ($\times 10^{12}/l$)	5,0-7.11	5.53 \pm 0.61	4,37 \pm 0,75	5.19 \pm 0.88	5,92 \pm 0.82
HB (g/dl)	9.5-16.3	12.37 \pm 1.26	10,51 \pm 1.4	10.85 \pm 2.01	11.77 \pm 1.74
HTO (%)	34-45	36.71 \pm 3.92	29,24 \pm 4.42	34.32 \pm 5.61	36.52 \pm 4.01
VCM (fl)	59.6-74.2	66.41 \pm 4.85	67.45 \pm 4.8	66.69 \pm 8.15	63.63 \pm 5.82
HCM (pg)	19.5-24.7	22.42 \pm 1.12	24,37 \pm 2.88	21.17 \pm 3.68	20.07 \pm 2.54
CHCM (g/dl)	30.1-37	34.14 \pm 1.24	36.1 \pm 2.7	31.43 \pm 2,92	31.45 \pm 1,81
PLT ($\times 10^9/l$)	240-510	357.64 \pm 77.35	331.83 \pm 85.82	424.21 \pm 104.52	403.4 \pm 137.42

*El mínimo y el máximo valor encontrado en el día 1 del experimento 1.

GB: Recuento de leucocitos; GR: Recuento de eritrocitos; HB: Concentración de hemoglobina; HTO: Valor hematocrito; VCM: Volumen corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CHCM: Concentración corpuscular media de hemoglobina; PLT: Recuento de plaquetas.

De estos datos hematológicos hay que destacar la anemia que se produce con la dieta hipercolesterogénica (día 60), que vuelve a normalizarse con la finalización de la misma. También se observa leucocitosis en el mismo momento (día 60), aunque los leucocitos no sobrepasan los valores de referencia en ningún momento.

Tabla IV-18: Evolución de los valores bioquímicos en conejos a lo largo del ensayo terapéutico. La administración de la dieta colesterogénica tiene lugar entre los días 1 a 60 de la experiencia, pasando a ser sustituida por un pienso estándar entre los días 60 a 150. n=78 (día 1), n=41 (día60), n=32 (día 120) y n=26 (día 150).

PARÁMETRO	RANGO DE REFERENCIA*	DÍA 1	DÍA 60	DÍA 120	DÍA 150
ALB (g/dl)	2.55-4.7	2.571±0.77	4.43±1.08	2.86±0.6	2.57±1.02
ALP (UI/l)	98-699	195.68±55.76	105.08±43.15	71.41±28.98	78.84±23.45
BILT (mg/dl)	0.0-0.14	0.02±0.01	0,19±0.37	0,02±0.02	0,02±0.01
UREA (mg/dl)	21.5-47.8	34.23±10.29	35.04±6.53	51.07±10.19	47.51±14.36
CREA (mg/dl)	0.5-1.9	1.21±0.24	1.93±1.05	1,65±0.38	1,43±0.47
AST (UI/l)	6-52	23.64±6.44	49.95±20.37	19.53±10.05	18.23±9.95
ALT (UI/l)	5-45	33.75±22.7	59.74±27.87	18.15±10.69	18.19±9.92
PPT (g/dl)	4.2-7.1	4.30±1.38	11.01±4.78	6,27±1.51	4.8±1.37
LDH (UI/l)	46-625	256.15±98.11	352.5±173.67	280.95±138.95	431.81±171.62
GLUC (mg/dl)	86-147	166.58±72.11	144.64±41.34	190.56±52.4	156.15±50.91
COL (mg/dl)	28-150	40.82±16.64	1616.25±341.96	95.2±71.64	35.38±16.33
TRIG (mg/dl)	36-147	140.97±88.26	141.28±108.05	204.33±128.71	68.10±12.42
HDL-c (mg/dl)	9-106	21.87±9.67	45.36±13.31	15.79±3.72	16.93±5.79
LDL-c (mg/dl)	9-95	28.52±16.39	68.61±16.34	92.61±58.25	20.55±9.58

*El mínimo y el máximo valor encontrado en el día 1.

ALB: Albúmina; ALP: Fosfatasa alcalina; BILT: Bilirrubina total; CREA: Creatinina; AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; PPT: Proteínas plasmáticas totales; LDH: Lactato deshidrogenasa; GLUC: Glucosa; COL: Colesterol; TRIG: Triglicéridos; HDL-c: Lipoproteínas transportadoras de colesterol de alta densidad; LDL-c: Lipoproteínas transportadoras de colesterol de baja densidad.

En cuanto al análisis bioquímico se refiere, hay que destacar el aumento de los valores de colesterol, de sus proteínas transportadoras HDL-c y LDL-c, de las transaminasas hepáticas AST y ALT y de la bilirrubina total en los 60 días de ingesta de la dieta ateromatosa. Asimismo, se observa un aumento de la proteinemia, de la albuminemia y de la creatinemia tras la administración de la dieta. Todos estos parámetros mencionados se normalizan al cese de la dieta (120 y 150 días). Sin embargo, los valores de los triglicéridos, la urea y la glucosa, que habían permanecido normales durante 60 días de ingesta de dieta hiperlipídica, se elevan *a posteriori* a los 120 o incluso 150 días (caso de la glucosa) del comienzo del experimento, cuando ya se ha cesado la ingesta de esa dieta.

3.2. ECOGRAFÍA VASCULAR

A lo largo del estudio se han realizado 4 ecografías vasculares de la arteria ilíaca izquierda a cada animal, en los días 1 (n=78), 60 (n=41), 120 (n=32) y 150 (n=26) del estudio, siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Material y Métodos.

En total se han realizado 177 ecografías vasculares de la arteria ilíaca izquierda en el conejo, en las que se ha valorado la permeabilidad de la arteria mediante el modo Doppler color, y se ha calculado sus dimensiones y evaluado su comportamiento hemodinámico mediante modo B y Doppler respectivamente.

La tabla IV-19 muestra los valores medios de los diámetros externos y luces vasculares, así como la caracterización del flujo en la arteria ilíaca externa izquierda a lo largo del estudio en los días 1, 60, 120 y 150 (en este último momento sólo se muestran los resultados del grupo Control).

Tabla IV-19: Evolución ecográfica de las medidas de diámetro, luz vascular, pared arterial y caracterización del flujo de la arteria ilíaca izquierda en conejos antes del tratamiento (Día 1: n=78; Día 60: n=41; Día 120: n=32) y en el día 150 (grupo Control: n=12). Valores expresados en media \pm desviación típica.

	DÍA 1	DÍA 60	DÍA 120	DÍA 150	p
DIÁMETRO TOTAL (mm)	3.38 \pm 0.34 ^a	3.44 \pm 0.35 ^a	3.79 \pm 0.51 ^b	3.83 \pm 0.57 ^b	<0.01
LUZ ARTERIAL (mm)	2.23 \pm 0.29 ^{a,c}	2.04 \pm 0.35 ^b	2.11 \pm 0.44 ^{b,c}	2.14 \pm 0.46 ^{b,c}	0.14
PARED ARTERIAL (mm)	0.54 \pm 0.14 ^a	0.7 \pm 0.14 ^b	0.84 \pm 0.15 ^c	0.85 \pm 0.10 ^c	<0.01
PVS (cm/s)	0.30 \pm 0.09 ^a	0.29 \pm 0.10 ^a	0.32 \pm 0.12 ^a	0.23 \pm 0.07 ^a	0.07
VDT (cm/s)	0.06 \pm 0.04 ^a	0.07 \pm 0.06 ^a	0.07 \pm 0.05 ^a	0.02 \pm 0.02 ^b	0.06
IR	0.76 \pm 0.12 ^a	0.74 \pm 0.19 ^a	0.78 \pm 0.12 ^a	0.91 \pm 0.12 ^b	0.01

PVS: pico de velocidad sistólica; VDT: velocidad diastólica terminal; IR: índice de resistencia
Superíndices diferentes implican diferencias significativas, $p < 0.05$; Análisis post-hoc de Tukey y Games Howell.

La tabla IV-20 muestra los diámetros, la luz arterial y el grosor de la pared de la arteria ilíaca externa izquierda así como la caracterización de su flujo 30 días después del tratamiento, esto es el día 150 del estudio.

Tabla IV-20: Dimensiones vasculares y caracterización del flujo de la arteria ilíaca externa izquierda expresados en media \pm desviación típica después del tratamiento endovascular (día 150) de la estenosis en los tres grupos de conejos, siendo $n=6$ el grupo ATP, $n=8$ el grupo Crioplastia, y $n=12$ el grupo Control.

	CONTROL	ATP	CRIOPLASTIA	<i>p</i>
DIÁMETRO TOTAL (mm)	3.83 \pm 0.57 ^a	3.73 \pm 0.29 ^a	3.62 \pm 0.27 ^a	0.56
LUZ ARTERIAL (mm)	2.14 \pm 0.46 ^a	2.11 \pm 0.44 ^{a,b}	1.7 \pm 0.3 ^b	0.04
PARED ARTERIAL (mm)	0.85 \pm 0.10 ^a	0.81 \pm 0.09 ^a	0.96 \pm 0.11 ^b	0.03
PVS (cm/s)	0.23 \pm 0.07 ^a	0.23 \pm 0.07 ^a	0.28 \pm 0.08 ^a	0.29
VDT (cm/s)	0.02 \pm 0.02 ^a	0.03 \pm 0.04 ^{a,b}	0.05 \pm 0.03 ^b	0.04
IR	0.91 \pm 0.12 ^a	0.91 \pm 0.12 ^a	0.80 \pm 0.14 ^a	0.24

PVS: pico de velocidad sistólica; VDT: velocidad diastólica terminal; IR: índice de resistencia. Superíndices diferentes implican diferencias significativas, $p < 0.05$.

Al realizar un análisis ANOVA, y un post hoc con el test de Tukey y Games-Howell, se encuentran diferencias significativas en la luz de la arteria ilíaca izquierda, en la que existen diferencias entre el grupo Crioplastia y el grupo Control, no habiendo diferencias significativas entre el grupo ATP y el Crioplastia. También se observan diferencias significativas en el grosor de la pared, entre el grupo Crioplastia y los grupos Control y ATP, así como en el VDT de la ilíaca izquierda, entre el grupo crioplastia y el grupo control.

A continuación se muestran a modo de ejemplo, tres imágenes en las que se observan anomalías tanto de la pared como de la permeabilidad vascular (Figuras IV-36, IV-37 y IV-38).

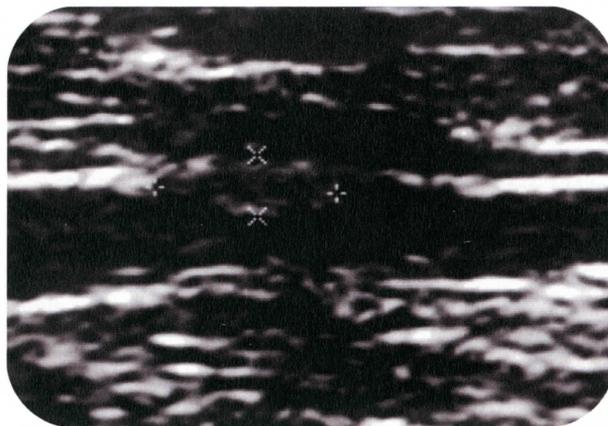


Figura IV-36: Imagen ecográfica en modo B de una sección sagital de la arteria aorta abdominal en la que se observa un engrosamiento parietal focal (entre las x) en el día 150.

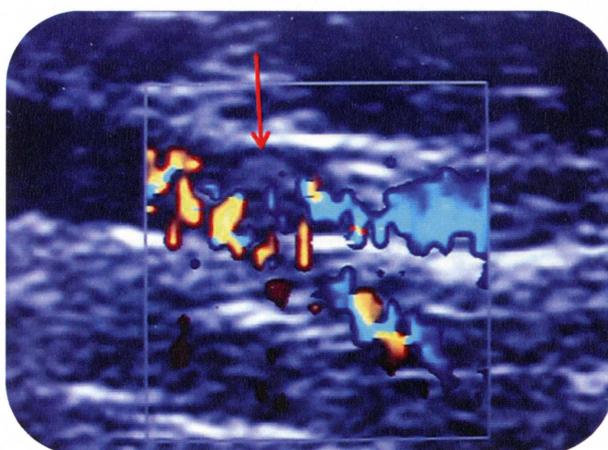


Figura IV-37: Imagen ecográfica en modo Doppler color de la bifurcación aórtica en sección sagital en la que se observa un engrosamiento parietal focal de la pared arterial (flecha) con la correspondiente disminución de la permeabilidad vascular 60 días post denudación endotelial y administración de dieta hiperlipídica.

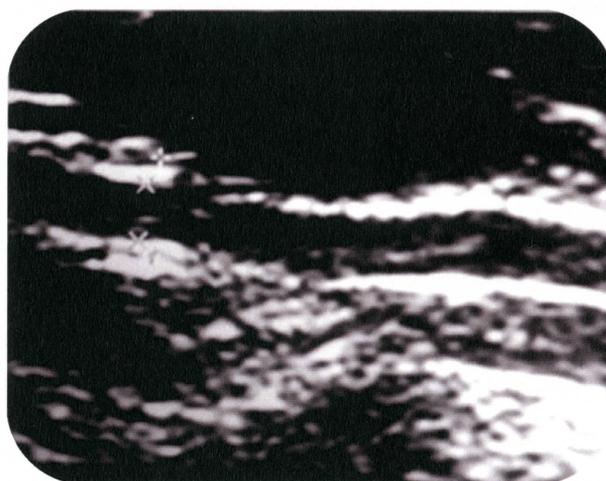


Figura IV-38: Imagen ecográfica en modo B de la arteria ilíaca externa izquierda en sección sagital en la que se observa un engrosamiento focal de la pared (entre las x) con un trayecto irregular 60 días post denudación endotelial y administración de dieta hiperlipídica.

3.3. CONTROL POR IMAGEN A LOS 120 DÍAS

A continuación se muestran los resultados obtenidos del examen ecográfico de la arteria ilíaca derecha e izquierda en el día 120 (Tabla IV-21). Nuestro objetivo fue tener un grupo control del modelo experimental: la arteria ilíaca derecha, en la que se valora únicamente el efecto de la dieta, y la ilíaca izquierda, en la que se valora el efecto de la dieta junto al efecto de la denudación endotelial.

Tabla IV-21: Medidas ecográficas de diámetro, luz vascular y pared de las arterias ilíacas en el día 120 (n=32), expresadas en media±desviación típica.

	ILÍACA DERECHA	ILÍACA IZQUIERDA
DIÁMETRO TOTAL (mm)	3.8±0.46 ^a	3.79±0.51 ^a
LUZ ARTERIAL (mm)	2.31±0.47 ^a	2.11±0.44 ^a
PARED ARTERIAL (mm)	0.75±0.12 ^a	0.84±0.15 ^b

Superíndices diferentes implican diferencias significativas, p<0.05.

Ilíaca derecha: dieta hiperlipídica; Ilíaca izquierda: dieta hiperlipídica + denudación endotelial

De la misma manera, se realizaron angiografías previas al tratamiento, con el mismo objetivo: considerar la arteria ilíaca derecha no denudada como control negativo de estenosis luminal frente a la izquierda. Una vez realizadas las arteriografías se midieron sobre las mismas los diámetros de ambas arterias ilíacas, y se calculó el porcentaje de estenosis de la arteria denudada izquierda (Figura IV-39). Los resultados se muestran en la tabla IV-22.

Tabla IV-22: Medidas arteriográficas de la luz vascular en ambas arterias ilíacas externas en el día 120 (n=32), expresadas en media±desviación típica.

LUZ ILÍACA DERECHA (mm)	LUZ ILÍACA IZQUIERDA (mm)	% ESTENOSIS LUMINAL EN ILÍACA IZQUIERDA
2,45±0,2 ^a	2,07±0,2 ^b	15,5

a y b son significativamente diferentes con p<0,01.

Ilíaca derecha: dieta hiperlipídica; Ilíaca izquierda: dieta hiperlipídica + denudación endotelial

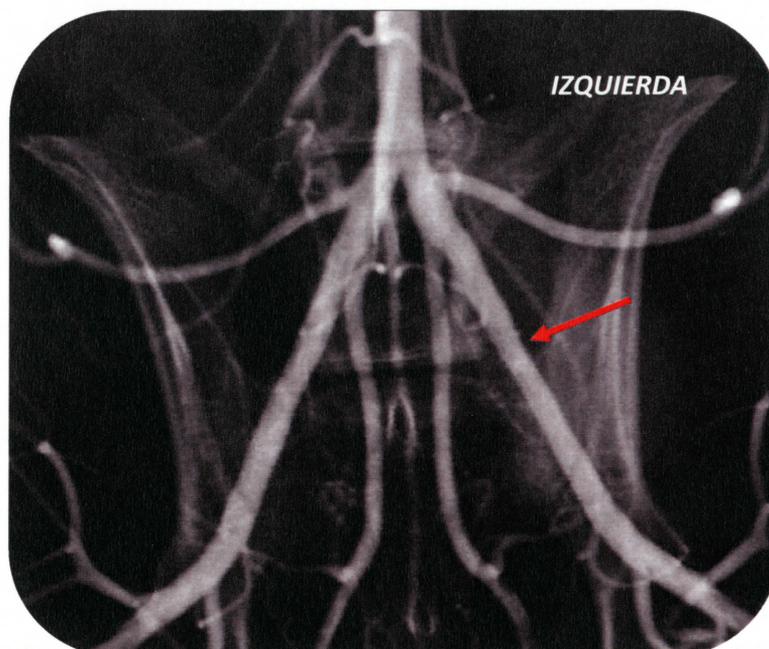


Figura IV-39: Arteriografía realizada el día 120, tras realizar la denudación de la arteria iliaca izquierda y someter a los animales a dieta colesterogénica durante los 60 días posteriores. Obsérvese la irregularidad del contorno luminal y el defecto de llenado del contraste intravenoso en la arteria iliaca izquierda (flecha).

Una vez realizada la arteriografía, se procedía al tratamiento endovascular, con uno u otro catéter, según el grupo del que se tratara. Se realizaron arteriografías post-angioplastia para valorar el vasoespasmio y confirmar que los procedimientos se realizaron con éxito. Los animales se mantuvieron 5 días con la medicación descrita en material y métodos.

3.4. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA LESIÓN ATEROMATOSA ARTERIAL

Tras el sacrificio de los animales y la necropsia de los mismos 30 días después del tratamiento endovascular, se procedió a la extracción de las arterias para su procesado histológico. Se tomaron tres secciones transversales de las arterias ilíacas izquierda y derecha, separadas 0,5 centímetros entre sí.

Las muestras arteriales se clasificaron según el grado de lesión de I a VIII, según la clasificación de Stary (punto 2 de la introducción), atendiendo a los criterios morfológicos descritos en la tabla III-2 del Material y Métodos. A su vez, éstas se agruparon en tres grupos,

lesiones *tempranas* (grado I, II, III), lesiones *avanzadas* (grado IV y V) y lesiones *complicadas* (VI, VII y VIII).

En este estudio hemos encontrado todos los tipos lesionales referenciados en la clasificación con presencia muchas veces de lesiones mixtas en distintas localizaciones arteriales del mismo animal.

Lesiones tempranas

Las células musculares lisas (CML) pierden su polaridad con el eje perpendicular de la capa media y forman columnas perpendiculares al eje de la misma. El endotelio está morfológicamente intacto y las superficies endoteliales limpias y sin trombos (Figura IV-40). También se observan lesiones en las que existe una migración de CML a la íntima arterial, provocándose en ésta un engrosamiento mioíntimal focal de leve a moderado (Figura IV-41). En otras ocasiones vemos un depósito de pequeñas colecciones de células espumosas en la íntima arterial, con alguna CML intercalada entre éstas (Figura IV-42). Existen lesiones tempranas más evolucionadas que muestran un mayor depósito de lípidos intra y extracelulares en la íntima arterial, así como desdoblamiento de la membrana elástica interna (MEI) y cúmulo variable de lípidos en la capa media (Figura IV-43). Los monocitos y células espumosas están presentes en un número muy bajo, y los linfocitos B se observaron raramente.

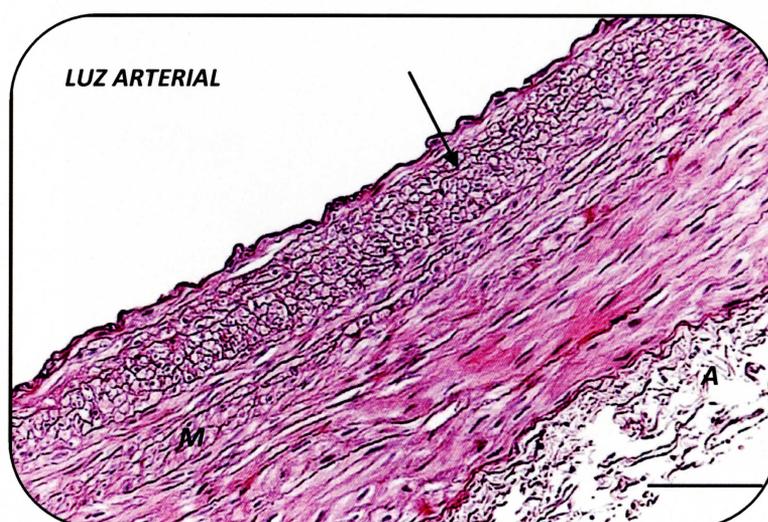


Figura IV-40: Lesión temprana en arteria iliaca de un conejo del grupo Control. Se observa como las CML presentan pérdida de la polaridad y forman columnas perpendiculares al eje de la capa media (flecha) (Tinción H-E; M: capa media; A: adventicia; —=50 μ m).

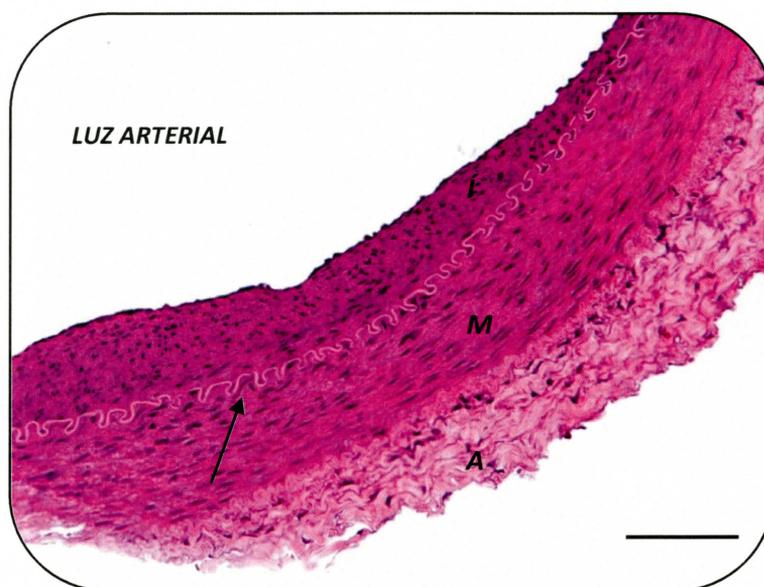


Figura IV-41: Lesión temprana en arteria iliaca de un conejo del grupo Control. Se observa un engrosamiento miointimal focal, por una proliferación de las CML en la íntima arterial (Tinción H-; Í: íntima, M: media, A: adventicia; flecha: MEI; ———=50 μ m).



Figura IV-42: Lesión temprana de la arteria iliaca de un conejo del grupo Control. Obsérvese los pequeños depósitos de células espumosas en la íntima arterial (Tinción H-E; M: capa media; A: adventicia; ———=50 μ m).

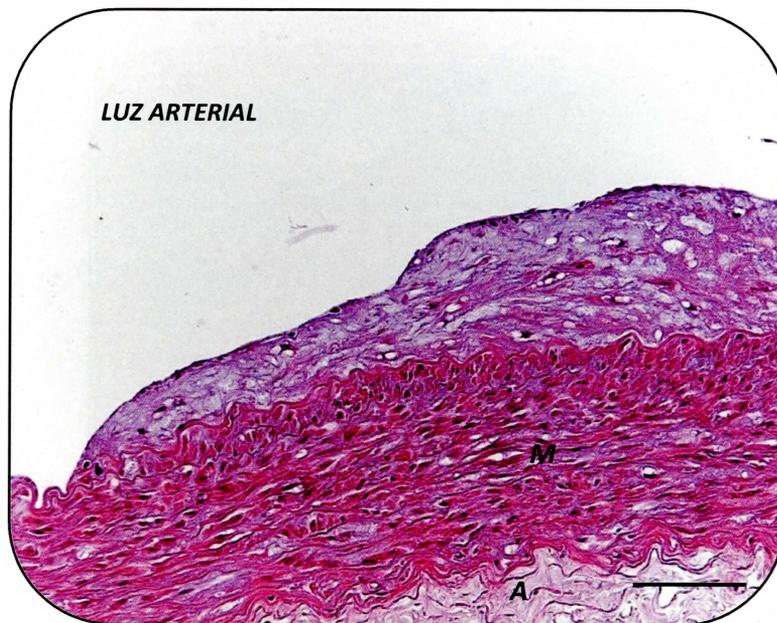


Figura IV-43: Lesión temprana en la arteria ilíaca de un conejo del grupo Control en la que se observa un depósito de lípidos extracelulares que interrumpen la disposición ordenada de las células espumosas en lesión considerada preateroma (Tinción H-E; M: capa media; A: adventicia; —=50 μ m).

Lesiones avanzadas

La lesión avanzada presenta una desorganización y engrosamiento en la íntima arterial. Los lípidos intra y extracelulares se agrupan formando un núcleo lipídico, que además está rodeado de una capa de CML (Figura IV-44). Grupos de CML pueden encontrarse en la íntima junto a algún linfocito aislado. Además, el núcleo lipídico puede rodearse de una capa fibrosa (Figura IV-45 y IV-46), compuesta básicamente por colágeno sintetizado por las CML como respuesta a la desorganización de la íntima, y que reemplaza a la matriz de proteoglicanos. En el núcleo lipídico se produce la deposición de cristales de colesterol, lipoproteínas modificadas, detritus celulares, monocitos, macrófagos y células espumosas.

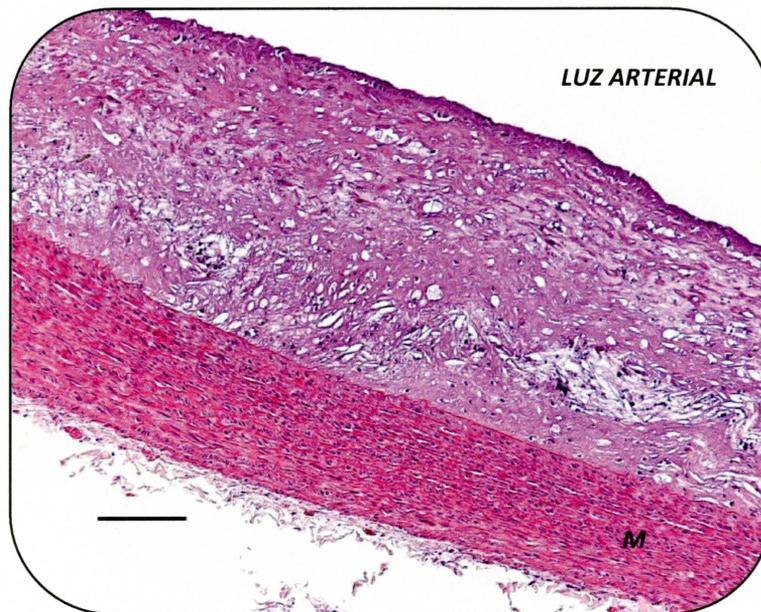


Figura IV-44: Lesión ateromatosa avanzada en arteria iliaca izquierda de un conejo del grupo Crioplastia. Se observa desorganización de la íntima, con lípidos intra y extracelulares, cristales de colesterol, así como una capa de CML rodeando la lesión (Tinción H-E; M: media; ———=100 μ m).

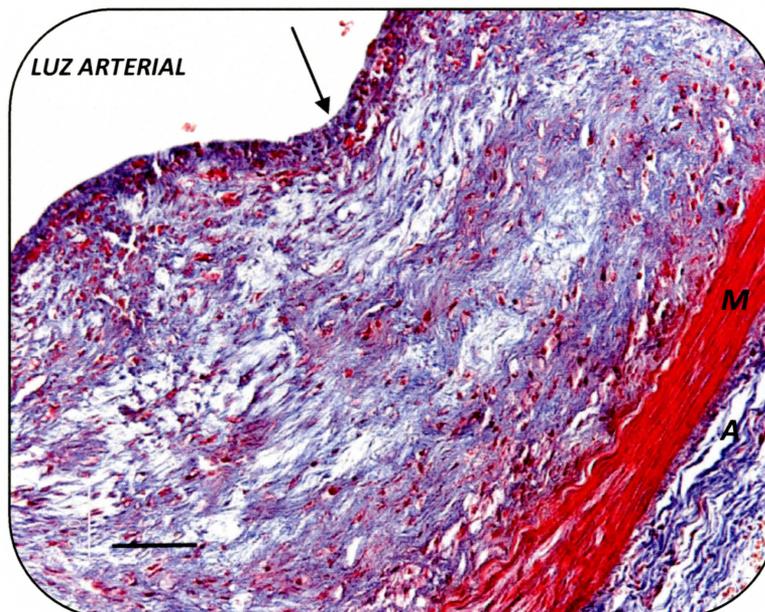


Figura IV-45: Lesión avanzada en arteria iliaca izquierda de un conejo del grupo Crioplastia. Se observa desorganización de la íntima, con predominio de fibrosis sobre el componente lipídico, así como una capa de fibrosis (flecha) rodeando la lesión (Tinción Tricrómico de Masson; M: capa media; A: adventicia; ———=50 μ m).

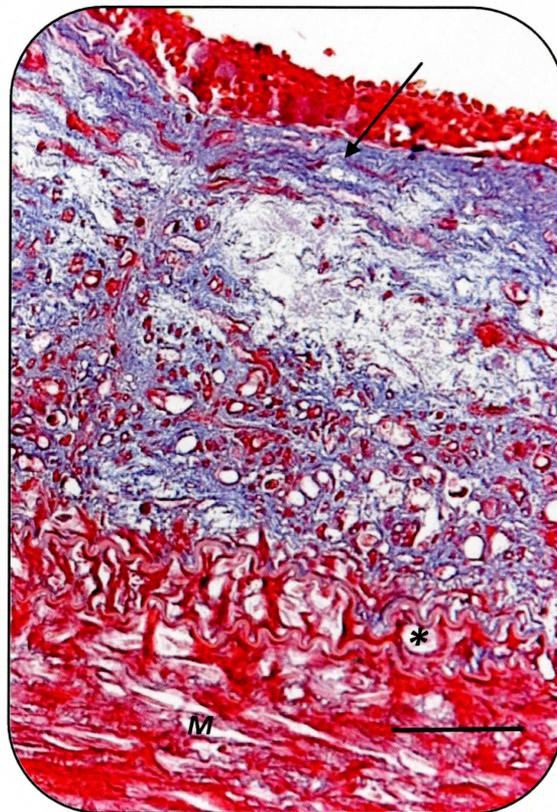


Figura IV-46: Lesión avanzada en arteria ilíaca izquierda de un conejo del grupo Crioplastia. Se observa un núcleo lipídico rodeado de una capa de fibrosis (flecha), así como desdoblamiento de la MEI (*) (Tinción Tricrómico de Masson; M: capa media; ———=25 μ m).

Lesiones complicadas

La mayoría de lesiones encontradas de este tipo han sido lesiones con un grado variable de calcificación del núcleo lipídico, observándose depósito de minerales en la íntima arterial (Figura IV-47 y IV-48). La mineralización puede en ocasiones predominar sobre el componente lipídico. También se han encontrado placas hemorrágicas y trombos hialinos (Figuras IV-49 y IV-50). En general, demuestran ser lesiones con una marcada fibrosis.

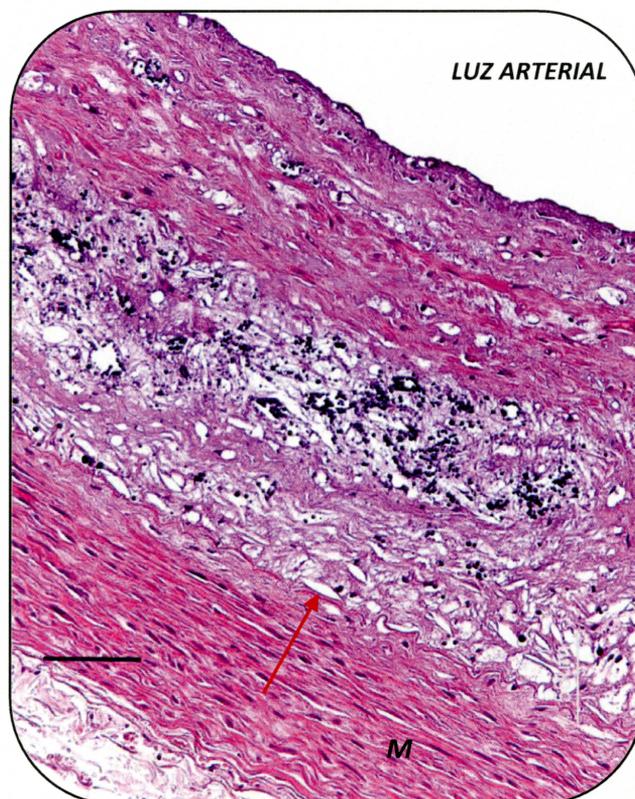


Figura IV-47: Lesión complicada en arteria íliaca izquierda de un conejo del grupo Crioplastia. Se observa depósito de minerales y colesterol (flecha) (Tinción H-E; M: capa media; ———50 μ m).

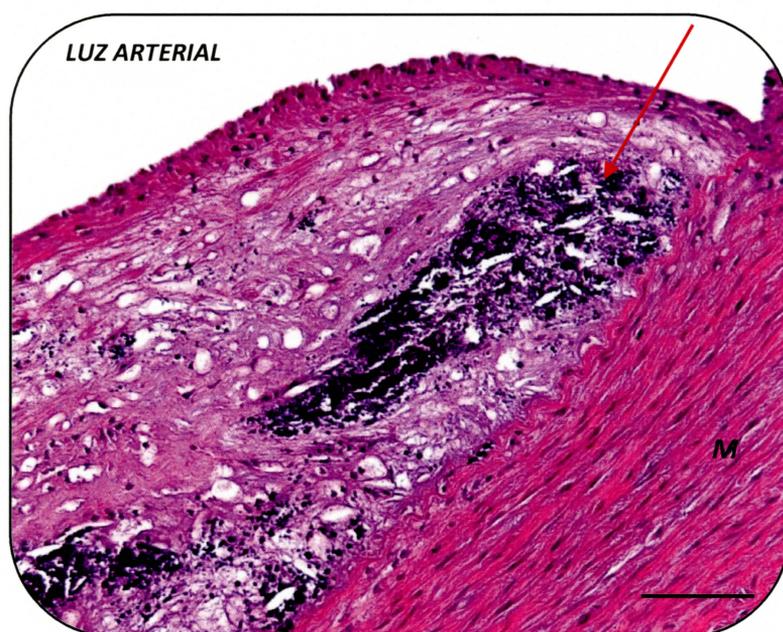


Figura IV-48: Lesión complicada en arteria íliaca izquierda de un conejo del grupo Crioplastia. Obsérvese los numerosos depósitos minerales localizados en el seno de la lesión (flecha) (Tinción H-E; M: capa media; ———50 μ m).

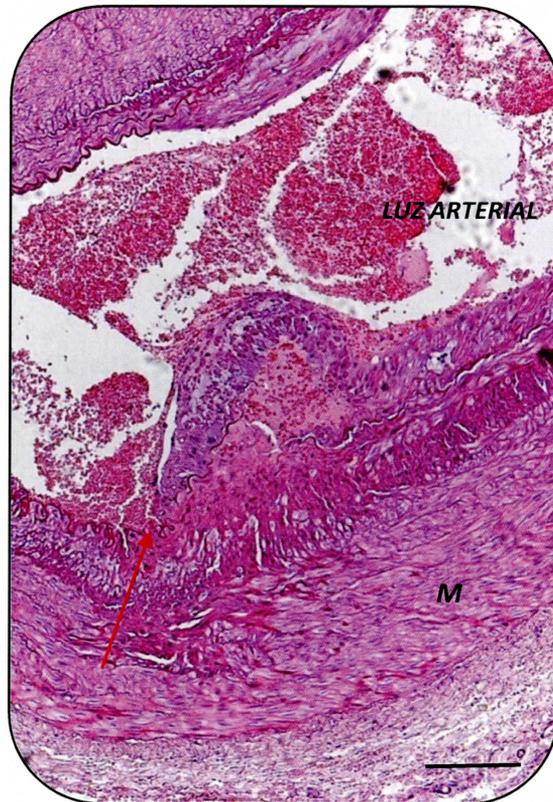


Figura IV-49: Lesión complicada en arteria ilíaca izquierda de un conejo del grupo Crioplastia. Se observa una lesión con hemorragia (flecha) (Tinción H-E; M: capa media; —=100 μ m).

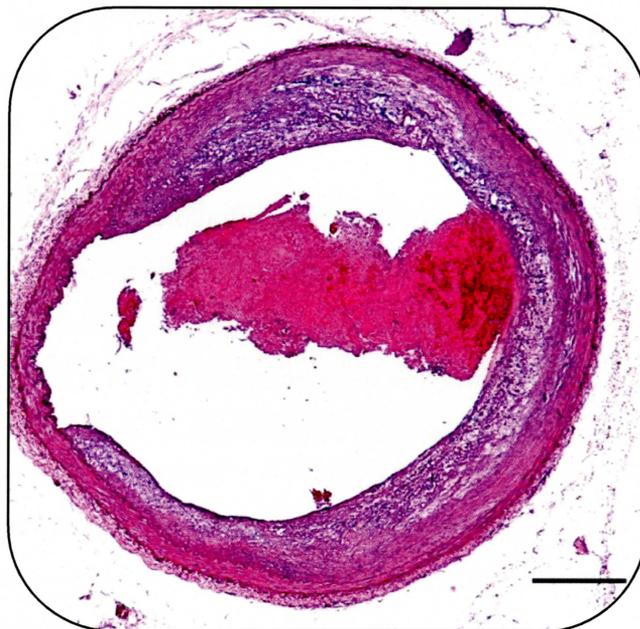


Figura IV-50: Lesión complicada en arteria ilíaca izquierda de un conejo del grupo Crioplastia. Se observa una lesión con un trombo adherido a la placa (Tinción H-E; —=200 μ m).

Se han caracterizado las lesiones de las tres secciones de íliaca izquierda de cada animal, siendo así n=48 para el grupo Control, n=18 para el grupo ATP y n=24 para el grupo Crioplastia. También se han caracterizado las 3 secciones de íliaca derecha de los animales del grupo Control (n=48), para tener un control histológico acerca del efecto aditivo que supone la denudación endotelial sobre la dieta hiperlipídica. La tabla IV-23 muestra los cuatro grupos de estudio y el porcentaje de cada tipo de lesión que muestra cada uno de ellos.

Tabla IV-23: Secciones arteriales de la íliaca izquierda en cada uno de los grupos (Control: n=48; ATP: n=18; Crioplastia: n=24), y de la arteria íliaca derecha del grupo Control (n=48), clasificadas según su grado de lesión en el día 150. Datos expresados en porcentaje con respecto al total de las secciones analizadas.

	CONTROL (derecha)	CONTROL (izquierda)	ATP	CRIOPLASTIA
SIN LESIÓN (%)	9.1	5.88	17.65	9.52
LESIONES TEMPRANAS (%)	36.4	41.18	47.06	4.76
LESIONES AVANZADAS (%)	54.5	50	29.41	28.57
LESIONES COMPLICADAS (%)	0	2.94	5.88	57.14

En la arteria derecha, no se han encontrado lesiones complicadas, y el porcentaje de muestras sin lesión es mayor que en el grupo Control de la arteria izquierda. Aún así, estas diferencias entre las dos arterias no son estadísticamente significativas, obteniéndose una $p=0.8$ al realizar el test de Mann Whitney.

En cuanto a la comparación de los tres grupos de estudio en la arteria izquierda, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas, realizándose un test de Mann-Whitney entre éstos. (Figura IV-51). La mayoría de lesiones del grupo Control son avanzadas o tempranas (91.18%). El grupo ATP presenta lesiones tempranas en el 47.06% de los animales, mientras que el grupo Crioplastia presenta lesiones complicadas en el 57.14% de las muestras revisadas.

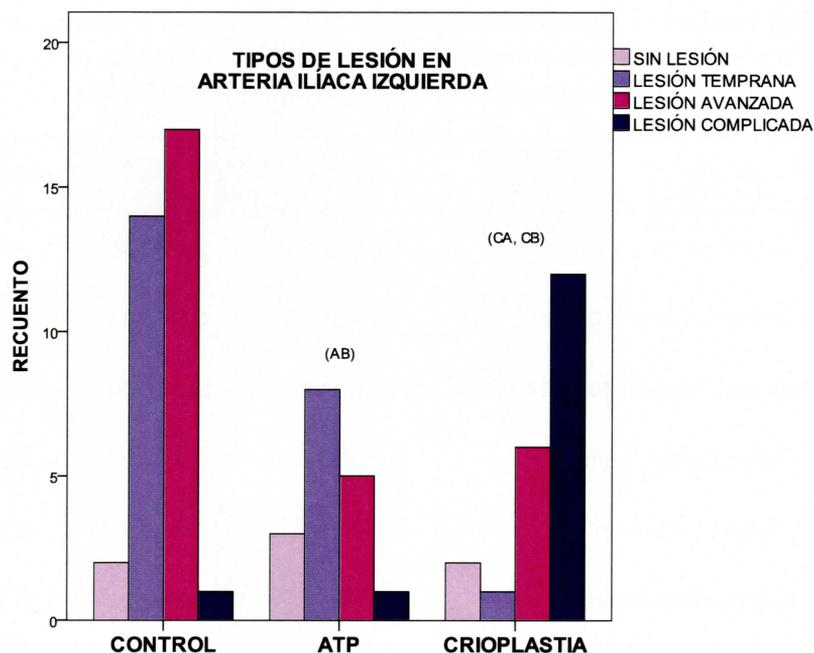


Figura IV-51: Representación de la distribución de lesión ateromatosa en la arteria ilíaca izquierda en los 3 grupos del estudio según el grupo (AB: diferencias significativas entre el grupo Control y ATP, $p=0.04$; CA: diferencias significativas entre el grupo Crioplastia y el grupo Control, $p=0.01$; CB: diferencias significativas entre el grupo Crioplastia y el grupo ATP, $p=0.001$).

En cuanto al análisis cuantitativo de las muestras, se procedió a la evaluación morfométrica de las mismas, realizando una media de cada una de las tres medidas de las secciones tomadas de la arteria ilíaca izquierda. Se midieron el perímetro total de MEI y el perímetro de MEI afectado, el área luminal y el área de lesión, el grosor de la capa muscular y la altura de la lesión. A partir de estas medidas se calcularon el porcentaje afectado de MEI, el porcentaje de estenosis luminal y la relación existente entre íntima/media en la arteria ilíaca izquierda de los tres grupos. Se realizó un análisis ANOVA con un test post-hoc de Tukey para ver las diferencias entre los tres grupos, y se vieron diferencias significativas en prácticamente todos los parámetros analizados (Tabla IV-24).

Tabla IV-24: Análisis histomorfométrico de las lesiones en las secciones arteriales de la íliaca izquierda, tras 30 días del tratamiento endovascular de la estenosis (Control: n=48; ATP: n=18; Crioplastia: n=24). Valores expresados como media \pm desviación típica.

	CONTROL	ATP	CRIOPLASTIA	p
PERÍMETRO MEI (mm)	3.30 \pm 0.73 ^a	2.73 \pm 0.66 ^a	2.75 \pm 0.76 ^a	0.20
PERÍMETRO MEI AFECTADO (mm)	0.74 \pm 0.38 ^a	0.55 \pm 0.22 ^a	1.90 \pm 0.86 ^b	0.001
% AFECTADO DEL PERÍMETRO DE MEI (%)	22.75 \pm 13.06 ^a	18.88 \pm 7.34 ^a	67.99 \pm 19.24 ^b	<0.001
ÁREA LUMINAL (mm ²)	0.91 \pm 0.43 ^a	0.62 \pm 0.27 ^a	0.64 \pm 0.31 ^a	0.24
ÁREA LESIÓN (mm ²)	0.05 \pm 0.02 ^a	0.02 \pm 0.01 ^a	0.16 \pm 0.11 ^b	0.003
% ESTENOSIS LUMINAL	4.23 \pm 2.23 ^a	3.03 \pm 2.25 ^a	23.50 \pm 6.66 ^b	<0.001
CAPA MEDIA (mm)	0.10 \pm 0.01 ^{a,b}	0.11 \pm 0.05 ^a	0.07 \pm 0.01 ^b	0.04
ALTURA DE PLACA (mm)	0.1 \pm 0.03 ^{a,b}	0.06 \pm 0.01 ^a	0.13 \pm 0.03 ^b	0.02
RATIO ÍNTIMA/MEDIA	0.95 \pm 0.34 ^a	0.58 \pm 0.26 ^a	2.05 \pm 0.88 ^b	0.04

Superíndices diferentes implican diferencias significativas, p<0.05, realizado con análisis post-hoc de Tukey.

Puede observarse como existe existen diferencias significativas de prácticamente todos los parámetros medidos entre el grupo Crioplastia y los grupos Control y ATP, no habiendo significación entre los grupos ATP y Control. Se muestra la figura IV-52 para ilustrar de forma gráfica las diferencias entre los tres grupos para cada uno de los parámetros analizados.

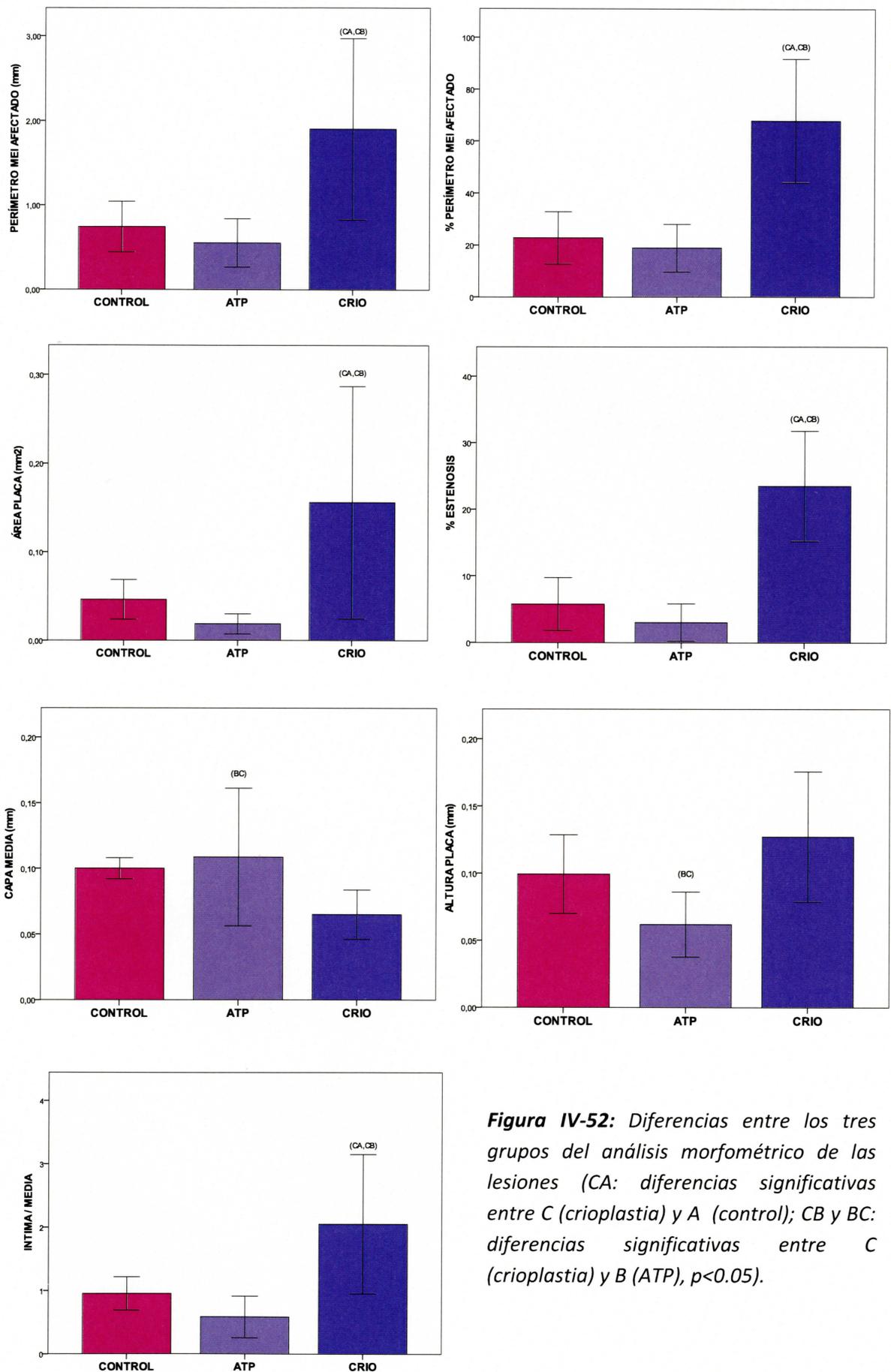


Figura IV-52: Diferencias entre los tres grupos del análisis morfométrico de las lesiones (CA: diferencias significativas entre C (crioplastia) y A (control); CB y BC: diferencias significativas entre C (crioplastia) y B (ATP), $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

En este estudio se ha desarrollado un modelo experimental de arteriosclerosis en el conejo mediante dieta colesterogénica (1 % de colesterol y 6% de aceite de palma) durante 60 días, y se han utilizado dos técnicas no invasivas de imagen, la ecografía y la TC, para la evaluación *in vivo* de las lesiones provocadas por el modelo. Los resultados obtenidos se han contrastado posteriormente con un análisis anatomopatológico.

De los resultados de la evolución del peso e ingesta de pienso a lo largo del estudio puede inferirse que los animales del grupo Colesterol ingieren un menor volumen de pienso que los del Control, con una disminución de peso efectiva tras 60 días de administración de esta formulación. La menor ingesta media diaria de pienso (administrado *ad libitum* para todos los individuos) en el grupo Colesterol puede tener que ver con la mala palatabilidad del pienso rico en colesterol y / ó aceite de palma, así como con el progresivo proceso inflamatorio que se da en los animales que produciría inapetencia, anorexia, anemia y consecuente pérdida de peso. Una posible hipótesis que explicase la menor ingesta del pienso rico en colesterol dado su mayor contenido energético no se cree probable en función de la referida pérdida de peso.

En el experimento de Kainuma y otros, 2006, y a diferencia de nuestro modelo, se limitaba estrictamente la ingesta en cada individuo a 100 gr diarios de pienso estándar con un 1 % de colesterol sin adición de grasas saturadas, no describiendo diferencias de peso entre los grupos en este experimento. En nuestro caso, y pese al carácter *ad libitum* del estudio, la adición del aceite de palma podría haber jugado un papel importante en la palatabilidad y en el desarrollo de enfermedad inflamatoria en los conejos, que obviamente perderían progresivamente su apetito.

Los animales desarrollaron leucocitosis a partir del día 20 de la ingesta de la dieta hiperlipídica. Esta elevación mantenida del recuento leucocitario a lo largo del estudio está de acuerdo con lo descrito por Feldman y otros, 1991, que sugirió un efecto directo o indirecto de la hipercolesterolemia en la producción de leucocitos en la médula ósea y su cinética de distribución en el torrente sanguíneo. Este autor en su estudio describe un aumento muy temprano (7 días) de los leucocitos circulantes con la ingesta de dieta hiperlipídica. El mantenimiento de la dieta por un tiempo prolongado (22 semanas) provoca un segundo aumento de los leucocitos circulantes en conejos hiperbilirrubinémicos, lo que apunta a que en las fases tardías de la hipercolesterolemia la leucocitosis está relacionada con un fallo hepático.

En nuestro caso, en el segundo de los ensayos aterogénicos realizados, y como también describe el mismo autor, hemos comprobado que tanto la leucocitosis como la hipercolesterolemia son reversibles tras el cese de la dieta hiperlipídica 8 semanas después de su comienzo. Además, también hemos verificado que, además de los altos valores de colesterol circulante, la anemia, la hiperproteinemia, la hipercreatinemia, la hiperbilirrunemia y la elevación de ALT son también reversibles con la sustitución de la dieta aterogénica por un pienso estándar.

Es importante destacar que la enfermedad hepática no presenta alteraciones analíticas constantes (Meyer y Harvey, 2004), pudiendo asociarse la lesión hepática con valores normales o anormales de AST, ALT, ALP, urea y albúmina. En nuestros dos ensayos aterogénicos hemos encontrado valores normales de concentración sérica de urea, albúmina, GOT y disminuidos de FA, lo que carece de significación clínica.

En el primero de nuestros estudios aterogénicos, y en cuanto a la ALT se refiere, únicamente se observó una elevación leve y no significativa de su concentración sanguínea a los 40 días post dieta, manteniéndose normales el resto de parámetros indicadores de daño hepático. En el segundo estudio, se registró una elevación también leve de esta enzima en el día 60 post administración de dieta hiperlipídica, para normalizarse a posteriori con la ingesta de pienso estándar 8 y 12 semanas después.

Asimismo, se observó una acusada hiperproteinemia y una anemia leve a partir del día 20 y 40 respectivamente de la administración de la dieta. Estas alteraciones analíticas pueden corresponderse con una anemia de origen inflamatorio. Este tipo de anemias causan una disminución de los valores séricos de hierro con elevación concomitante de proteínas de fase aguda como la ferritina, la producción de mediadores de la inflamación que inhiben la eritropoyesis y un acortamiento de la vida media del eritrocito, presuntamente asociada con una lesión de membrana provocada por oxidantes endógenos generados con la inflamación (Meyer y Harvey, 2004). Como en nuestro caso, las enfermedades inflamatorias crónicas a menudo se acompañan de una anemia de tipo leve o moderada no regenerativa.

La concentración de proteínas, que alcanza valores entre 1,5 y 2,7 puntos por encima del valor superior de referencia tras 60 días de la administración de la dieta, es sugerente de una lesión hepática así como de una respuesta orgánica inflamatoria masiva.

La referida hiperproteinemia también afecta a la fracción de la albúmina, que aumenta a lo largo del estudio aunque dentro del rango de normalidad para esta especie, con diferencias significativas con el grupo Control desde el día 20.

Por su parte la trombocitopenia, observada a partir del día 20 de ingestión de la dieta, estaría relacionada con la disminución de la trombopoyesis medular por déficit de la trombopoyetina hepática, como se ve frecuentemente en pacientes con cirrosis y fallo hepático crónico (Giannini y Savarino, 2008).

En nuestro modelo experimental se observan diferencias significativas en las concentraciones de colesterol, triglicéridos y HDL-c entre ambos grupos a partir del día 20, existiendo una marcada hiperlipidemia en los conejos ya desde ese mismo día. El incremento de los valores de la concentración de colesterol y triglicéridos es constante a lo largo de la administración de la dieta a los 20, 40 y 60 días. Asimismo, si observamos el segundo de los ensayos aterogénicos, los valores de colesterol revierten a la normalidad 8 semanas después del cese de la dieta. Sin embargo, en este caso la concentración de triglicéridos no presenta una evolución descendente paralela a la del colesterol, manteniéndose elevada 8 semanas después del cese de la dieta, para normalizarse a las 10. Una evolución similar encontramos con los niveles de LDL-c. Los triglicéridos son los componentes principales de la fracción lipoproteínica VLDL, la cual se transforma en el torrente sanguíneo en LDL-c. Este hecho explica el paralelismo en la evolución de las concentraciones de LDL-c y triglicéridos en este caso.

Existen numerosos estudios recientes de modelos de arteriosclerosis en conejos que emplean dietas con distintos porcentajes de colesterol y tiempos de administración, combinadas o no con aceites vegetales (Kainuma y otros, 2006; Torres y otros, 2007; Cheong y otros, 2010; Yu y otros 2012). Las concentraciones de colesterol y LDL-c aumentan siempre significativamente en este tipo de dietas, existiendo una mayor variabilidad en la concentración de HDL-c y triglicéridos en función del porcentaje de colesterol (0,3-0,5 %) y la adición o no de ácidos grasos poliinsaturados (aceite de maíz) a la misma (Cheong, 2010; Yu y otros, 2012). En nuestro estudio, la adición de aceite de palma a la dieta provocó un aumento significativo en la concentración de HDL-c en ambos ensayos aterogénicos. Yu y otros, 2012, en su estudio aterogénico en conejos, elige un menor porcentaje de colesterol (0,3 %) al que adiciona ácidos grasos poliinsaturados (0,5 % de aceite de maíz), obteniendo una disminución significativa de HDL-c. Duarte y otros, 2004, comprobaron como, en dietas libres de colesterol, la sola adición de aceite de palma -ácidos grasos saturados-, ó maíz -poliinsaturados- al pienso estándar alteraba

significativamente o no la concentración de HDL-c en conejos. Asimismo, estos autores observaron como la concentración de triglicéridos aumentaba significativamente cuando se añadía aceite de maíz a la dieta, pero no en el caso del aceite de palma. En nuestros estudios se obtienen valores elevados de la concentración de triglicéridos en una dieta que es rica en colesterol (1%) y ácidos grasos saturados (6 % de aceite de palma), logrando así un aumento significativo simultáneo de HDL-c y triglicéridos en sumación de efectos de ambos aceites vegetales. En este sentido, Kainuma y otros, 2006, también encontró diferencias significativas en el nivel de triglicéridos y LDL-c con respecto al grupo Control con una dieta de 8 semanas en la que únicamente se añadía un 1 % de colesterol al pienso estándar, pero sin aceite de palma.

El comprobado efecto protector de las HDL-c en pacientes humanos con arteriosclerosis no parece tener la misma repercusión fisiopatológica en el conejo al observarse lesiones arteriales histológicamente más graves y de tipo crónico en los animales alimentados con pienso rico en ácidos grasos saturados –aceite de palma- (Duarte y Scorza, 2004). En los pacientes humanos se define un alto riesgo de enfermedad cardiovascular y/o desarrollo de enfermedad arterial periférica al presentar el llamado fenotipo lipoproteico aterogénico ó *tríada lipídica*, que consiste en una dislipidemia con elevación de la concentración de triglicéridos, disminución de las HDL-c y presencia de LDL-c de pequeño tamaño (Rizzo y Berneis, 2005). En nuestros dos estudios, con la dieta rica en colesterol y grasas saturadas, los conejos han desarrollado un fenotipo aterogénico distinto (ver tabla V-1) al de los pacientes humanos, consistente en una elevación de los triglicéridos y de las HDL-c, así como en un aumento discreto y no significativo de LDL-c a lo largo de 8 semanas de dieta hiperlipídica.

En concreto, hemos observado que la fracción HDL-c se eleva por encima de los valores normales a los 20 días tras la administración de la dieta hiperlipídica de manera significativa con respecto al grupo Control. En el segundo de los ensayos, se observa que su concentración se eleva asimismo a los 60 días y disminuye al retirar la dieta. Sin embargo, en este caso los valores se mantienen dentro del rango de referencia.

En cuanto a la fracción LDL-c, no hemos encontrado en la bibliografía consultada un rango de valores de referencia de normalidad en el conejo para este parámetro, por lo que hemos asumido nuestro propio control interno en el estudio (9-95 mg/dl). En ambos ensayos aterogénicos, las LDL-c se mantuvieron dentro de nuestro rango de referencia durante todo el período de ingesta, por lo que su concentración no parece constituir un indicador de hiperlipidemia en el conejo (Hussain y otros, 1995) en las condiciones de nuestro estudio. Otros

autores, que emplean aceite de maíz o sólo colesterol (Kainuma, 2006; Torres y otros, 2007; Cheong y otros 2010), sí encontraron diferencias significativas en las concentraciones de LDL-c en el conejo tras la dieta.

Tabla V-1: Fenotipo aterogénico dislipidémico o “triada lipídica” en pacientes con arteriosclerosis natural humana y su comparación con el fenotipo cunícola hallado en nuestros estudios aterogénicos experimentales, consistentes en la administración de una dieta rica en colesterol y aceite de palma durante 60 días.

	TRIGLICÉRIDOS	HDL-c	LDL-c
HUMANO	↑↑	↓	↑↑
CONEJO	↑↑	↑↑	↑

Como se ha comentado en la revisión, la mayoría del colesterol circulante en conejos es transportado por HDL-c, mientras que en humanos es transportado por LDL-c (ver Tabla V-2). Por ello, y como se ha visto en nuestros ensayos, el aumento de la HDL-c en situaciones de hipercolesterolemia puede ser mucho mayor comparado al de las LDL-c. Las HDL-c son lipoproteínas más pequeñas y densas, que retiran el colesterol desde las lesiones ateromatosas y los tejidos hacia el hígado de nuevo en un proceso que se denomina transporte inverso del colesterol. Por tanto, unos niveles elevados de HDL-c con concentraciones normales de triglicéridos y LDL-c se han considerado clásicamente como un índice de una buena salud cardiovascular en los humanos. En la mayoría de los animales domésticos, las HDL-c son responsables de 50-75% del contenido de lipoproteínas presentes en plasma, lo que probablemente explica la baja frecuencia de enfermedades cardiovasculares en estas especies.

Tabla V-2: Comparación de porcentajes de lipoproteínas transportadoras de colesterol en el hombre y el conejo (Adaptado de Xiandong y otros, 2011).

	% HDL-c	% LDL-c	VLDL-c
HUMANO	30	55	15
CONEJO	50	40	10

Sin embargo, y en el caso del conejo, hemos comprobado que la elevación de las HDL-c no es un parámetro suficiente para asegurar una buena salud cardiovascular en esta especie. En nuestro ensayo no invasivo, y pese a la elevación de esta fracción lipoproteínica, se ha

confirmado la validez de nuestro modelo experimental de arteriosclerosis al comprobar mediante examen histopatológico la existencia de diferentes tipos de lesiones ateromatosas arteriales.

Clásicamente se ha considerado que el conejo presenta algunas desventajas para ser utilizado como modelo experimental en el desarrollo de lesiones arterioescleróticas que puedan mimetizar las que ocurren de manera natural en la especie humana. Entre estas desventajas se ha apuntado una importante hepatotoxicidad de las dietas hiperlipídicas que provocaría una alta mortalidad (Xiangdong y otros, 2011).

Sin embargo, en nuestro primer estudio aterogénico la administración de una dieta enriquecida con un 1% de colesterol y un 6% de aceite de palma durante 8 semanas resultó en un 100 % de supervivencia en los conejos. Por tanto, puede asumirse que la alta mortalidad (66,7%) encontrada en el segundo ensayo fue debida al efecto combinado de la dieta hiperlipídica con la anestesia y las técnicas invasivas de lesión y tratamiento en las arterias.

Existen multitud de estudios en los que se combinan diferentes proporciones de colesterol en la dieta, en solitario o con distintas grasas comestibles con una duración variable de ingesta. Por ejemplo, Zhang y otros, 2005, y Shakuto y otros, 2005, provocaron arteriosclerosis con el mismo porcentaje de colesterol utilizado en nuestros estudios (1%), pero administrado durante 12 y 10 semanas respectivamente. Por tanto, en nuestro caso, la combinación del colesterol con el aceite de palma al 6%, permite observar lesiones arteriales con un menor tiempo de ingesta (8 semanas). Aguilera y otros, 2005 demuestra que el desarrollo de las lesiones es dependiente del tiempo, ya que la misma dieta (1,5% de colesterol junto a 3% de grasa saturada) provoca lesiones de estría grasa en 30 días y placas de fibroateroma en 50 días en el cayado y en la aorta torácica y abdominal. Con nuestro modelo, a las 8 semanas se consiguen desarrollar placas de ateroma en la aorta abdominal y la arteria ilíaca, con lesiones tempranas -en fase de estría grasa- las que se forman en el cayado y la aorta torácica. A la vista de los resultados, podríamos suponer que el desarrollo de un tipo de lesión u otro viene determinado por el diámetro vascular, provocándose mayor estrés mecánico y físico a medida que se reduce la luz arterial. En el estudio de Valiente y otros, 2001, se utiliza también un 1 % de colesterol, pero administrado durante 12 semanas, con el que se logran desarrollar ateromas carotídeos. Nuestro modelo ha desarrollado placas de ateroma en la arteria carótida en el 70% de los individuos, con lesiones avanzadas en el 40% de los casos y tempranas en el 30% restante. La mayoría de las placas de ateroma desarrolladas en la arteria carótida tuvieron un carácter avanzado (36.4%) y se localizaron cerca del cayado aórtico. Nuevamente, podemos

pensar que el menor diámetro de esta arteria y el estrés hemodinámico local de la ramificación ha podido influir en el desarrollo de lesiones más avanzadas en esta zona.

Algunos autores han cuestionado la eficacia del conejo para mimetizar las lesiones más crónicas de la arteriosclerosis natural humana, como son lesiones avanzadas que incluyan fibrosis. Sin embargo, en nuestro caso, hemos obtenido un rango de lesiones ateromatosas muy amplio al añadir a una dieta con un 1% de colesterol y 6% de aceite de palma durante 8 semanas el efecto de la denudación endotelial. La diversidad histopatológica de los ateromas que obtenemos es muy variada, incluyendo desde lesiones realmente tempranas, propias del período de desarrollo fetal, hasta lesiones muy avanzadas típicas de enfermos cardiovasculares muy crónicos que muestran, además de fibrosis, la presencia de hemorragias y úlceras.

A fin de realizar las mediciones arteriales de la pared y caracterizar posibles variaciones hemodinámicas, en este trabajo se ha puesto a punto la técnica de localización ecográfica de las arterias aorta abdominal e ilíaca externa en el conejo. Ambas arterias pudieron localizarse en todos los casos, si bien la presencia de grasa abdominal y el aumento del volumen corporal del animal dificultó su identificación en las evaluaciones que se realizaron al final del estudio, siendo por tanto más fácilmente identificables las estructuras vasculares en los momentos iniciales. Las ecografías se realizaron con el conejo despierto y sin ningún tipo de tranquilización, lo que en ocasiones prolongó el tiempo de exploración. La ecografía se realizó con el animal acostado en decúbito lateral derecho y restringido en sus movimientos por un ayudante que, estirando de las extremidades torácicas y pelvianas, inducía una extensión de la columna vertebral torácica y lumbar para ampliar la ventana acústica en el flanco izquierdo. Todas las exploraciones y mediciones se realizaron de manera completa y por el mismo ecografista en un intervalo de tiempo entre 3 y 7 minutos, dependiendo de la colaboración del paciente.

En la exploración ecográfica, y además de la arteria aorta abdominal, se identificaron algunas de sus divisiones como las ramas dorsales lumbares o la arteria circunfleja ilíaca profunda. Asimismo, tanto la arteria ilíaca común como la ilíaca externa, la ilíaca interna y la sacra media se identificaron de manera rutinaria.

El conejo se ha utilizado como modelo experimental en varios estudios (Coley y otros, 1995; Baumgartner y otros, 2008; Polisca y otros, 2010) donde se ha usado la ecografía Doppler para valorar el índice de resistencia (IR) vascular en distintas arterias. Baumgartner y otros, 2008 describieron unos IR de 0,8 en la aorta abdominal y de 0,77 en la arteria carótida en conejos despiertos.

En nuestro estudio hemos caracterizado la gráfica Doppler de flujo y el IR en las arterias aorta abdominal e ilíaca externa utilizando conejos alimentados con un pienso estándar -grupo Control-, tomando los valores hemodinámicos en 4 momentos distintos, entre los 2 y los 4 meses de edad. La gráfica de flujo obtenida fue de alta pulsatilidad y resistencia, con una fase sistólica y diastólica claras en todos los casos en ambas arterias. El valor de IR medio de la aorta abdominal en los conejos del grupo Control presentó un rango de normalidad de 0,77 a 0,84. Por su parte, la arteria ilíaca externa izquierda presenta unos valores medios de IR algo más elevados, entre 0,81 y 0,87. El mayor valor medio de IR encontrado en la ilíaca externa es esperable dado el menor diámetro de este vaso en comparación con el de la aorta. Hemos encontrado que los valores medios de los IR tanto en la aorta abdominal como en la ilíaca externa son más altos consecutivamente en cada exploración con respecto a la anterior entre el día 1 y el 60. En este sentido, el incremento del peso del conejo (1 Kg / mes) observado en este período presenta una muy alta correlación con el IR en las arterias aorta e ilíaca externa ($r= 0,93$ y $r=0,92$) respectivamente, lo que permite concluir que el peso del conejo influye de manera decisiva en los valores del IR en este rango de edad (2 a 4 meses). Asimismo, se encontró una alta correlación ($r=0,83$) al comparar los IR de ambas arterias aorta e ilíaca externa a lo largo del estudio, lo que permite validar la fiabilidad de la técnica de medida.

En cuanto a la comparación de los parámetros hemodinámicos y las medidas arteriales entre el grupo Control y el Colesterol, la ausencia de diferencias significativas indica que la ecografía no fue capaz de detectar cambios intravasculares con precisión con la sola administración de la dieta hiperlipídica durante 8 semanas, a excepción de una reducción en el tamaño de la luz de la aorta en el grupo Colesterol. En nuestro estudio, el abordaje ecográfico transabdominal no discrimina las distintas capas de la pared arterial afectada, a diferencia de lo que ocurre con técnicas ecográficas intravasculares (IVUS) más invasivas (Nighoghossian y otros, 2005).

Asimismo, en este trabajo se han obtenido las imágenes correspondientes a la anatomía tomográfica normal del trayecto arterial completo entre la carótida y la ilíaca externa izquierdas, documentando la morfología de la aorta ascendente, cayado aórtico, aorta torácica descendente y abdominal y su bifurcación final en el conejo. Para la elaboración de los resultados, todos los estudios requirieron de la introducción de un contraste yodado intravenoso con una concentración de 320 mg I₂/ml a una dosis corporal de 1320 mg I₂ / Kg de peso vivo. La elección de esta elevada concentración de I₂ (1,65 veces superior a la habitualmente utilizada en las especies domésticas en radiología diagnóstica) pretendió

asegurar una excelente opacificación de la luz arterial en todos los casos, no observándose ninguna reacción adversa al contraste.

En nuestro modelo experimental de arteriosclerosis, no se detectaron mediante tomografía alteraciones de la permeabilidad, trombosis ni estenosis arteriales que impidieran el flujo de la sangre a los territorios orgánicos. Sin embargo, sí que pudimos detectar diferencias significativas ($p < 0,01$) en los valores del área de la luz en secciones transversales de la arteria aorta abdominal a nivel de L4-L5 con respecto al grupo de animales Control no hiperlipidémicos. Aunque los valores del grupo Control para los diámetros y áreas de la aorta y la iliaca izquierda siempre fueron mayores en términos absolutos que los del grupo Colesterol, la tomografía no es capaz de detectar diferencias significativas ni en el diámetro externo de la aorta ni en el diámetro ni en la luz de la arteria ilíaca externa izquierda para este modelo de arteriosclerosis. Aboshady y otros, 2010 y Hur y otros, 2011 mostraron la eficacia de la TC para detectar placas de ateroma en la pared de la aorta abdominal en conejos en un tomógrafo de 64 cortes, comparando posteriormente con los hallazgos histológicos. Sin embargo, no existen datos en la bibliografía consultada acerca de la identificación de ateromas en conejos en arterias de un menor tamaño (3-4 mm de diámetro) como es la ilíaca externa. En nuestro caso, la no detección de patrones lesionales en vasos de este calibre puede ser debida a la limitación resolutive de la unidad de tomografía de 2 cortes.

Por otra parte, la representación de la anatomía tomográfica normal de los diámetros del trayecto arterial principal del conejo en sentido craneocaudal (Figura IV-9) adopta una morfología muy similar a la de las gráficas de los parámetros de evaluación del ateroma en los animales del grupo Colesterol (Figura IV-24). Todas ellas siguen un patrón típico con un aplanamiento inicial de la gráfica en el área carotídea, un pico máximo en la región del cayado y una variación decreciente en sentido craneocaudal, que únicamente vuelve a incrementarse en la arteria ilíaca externa. De esta manera, puede deducirse que el diámetro interno o luz de la arteria aorta abdominal es directamente proporcional a la cantidad de lesión presente en la pared arterial en los animales sometidos a una dieta hiperlipídica. Sin embargo, esta proporcionalidad no se cumple al llegar a la arteria ilíaca externa, donde se encuentran lesiones cuantitativa y cualitativamente muy apreciables incluso en los casos en los que no ha habido denudación endotelial. Una explicación plausible para este hecho es la peculiar localización anatómica de esta arteria. La arteria ilíaca externa forma un ángulo de unos 150-160° con respecto al trayecto de la aorta abdominal tras su bifurcación, y al igual que el cayado aórtico, las ramas lumbares dorsales o la circunfleja ilíaca profunda, puede estar más

predipuesta al depósito de ateromas en función del cambio súbito de dirección y estancamiento relativo de la sangre en estas zonas. Por tanto, existirían dos factores de estrés hemodinámico que determinan un mayor cúmulo de lesión parietal en las distintas áreas de la arteria aorta abdominal: el diámetro del vaso y su angulación y/o predisposición anatómico-hemodinámica a las turbulencias (Breslow, 2000).

Por ello, es en el cayado aórtico donde mayor cantidad de ateroma localizamos en nuestro modelo, dado que los 2 factores considerados predisponentes (tamaño y angulación) están presentes en este caso. Otros ejemplos, como las ramificaciones de la aorta abdominal seguirían este mismo patrón cuantitativo. Por el contrario, los vasos de menor diámetro cuyo flujo sanguíneo proviene de un trayecto rectilíneo aparecen menos susceptibles de sufrir un depósito de ateroma.

Desde el punto de vista histopatológico, se ha podido comprobar que la administración de la dieta hiperlipídica durante 60 días permite la creación de un modelo de hígado graso no alcohólico con lesiones graves y difusas en su parénquima. El incremento de peso y volumen del hígado en los animales que ingieren dieta es muy significativo con respecto al grupo Control, observándose lesiones vacuolares citoplasmáticas en los hepatocitos compatibles con degeneración grasa y lipidosis grave. Kainuma y otros, 2006 describió un modelo similar de esteatosis hepática no alcohólica en conejos alimentados con un pienso estándar sin aceite de palma conteniendo únicamente un 1 % de colesterol durante 8 y 12 semanas.

Para poner a punto la técnica de lesión arterial que favorezca la instauración de lesiones ateromatosas, se procedió a la denudación de la arteria ilíaca externa izquierda mediante el abordaje por la arteria carótida externa del mismo lado. La elección de la arteria ilíaca externa se debe a su similitud en diámetro a las arterias infrapoplíteas y coronarias humanas, que son las más afectadas por la arteriosclerosis natural.

En los pacientes humanos, el abordaje más utilizado para el cateterismo con balón es el de la arteria femoral (Rigatelli y otros, 2007). Este acceso ha sido también utilizado en el conejo (Leveen y otros, 1982; Faxon y otros, 1984; Wang y otros, 1996; Meurice y otros, 1996), aunque es menos viable en esta especie; aunque la arteria femoral no necesita exteriorización, la distancia entre la vía de entrada y el lugar de la denudación en la ilíaca externa o común es de escasos centímetros. Hay que considerar que el introductor es muy largo y la guía utilizada para la técnica de Seldinger es de 180 cm de longitud. Debido a estos condicionamientos, la vía de entrada elegida suele estar alejada del lugar de la denudación. Una excepción a esta regla sería

la utilización de conejos de gran tamaño. En el experimento descrito por LeVeen y otros, 1982, se cateteriza la arteria femoral en conejos de la raza Gigante de Flandes; lo que permite aumentar la distancia entre la vía de entrada y la arteria a denudar. No obstante, y con el acceso por otras arterias, como la carótida (Van Erven y otros, 1992; Strauss y otros, 1994; Maillard y otros, 2000; Cheema y otros, 2003) o la auricular (Karnabatidis y otros, 2006 y Spiliopoulos y otros, 2011), en conejos de laboratorio de tamaño estándar, queda resuelta también esta cuestión.

Aunque la punción de la arteria carótida en el conejo necesita exteriorización y ofrece cierto grado de complejidad quirúrgica inicial, permite una buena maniobrabilidad posterior en el manejo interno de las guías y los catéteres, por lo que se optó por un abordaje transcarotídeo en todos los casos. Además, el área anatómica de la bifurcación aórtica en el conejo es de sumo interés en los estudios de arteriosclerosis experimental. En nuestro caso, el abordaje transcarotídeo planteado permitió la descripción anatómica precisa de la bifurcación aórtica en el conejo mediante arteriografía no selectiva en 32 conejos. Otros autores han descrito la anatomía arteriográfica de otras áreas de interés, como la extremidad pelviana (McNally y otros, 1992), el hígado (Seo y otros, 2001), las arterias uterinas y placentarias (Carter y otros, 1968) o la región coronaria (Booth y otros, 1987). Sin embargo, no hemos encontrado referencias en la bibliografía consultada acerca de la arteriografía de la aorta abdominal caudal y sus ramificaciones finales en el conejo. De acuerdo con la descripción de Barone en 1996, en nuestro trabajo hemos podido describir la anatomía arteriográfica de la bifurcación aórtica y sus principales ramificaciones, obteniendo su distribución espacial en proyecciones radiográficas ventrodorsales de la pelvis del conejo.

La técnica de punción carotídea en el conejo necesitó de ayuda fluoroscópica para guiar el tránsito del catéter a través del corazón y disponerlo finalmente en la arteria ilíaca externa izquierda, así como proceder a su inflado y desinflado en la denudación endotelial.

Además, el examen fluoroscópico y la arteriografía del área pélvica permitió evaluar la efectividad de la denudación mediante la visualización del vasoespasmo arterial ilíaco inmediato en 30 individuos, los cuales presentaron diferencias muy significativas ($p < 0,001$) entre los diámetros de las arterias ilíacas externas de ambos lados. La imagen de la estenosis vascular observada mediante arteriografía que se produce tras cada denudación en nuestro estudio se debe al espasmo o contracción focal de la capa muscular de la arteria como respuesta a la lesión. En concreto, se obtiene un porcentaje medio de estenosis del 46,6 % de la arteria ilíaca externa izquierda en comparación a la arteria contralateral no denudada, inmediatamente después del procedimiento con el catéter de menor diámetro y mayor

presión de inflado (2,5 mm / 12 atm). En el caso del balón de mayor diámetro y menor presión de inflado (3 mm / 6 atm) se obtiene un porcentaje medio de estenosis arterial del 42,8 %. Esta diferencia de estenosis arterial entre los dos catéteres no fue estadísticamente significativa. Por tanto, y considerando la visualización de la estenosis como un reflejo del vasoespasmo inmediato observado tras una adecuada denudación endotelial, podemos afirmar que este procedimiento se realizó con éxito en todos los individuos sometidos al cateterismo transcarotídeo. Este vasoespasmo, al igual que el observado en pacientes humanos, es focal y difuso, y se produce bien en el mismo lugar de la colocación del catéter en la angioplastia, bien inmediatamente distal a ella.

Esta estenosis arterial posterior a la denudación fue descrita por LeVein y otros en 1985, comprobando además que la heparina y otros anticoagulantes reducían la incidencia y la gravedad del vasoespasmo, evitando así fenómenos de trombosis intravascular o extravasaciones. Otros autores, que investigaron la influencia de distintos tamaños de catéteres y presiones de inflado en arterias ilíacas en conejo (Consigny y otros, 1986; Sarembock y otros, 1989) obtuvieron unos resultados opuestos, no observando estenosis de la arteria inmediatamente después de la denudación sino una dilatación de la misma. Este hecho puede explicarse por el distinto protocolo de denudación endotelial que estos autores desarrollaron, los cuales mantenían el balón inflado e inmóvil durante 30 segundos (Consigny y otros, 1986) y 1 minuto dentro de la arteria ilíaca externa, utilizando incluso lidocaína para minimizar el espasmo (Sarembock y otros, 1989). Nuestra técnica de denudación endotelial dinámica, que emplea tiempos de inflado de balón mucho más cortos – de 3 a 4 segundos - pero que incluye 3 ligeros desplazamientos craneocaudales del balón mientras está inflado, permitió una estenosis arterial significativa.

El objetivo de la denudación endotelial, acompañada de la administración del pienso colesterogénico, es la creación de un modelo que desarrolle lesiones ateromatosas de carácter avanzado en las que haya dado comienzo el fenómeno de reestenosis, en un intento de asemejar las lesiones a las que existen en los pacientes humanos. La denudación endotelial acelera la formación de placas, y las hace más estables y uniformes en tamaño y distribución (Aiwaka y otros, 1997). La denudación endotelial causa un estrechamiento radial de la arteria, provocando hemorragia intramural y disección de la capa íntima y / o de la media. Los mecanismos vasculares posteriores inducen una respuesta inflamatoria, en la que la reestenosis se forma por la aparición del trombo mural, que rellena las placas de disección y forma un crecimiento celular junto al depósito de colágeno y elastina en la íntima, media y adventicia de la arteria (Strauss y otros, 1994).

En cuanto a la elección del diámetro y presión de inflado adecuados del catéter de balón para realizar la denudación endotelial, los resultados apuntan a que los procedimientos llevados a cabo con el catéter de menor diámetro y mayor presión atmosférica (2,5 mm / 12 atm) provocan una menor mortalidad (15 %) en conejos de este tamaño, con un peso de aproximadamente 3-3,5 kilogramos y 3 meses de edad. En los animales en que se utilizó el catéter con un balón de mayor diámetro (3 mm / 6 atm) se obtuvo una mortalidad del 33,3%.

No obstante, y aunque el balón de mayor grosor entrañe siempre más riesgo de incidencias letales, el porcentaje de mortalidad más acusado (81,8 %) se registró no en el momento del procedimiento quirúrgico sino en alguna de las distintas etapas de la inmovilización química, bien sea en la inducción o en la recuperación anestésica tras la denudación endotelial. El resto de la mortalidad obtenida en nuestro estudio (18,2 %) se produjo a causa de un grave vasoespasmo, que resultó en rotura arterial y extravasación. La utilización de heparina como fármaco preventivo no fue suficiente para evitar una lesión endotelial excesivamente traumática en estos casos. En este sentido, el carácter dinámico de nuestro protocolo de denudación endotelial podría haber influido en la mortalidad observada directamente ligada al excesivo vasoespasmo (2 animales).

Como ya se ha dicho, la denudación endotelial provocó un vasoespasmo adecuado en la mayoría de los casos. Desde este punto de vista, no se observaron diferencias significativas en las dimensiones de la estenosis arterial producida por uno u otro catéter de balón después de la denudación endotelial de la arteria ilíaca externa izquierda. Por tanto, ya que ambos catéteres provocan estenosis arteriales similares después de la denudación, y las complicaciones se han revelado más numerosas y graves en el grupo del catéter de 3 mm, no existe razón alguna para recomendar su utilización frente al de 2,5 mm. Por tanto, el uso del balón de 2,5 mm inflado a una presión de 12 atmósferas es más seguro para la denudación endotelial en conejos de 3-3,5 Kg con unos 3 meses de edad, siendo superior la supervivencia de los animales después del procedimiento (85% con el catéter de 2,5 mm frente a un 66,67% con el catéter de 3mm).

Hemos visto que el vasoespasmo arterial es una consecuencia inmediata de la denudación endotelial bajo nuestras condiciones de trabajo. Además, y cuando realizamos una arteriografía a los 120 días de la denudación endotelial para evaluar sus consecuencias a largo plazo sobre el aspecto y dimensiones de la arteria, observamos que, como valor medio, se obtiene una estenosis de la luz del 15,5 % (n=32) utilizando catéteres de balón de 2,5 mm / 12 atm. Además de para evaluar la estenosis vascular, la arteriografía se ha demostrado en

nuestro estudio una técnica útil para la identificación de irregularidades parietales y defectos de llenado de contraste. Como conclusión, en nuestro trabajo hemos observado que la denudación endotelial dinámica provoca una disminución del diámetro interno del vaso tanto a corto (46,6 % de estenosis) como a largo plazo (15,5 %), los cuales son identificables mediante arteriografía.

En nuestro estudio también se evaluaron ecográficamente ambas arterias ilíacas externas a los 120 días de la denudación endotelial de la arteria ilíaca externa izquierda, buscando la presencia de estenosis arterial en 32 conejos a los que se les administró una dieta hiperlipídica después de la denudación endotelial durante 60 días. Los resultados obtenidos muestran un engrosamiento parietal significativo (12 %) en la arteria ilíaca denudada frente a su contralateral derecha intacta, que únicamente habría sufrido el efecto de la dieta. La medición ecográfica también observó un valor menor, aunque no significativo, de la luz arterial en la ilíaca externa izquierda con respecto a la derecha, pudiendo asumirse un valor porcentual de estenosis luminal de 8,65 % a consecuencia de la denudación endotelial. Como puede verse, existe una disparidad en el valor de la estenosis arterial estimada mediante arteriografía (15,5 %) o ecografía vascular (8,65 %). Por tanto, la técnica ecográfica se presenta como un método sensible para identificar engrosamientos parietales en la arteriosclerosis experimental tras la denudación arterial y la administración de dieta hiperlipídica en el conejo. Sin embargo, la evaluación ecográfica de la estenosis luminal no es tan precisa como en el método arteriográfico, donde sí obteníamos valores significativamente diferentes.

Un estudio previo realizado por Wetterholm y otros, 2007 en el cayado aórtico de conejos hipercolesterolémicos, concluyó que la ecografía transtorácica es una técnica factible para los estudios de la progresión de la placa ateromatosa, así como para evaluar los seguimientos de las intervenciones. De la misma manera, nuestra técnica de ecografía transabdominal también ha sido útil para la evaluación de la aorta abdominal y la arteria ilíaca, valorándose la respuesta de la pared del vaso a la dieta colestero génica y a los diferentes tratamientos vasculares.

A las 21 semanas de la denudación endotelial, se observa un aumento significativo del IR. También es posible detectar por ecografía irregularidades en el trayecto de los vasos, engrosamientos parietales focales o cambios en la permeabilidad vascular por la presencia de la placa de ateroma desde las 8 semanas de la angioplastia inicial en adelante. Por tanto, puede afirmarse que el efecto de la denudación endotelial es clave en la producción de lesiones ateromatosas en los animales que están sometidos a un régimen hiperlipídico, y que estas lesiones se desarrollan de manera cuantitativa progresivamente en el tiempo. Asimismo,

y con respecto al tipo de ateroma encontrado, el análisis histopatológico permitió diagnosticar un 91% de lesiones de tipo avanzado y temprano, casi un 3 % de lesiones complicadas y menos del 6% de secciones arteriales sanas después de 21 semanas de la denudación, lo que permite suponer que las lesiones también presentan una evolución cualitativa progresiva durante la experiencia.

La adición en la dieta de un 1% de colesterol junto a un 6% de aceite de palma durante 8 semanas provoca lesiones ateromatosas en las arterias del conejo. La extensión de estas lesiones está relacionada tanto con el porcentaje de colesterol añadido como con el tiempo de administración de la dieta. En nuestro estudio hemos obtenido un 70,75% de superficie de la íntima de la aorta afectada por placas de ateroma, porcentaje mayor que en otros estudios. Torres y otros, 2007 encontraron entre un 47,42 y un 57,60 % de lesión en conejos alimentados con 0,3 % de colesterol durante 12 semanas. Cheong y otros, 2010, obtuvieron un 57,2% de superficie afectada en conejos alimentados con un 0,5 % de colesterol durante 4 semanas. Relvas y otros, 2010, obtuvieron mayor porcentaje, un 64,3 % de íntima afectada con 0,5% de colesterol durante 12 semanas.

Yu y otros, 2012 demostraron que la progresión de las lesiones macroscópicas en el conejo es dependiente del tiempo de exposición a la dieta, apareciendo progresivamente las lesiones en el cayado aórtico, aorta torácica y aorta abdominal, a diferencia de lo que ocurre en pacientes humanos, donde es siempre más frecuente la lesión en la aorta abdominal. Estos autores, con un 0,5% de colesterol y un 3 % de aceite de cacahuete, no obtuvieron lesiones en la aorta abdominal hasta las 28 semanas. En cuanto al análisis microscópico de las lesiones, encontraron lesiones similares a las tempranas de los humanos (tipo I, II y III o estría grasa según Stary y otros, 1994/1995) entre las 3 y las 16 semanas, tanto en el cayado aórtico como en la aorta torácica. Las lesiones avanzadas, que se corresponden con las de tipo IV y V, no se obtuvieron hasta las 28 semanas.

En nuestro modelo animal, al aumentar el porcentaje de colesterol, se consigue reducir el tiempo de la ingesta de dieta colesterogénica de 28 a 8 semanas. De la misma manera, hemos obtenido lesiones de tipo avanzado en la aorta abdominal con la adición de un 1% de colesterol y un 6% de aceite de palma durante 8 semanas. Esto resulta interesante a la hora de plantear nuevos protocolos experimentales que reduzcan el tiempo de alojamiento de los animales, siendo que además no se ha producido ninguna baja durante este periodo.

Drew y Tipping, 1995, desarrollaron un modelo con una dieta con 1% de colesterol y 4 % de aceite de cacahuete, administrada durante 2, 4, 8, 12 y 16 semanas. A las 8 semanas

obtuvieron un 76,8, 17 y 13,6% de superficie intimal afectada en cayado, aorta torácica y aorta abdominal respectivamente. Estos resultados difieren de los nuestros, que son mayores en las tres zonas (94,11, 82,63 y 54,24 % respectivamente) pese a utilizar idéntico porcentaje de colesterol y tiempo de administración de la dieta. Por tanto, un 6 % de aceite de palma provoca lesiones de mayor superficie intimal frente a un 4 % de aceite de cacahuete.

En el tercer estudio, se observa una mayor variedad de lesiones en la arteria ilíaca externa izquierda si lo comparamos con el primero. Las lesiones microscópicas encontradas en el estudio sin denudación endotelial son todas tempranas o avanzadas y muy homogéneas. Sin embargo, en el ensayo que combina el efecto de la dieta y la lesión arterial encontramos, además de lesiones de tipo temprano y avanzado, también lesiones complicadas. Por último, la variabilidad lesional es grande, pues encontramos distintos grados de evolución entre lesiones de un mismo tipo.

En el estudio que combina la dieta y la lesión arterial se han identificado lesiones cualitativamente muy tempranas, correspondientes a una alteración en la disposición de las CML. Esta característica morfológica se ha descrito previamente en arterias coronarias tanto en fetos de madres fumadoras, como en niños menores de un año (Milei y otros, 2008). Patogénicamente, el primer paso en la patología coronaria humana es la hiperplasia intimal y la disrupción de la MEI. A continuación se produce la migración de CML desde la media a la íntima mediante movimientos de tipo ameboides, y finalmente tiene lugar el depósito de lípidos, que inicia el desarrollo del ateroma. Estos cambios se encuentran en localizaciones muy susceptibles de desarrollar ateromas, como son las proximidades de las bifurcaciones arteriales (Robertson, 1960). En el conejo parece ocurrir lo mismo, ya que este tipo de lesiones leves las hemos encontrado en la arteria ilíaca externa en zonas cercanas a la bifurcación aórtica. Davies y otros, 1989, define esas alteraciones en las CML no como una lesión, sino como un requisito para la posterior retención y acumulación lipídica, como un paso clave en la aterogénesis.

La dieta aterogénica ha provocado lesiones muy homogéneas de carácter temprano y avanzado en la arteria ilíaca izquierda del primer estudio, mientras que si añadimos al efecto de la dieta una denudación endotelial con catéter de balón encontramos lesiones más heterogéneas y también lesiones complicadas.

La arteria ilíaca derecha del grupo Control del tercer estudio, sometido a dieta de colesterol sin denudación endotelial, nos sirvió de control para evaluar el efecto de la denudación sobre conejos hipercolesterogénicos. Así, encontramos que en la arteria ilíaca

derecha no se desarrollaron lesiones complicadas, mientras que los conejos sometidos además a denudación sí presentan lesiones de este tipo (2,94 %). Además, se observó un mayor porcentaje de muestras sin lesión que en el caso de las arterias denudadas (9,1 % frente a 5,8%). En cuanto a las lesiones tempranas y avanzadas de la arteria ilíaca derecha suman un total de 90,9%, mientras que en la izquierda son 91,18 %. Por tanto, la administración de dieta por sí sola no provoca lesiones ateromatosas complicadas en las paredes arteriales. Estos resultados, aunque no estadísticamente significativos, coinciden con los de LeVein y otros, 1982, que describieron lesiones más graves y mantenidas en el tiempo en conejos sometidos a dieta y denudación endotelial.

Comparando el estudio cualitativo de las lesiones entre los tres grupos (Control, ATP y Crioplastia) se observan diferencias significativas entre ellos. En concreto, más del 50 % de las muestras del grupo Crioplastia presentaron lesiones complicadas con numerosas zonas calcificadas. Por otra parte, el grupo ATP muestra un mayor porcentaje de muestras sin ningún tipo de lesión en comparación a los otros dos grupos. En este sentido, la angioplastia convencional ofrece unos mejores resultados en la reparación del vaso.

Del análisis cuantitativo de las lesiones se obtienen unos resultados muy llamativos. Existen peores resultados en el porcentaje de MEI afectada, estenosis luminal y cociente íntima/media en el tratamiento con el balón de crioplastia con respecto a los grupos Control y ATP, siendo en ambos casos las diferencias estadísticamente significativas. Nuevamente, la crioplastia ofrece peores resultados de lo esperado en cuanto a la reparación de la estenosis arterial.

En ninguno de los parámetros histológicos evaluadores del ateroma se observan diferencias cuantitativamente significativas entre el grupo Control y ATP, aunque en todos los casos se muestran valores mayores en aquél, lo que indicaría una efectividad del tratamiento con ATP frente a los conejos no tratados.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Cheema y otros, 2003, no sin antes aclarar algunas diferencias en cuanto al protocolo experimental realizado en ambos estudios. Estos autores observan que a los 70 días de realizar la crioplastia, existen unos datos negativos con respecto a la luz arterial frente a los tratados con angioplastia convencional.

Nosotros en nuestro modelo, nos encontramos también peores resultados con el tratamiento de crioplastia, habiendo realizado el sacrificio de los animales a los 30 días del mismo. En el estudio de Cheema y otros, 2003 no existe un grupo control en el que se haga la

denudación arterial sin realizar ningún tratamiento. También hay señalar que utilizaron conejos normocolesterogénicos, mientras que en nuestro caso se han utilizado animales hipercolesterogénicos, en un intento de asimilar las lesiones en el momento del tratamiento a las lesiones de la arteriosclerosis humana. Aún con las diferencias en el diseño experimental, los resultados obtenidos coinciden en que la crioplastia no ofrece ventajas frente al tratamiento convencional de las estenosis lumbinales.

Un nuevo hallazgo en el estudio de Cheema y otros, 2003 fue la presencia de cartílago, la formación de hueso y calcificaciones de la capa media en el 60-70% de los segmentos arteriales tratados con crioplastia. En nuestro estudio, también se han observado calcificaciones en el 56,52% de las muestras. Un porcentaje muy similar, teniendo en cuenta que el tiempo desde el tratamiento al sacrificio es casi la mitad.

Un estudio más reciente realizado por Spiliopoulos y otros, 2011, obtiene resultados más alentadores en la eficacia de la crioplastia, aunque existen igualmente varias diferencias en el protocolo experimental que hacen que no sean comparables con nuestros resultados. La principal limitación del estudio, es que utiliza la crioplastia en arterias sanas de conejo, condicionando la extrapolación de sus resultados a la arteriosclerosis humana. Además, estos autores evalúan el efecto del tratamiento a las 72 horas, tiempo muy reducido comparado con los tiempos de permeabilidad conseguidos habitualmente con la angioplastia en pacientes humanos. Como se ha comentado en la introducción, parece ser que la crioplastia puede inducir la apoptosis, y en consecuencia mejorar las tasas de permeabilidad en un ambiente experimental ideal, pero no en uno inflamatorio de lesiones arteriales ateroscleróticas.



CONCLUSIONES

- 1- La administración de un pienso estándar con un 1% de colesterol y un 6 % de aceite de palma durante 60 días en el conejo provoca alteraciones en el perfil hematológico y bioquímico, con leucocitosis, anemia y elevación de las concentraciones plasmáticas de proteínas, creatinina, bilirrubina y ALT, destacando una marcada hiperlipidemia.
- 2- La respuesta hiperlipidémica en el conejo tras la administración de esta dieta es la presentación de un fenotipo aterogénico dislipidémico específico, distinto del que se observa en pacientes humanos con arteriosclerosis. Esta *tríada lipídica* consta de un incremento de la concentración de triglicéridos, HDL-c y, en menor medida, LDL-c. Estas alteraciones tienen un carácter reversible, normalizándose a los 60 días del cese de la dieta.
- 3- En la técnica de cateterización transcarotídea para conejos de 3 meses de edad y 3-3,5 Kg, el catéter de elección es el de balón de 2,5 milímetros inflado a 12 atmósferas de presión, al ofrecer un mayor porcentaje de supervivencia (85 %) con respecto al balón de 3 milímetros inflado a 6 atmósferas (66,7 %).
- 4- La ecografía y la TC no detectan cambios significativos de estenosis en la arteria ilíaca externa tras 60 días de administración de dieta aterogénica, aunque sí lo hacen en la aorta abdominal. El rango normal de referencia del índice de resistencia (IR) aórtico en el conejo es de 0,77 a 0,84, y de 0,81 a 0,87 en la arteria ilíaca externa.
- 5- La arteriografía permite identificar estenosis arteriales provocadas por denudación endotelial dinámica de la arteria ilíaca externa con el uso del catéter de balón 2,5 mm /12 atm, tanto de manera inmediata, con un 46,6 % de estenosis arterial media, como a los 120 días, con un 15,5 %.

- 6- La administración de esta dieta provoca la formación de placas de ateroma en la arteria aorta del conejo y sus ramificaciones, con un grado histopatológico de maduración dependiente de su localización anatómica. Las lesiones arteriales de mayor superficie neointimal y de tipo *temprano* se observan en el cayado aórtico, decreciendo en sentido craneocaudal hasta llegar a la bifurcación aórtica. La extensión de las lesiones de tipo *avanzado* sigue una distribución progresivamente mayor en sentido craneocaudal a lo largo del trayecto aórtico. La arteria ilíaca externa presenta lesiones predominantemente *avanzadas* y con una gran superficie neointimal afectada. Además de las lesiones tempranas y avanzadas obtenidas con la administración de dieta hiperlipídica durante 60 días, la denudación endotelial de la arteria ilíaca externa del conejo permite identificar placas de ateroma de tipo *complicado* a los 150 días de la misma.
- 7- La crioplastia no produce una mejora significativa en la reparación de la estenosis de la arteria ilíaca externa en conejos con arteriosclerosis inducida, presentando lesiones ateromatosas cualitativa y cuantitativamente mayores desde el punto de vista histopatológico en comparación con la angioplastia convencional.

BIBLIOGRAFÍA

- ABELA, G.S., PICON, P.D., FRIEDL, S.E., GEBARA, O.C., MIYAMOTO, A., FEDERMAN, M., TOFLER, G.H., MULLER, E. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation*, 1995; 91, 776–784.
- ABOSHADY, I., CODY, D.D., JOHNSON, E.M., GAHREMANPOUR, A., VELA, D., KHALIL, K.G., DUPONT, H.L., WILLERSON, J.T., BUJA, L.M., GLADISH, G.W. Flat-panel versus 64-channel computed tomography for in vivo quantitative characterization of aortic atherosclerotic plaques. *Int J Cardiol*. 2012; May 3; 156(3):295-302.
- ACHENBACH, S., MOSELEWSKI, F., ROPERS, D., ET AL. Detection of calcified and noncalcified coronary atherosclerotic plaque by contrast-enhanced, submillimeter multidetector spiral computed tomography: a segment-based comparison with intravascular ultrasound. *Circulation* 2004; 109:14-7.
- ADAMS, C.W.M., MILLER, N.E., MORGAN, R.S., RAO, S.N. Lipoprotein levels and tissue lipids in fatty-fibrous atherosclerosis induced in rabbits by two years' cholesterol feeding at a low level. *Atherosclerosis*, 1982; 44, 1–8.
- ÁGUILA, M.R., MARQUINA, R.M. Tratamiento endovascular de la enfermedad arterial oclusiva periférica (EAPO) sector infrainguinal. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 2007; Vol. 5, 197-208.
- AIKAWA, M., RABKIN, E., VOGLIC, S.J., SHING, H., NAGAI, R., SCHOEN, F.J., LIBBY, P. Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res*, 1998; 83, 1015–1026.
- ALFONSO-VALIENTE, A., ALMEIDA-CARRALERO, G., QUINTELA-PENA, A.M., SIMÓN-CARBALLO, R. Evaluación de un posible modelo experimental de aterosclerosis carotídea en conejos hipercolesterolémicos. *Rev Cubana Invest Biomed*, 2001;20 (3);192-6.
- ANTIGNANI, P.L. Treatment of chronic peripheral arterial disease. *Curr Vasc Pharmacol*, 2003 Jun; 1 (2): 205-216.
- ANTTSCHKOW, N. Über die atheroclerose der aorta beim kaninchen und über deren entstehungsbedingungen. *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol*, 1914; 59:308-348.
- ARMSTRONG, M.L., HEISTAD, D.D. Animal models of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1990; 85: 15-23.

- BADIMON, L. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thromb Haemost*, 2001; 86:356-65.
- BADIMON, J.J., 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.
- BAKER, J.D., DIX, D.E. Variability of Doppler ankle pressures with arterial occlusive disease: an evaluation of ankle index and brachial-ankle pressure gradient. *Surgery*, 1981; 89:134-7.
- BALASUBRAMANIAN, S.K., VENKATASUBRAMANIAN, R.T., MENON, A., BISCHOF, J.C. Thermal injury prediction during cryoplasty through in vitro characterization of smooth muscle cell biophysics and viability, *Ann. Biomed. Eng.* 2008; 36 (1) 86–101.
- BARONE, R. Anatomie comparee des mammifères domestiques. Tome 5. Angiologie. Ed. Vigot Frères, 1996 ; Pag 125 – 135.
- BAUMGARTNER, H.R. A new method for the induction of thrombi by controlled over-dilatation of the vascular wall. *Z Gesamte Exp Med*, 1963; Sep 12; 137:227-47.
- BAUMGARTNER, C., BOLLERHEY, M., HENKE, J., WAGNER, S., UNGERER, M. Effects of propofol on ultrasonic indicators of haemodynamic function in rabbits. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 2008; 35, 100–112.
- BEATY, T.H., PRENGER, V.L., VIRGIL, D.G., LEWIS, B., KWITEROVICH, P.O., BACHORIK, P.S. A genetic model for control of hypertriglyceridemia and apolipoprotein B levels in the Johns Hopkins colony of St. Thomas Hospital rabbits. *Genetics*, 1992; 132:1095-104.
- BOCAN, T.M.A., MUELLER, S.B., MAZUR, M.J., UHLENDORF, P.D., BROWN, E.Q., KIEFT, K.A. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis*, 1993; 102; 9-22.
- BOOTH, D.C.; CUNNINGHAM, M.R.; ROUNTREE, R. M.; ELION, J.; NISEE, S.E., GILLESPIE, M.N. Coronary arteriography in the intact rabbit: demonstration of coronary vasomotor and electrocardiographic effects of ergonovine and indomethacin in rabbits after abrupt cessation of prolonged nitroglycerin treatment. *Am Heart J*, 1987; 114(2):343-9.
- BRAMMER, D.W., DOERNING, B.J., CHRISP, C.E., RUSH, H.G. Anesthetic and nephrotoxic effects of Telazol in New Zealand white rabbits. *Lab Anim Sci*, 1991 Oct; 41(5):432-5.

- BRESLOW, J. Genetic differences in endothelial cells may determine atherosclerosis susceptibility. *Circulation* 2000; 102: 5-6.
- CAO, P., DE RANGO, P., ZANNETTI, S. Eversion vs conventional carotid endarterectomy: A systematic review. *European Journal of Vascular and Endovascular. Surgery*, 2002; 23(3):195-201.
- CARTER, A.M., GÖTHLIN, J., BENGTSSON, L.P. Effect of vasopressin on the uteroplacental circulation: an angiographic study in the rabbit. *J Reprod Fertil*, 1968; Dec 17(3):419-26.
- CHEEMA, A.N., NILI, N., LI, C.W. ET AL. Effects of intravascular cryotherapy on vessel wall repair in a balloon-injured rabbit iliac artery model. *Cardiovasc Res*, 2003; 59:222–233.
- CHEN, F.M., LEE, Y.T., HSU, H.C. ET AL. Effects of dietary supplementation with fish oil on atherosclerosis and myocardial injury during acute coronary occlusion-reperfusion in diet induced hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol*, 1992; 35 (3):323-331.
- CHEONG S.H., KIM, M.Y., SOK, D.E., HWANG, S.Y., KIM, J.H., KIM, H.R., LEE, J.H., KIM, Y.B., KIM, M.R. Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hipercolesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2010; 56:34-40.
- CLAKE, K., HALL, L.W. A survey of anesthesia in small animal practice: AVA/BSAVA report. *Journal of the Association of Veterinary Anesthetists*, 1990; 17:4 – 10.
- CLOWES, A.W., REIDY, M.A., CLOWES, M.M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endotelium. *Lab Invest* 1983; 49:327-33.
- COLEY, B.D., ARELLANO, R.S., TALNER, L.B., BAKER, K.G., PETERSON, T., MATTREY, R.F. Renal resistive index in experimental partial and complete ureteral obstruction. *Acad Radiol*, 1995; May; 2(5):373-8.
- CORNHILL, J.F., ROACH, M.R. A quantitative study of the localization of atherosclerotic lesions in the rabbit aorta. *Atherosclerosis*, 1976; 23, 489–501.
- CORTÉS, M.J., DÍEZ-JUAN, A., PÉREZ, P., PÉREZ-ROGER, I., ARROYO-PELLICER, R., ANDRÉS, V. Increased early atherogenesis in young versus old hypercholesterolemic rabbits by a mechanism independent of arterial cell proliferation. *FEBS Letters*, 2002; 522:99-103.

- CRIQUI, M.H., LANGER, R.D., FRONEK, A., FEIGELSON, H.S., KLAUBER, M.R., McCANN, T.J. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med*, 1992; 326:381-6.
- DALEY, S.J., KLEMP, K.F., GUYTON, J.R., ROGERS, K.A. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis, II: differing morphological severity of atherogenesis despite matched plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb*, 1994; 14:105-14.
- DASKALOPOULOU, S.S., DASKALOPOULOS, M.E., LIAPIS, C.D., MIKHAILIDIS, D.P. Peripheral arterial disease: a missed opportunity to administer statins so as to reduce cardiac morbidity and mortality. *Curr Med Chem*, 2005; 12 (4): 443-452.
- DAVIES, H., AL-TIKRITI S. Coronary arterial pathology in the transplanted human heart. *Int J Cardiol*, 1989; 25:99-117.
- DE MULDER, P.A., VAN KERCKHOVEN, R.J., ADRIAENSEN, H.F., GILLEBERT, T.C., DE HERT, S.G. Continuous total intravenous anesthesia, using propofol and fentanyl in an open-thorax rabbit model: evaluation of cardiac contractile function and biochemical assessment. *Lab Anim Sci*, 1997; Aug; 47 (4):367-75.
- DIAZ, M.L., URTASUN, F., BARBERENA, J., ARANZADI, C., GUILLEN-GRIMA, F., BILBAO, J.I. Cryoplasty versus conventional angioplasty in femoropopliteal arterial recanalization: 3-year analysis of reintervention-free survival by treatment received. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2011; Oct, 34(5):911-7.
- DIEHM, N., BAUMGARTNER, I., JAFF, M. ET AL. A call for uniform reporting standards in studies assessing endovascular treatment for chronic ischaemia of lower limb arteries. *Eur Heart J*, 2007; 28:798–805.
- DOERNING, B.J., BRAMMER, D.W., CHRISP, C.E., RUSH, H.G. Nephrotoxicity of tiletamine in New Zealand white rabbits. *Lab Anim Sci*, 1992; Jun; 42(3):267-9.
- DORMANDY, J.A., RUTHERFORD, R.B. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic InterSociety Consensus (TASC). *J Vasc Surg*, 2000; 31(1 Pt 2): S1–296.

- DOTTER, C.T., JUDKINS, M.P. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. Description of a new technic and a preliminary report of its application. *Circulation*, 1964; Nov; 30:654-70.
- DREW, A.F., TIPPING, P.G. T Helper cell infiltration and foam cell proliferation are early events in the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995; 15:1563-1568.
- DUARTE, M.A., SCORZA, T. Efecto de dietas suplementadas con ácidos grasos saturados o poliinsaturados sobre parámetros hematológicos, hemostáticos y lipoproteicos: relación con modificaciones histológicas en aorta torácica y abdominal en conejos. *Acta Científica Venezolana*, 2004; 55: 264-275.
- DUPRAS, J., VACHON, P., CUVELLIEZ, S., BLAIS, D. Anesthesia of the New Zealand rabbit using the the combination of tiletamine-zolazepam and ketamine-midazolam with or without xylazine. *Can Vet J*, 2001; Jun, 42(6):455-60.
- FAVA, M., LOYOLA, S., POLYDOROU, A. ET AL. Cryoplasty for femoropopliteal arterial disease: late angiographic results of initial human experience. *J Vasc Interv Radiol*, 2004; 15: 1239-1243.
- FAXON, D.P., WEBER, V.J., HAUDENSCHILD, C., GOTTSMAN, S.B., MCGOVERN, W.A., RYAN, T.J. Acute effects of transluminal angioplasty in three experimental models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1982; 2:125-133.
- FAYAD, Z.A., FUSTER, V. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circ Res*, 2001; 89:305-16.
- FAYAD, Z.A., SIROL, M., NIKOLAOU, K., CHOUDHURY, R.P., FUSTER, V. Magnetic resonance imaging and computed tomography in assessment of atherosclerotic plaque, *Curr Atheroscler Rep*, 2004; May; 6(3):232-42.
- FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. Schalm's. *Veterinary haematology*. Lippincott Williams & Wilkins. Fifth edition, 2000.
- FERNANDEZ, M.L., WILSON, T.A., CONDE, K., VERGARA-JIMENEZ, M., NICOLOSI, R.J. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, or cholesterol content. *J Nutr*, 1999; 129, 1323–1332.

- FINKING, G., HANKE, H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis*, 1997; Nov; 135, 1-7.
- FISHMAN, J.A., RYAN, G.B., KAMOVSKY, M.J. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest*, 1975; 32:339-351.
- FLECKNELL, P.A. Laboratory animal anaesthesia. A practical introduction for research workers and technicians. Second edition, 1996; Pag. 159, 182, 183.
- FLECKNELL, P.A. Manual de Anestesia y Analgesia en pequeños animales. 2001, 1ª Ed: 397 – 404.
- FLÓREZ-TASCÓN, F.J., LAHER, E., MENCÍAS, E., GONZÁLEZ, J.A., GOYA, J., CASO, J. Atherosclerosis: epidemiología, prevención, factores de riesgo. *Geriatrka* 1990; 6: 240-53.
- FRANCH, J., LÓPEZ, C. Atlas de abordajes quirúrgicos en traumatología. Tomo 2, Temis Network 2001, pg 146-48.
- FOWKES, F.G. The measurement of atherosclerotic peripheral arterial disease in epidemiological surveys. *Int J Epidemiol*, 1988; 17:248-54.
- FUSTER, V., BADIMON, L., BADIMON, J.J., CHESEBRO, J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes I. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-50.
- FUSTER, V., BADIMON, L., BADIMON, J.J., CHESEBRO, J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes II. *N Engl J Med*, 1992; 326: 310-8.
- GIANNINI, E.G., SAVARINO, V. Thrombocytopenia in liver disease. *Curr Opin Hematol*, 2008 Sep; 15(5):473-80.
- GRINT, N.J., MURISON, P.J. Peri-operative body temperatures in isoflurane-anaesthetized rabbits following ketamine-midazolam or ketamine-medetomidine. *Vet Anaesth Analg*. 2007 May; 34(3):181-9.
- GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.E., DIAGO-SANTAMARÍA, M.V., VAQUERO-PUERTA, C. Estudio comparativo de la reparación intimal de la aorta de animales jóvenes y viejos ateromatosos. *Angiología*, 2005; 57(1):47-60.
- GOLDBOURT, U.N., NEUFELD, H.N. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1988; 6: 357-377.

- GRASSL, E.D., BISCHOF, J.C. In vitro model systems for evaluation of smooth muscle cell response to cryoplasty. *Cryobiology*, 2005; 50:162–173.
- GRØNHOLDT, M.L., WAGNER, A., WIEBE, B.M., ET AL. Spiral computed tomographic imaging related to computerized ultrasonographic images of carotid plaque morphology and histology. *J Ultrasound Med*, 2001; 20:451-8.
- GRUNTXIG, A., HOPFF, H. Perkitane rekanalitation chronischer arterieller verschlusse mit einen neuen dilatations Katheter: modification des Dotter Technik. *Dtsch Med Wochenschr*, 1974; 99:2502-2505.
- GRÜNTZIG, A.R., SENNING, A., SIEGENTHALER, W. Non-operative dilatation of coronary artery stenosis: Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N. Engl J Med*, 1979; 301:61-68.
- HALPERIN, J.L. Evaluation of patients with peripheral vascular disease. *Thromb Res*. 2002 Jun; 106 (6): V303- 311.
- HAYASHIDA, M., FUKUNAGA, A., FUKUDA, K., YAMAZAKI, S.Y., ARITA, H., HANAOKA, K. A rabbit model for evaluation of surgical anesthesia and analgesia: Characterization and validation with isoflurane anesthesia and fentanyl analgesia. *J Anesth*, 2004; 18(4):282-91.
- HELLEBREKERS, L.J., DE BOER, E.J., VAN ZUYLEN, M.A., VOSMEER, H. A comparison between medetomidine-ketamine and medetomidine-propofol anaesthesia in rabbits. *Lab Anim*, 1997; 31(1): 58-69.
- HENKE, J., ASTNER, S., BRILL, T., EISSNER, B., BUSCH, R., ERHARDT, W., Comparative study of three intramuscular anaesthetic combinations (medetomidine / ketamine, medetomidine / fentanyl / midazolam and xylazine / ketamine) in rabbits. *Vet Anaesth Analg*, 2005; Sep, 32(5):261-70.
- HERRERA, V.L.M., MAKRIDES, S.C., XIE, H.X., ADARI, H., KRAUSS, R.M., RYAN, U.S., RUIZ-OPAZO, N. Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein. *Nat Med*, 1999; 5, 1383–1389.
- HILLEMANN, D.E. Management of peripheral arterial disease. *Am J Health Syst Pharm*, 1998; Oct 1; 55 (19 Suppl 1): 21-27.

- HILLYER, E.V., QUESENBERRY, K.E. Ferrets, Rabbits and Rodents. Clinical Medicine and Surgery. Ed. WB Saunders Philadelphia. First edition, 1997: 165, 382.
- HIRSCH, A.T., CRIQUI, M.H., TREAT-JACOBSON, D., REGENSTEINER, J.G., CREAGER, M.A., OLIN, J.W. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. JAMA, 2001; 286: 1317-24.
- HIRSCH, A.T., HASKAL, Z.J., HERTZER, N.R., BAKAL, C.W., CREAGER, M.A., HALPERIN, J.L. ACC/AHA 2006 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. Circulation, 2006; 113:e463-e54.
- HOLMAN, R.L., MCGILL, H.C., STRONG, J.P., GEER, J.C. Technics for studying atherosclerotic lesions. Lab Invest, 1958; 7: 42-47.
- HUIJBREGTS, H.J.T.A.M., DE BORST, G.J., VELDHIJS, W.B., VERHAGEN, H.J.M., VELEMA, E., PASTERKAMP, G., MOLL, F.L., BLANKESTIJN, P.J., HOEFER, I.E. Cryoplasty of the venous anastomosis for prevention of intimal hyperplasia in a validated porcine arteriovenous graft model. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2010; 39, 620-626.
- HUR, J., KIM, Y.J., SHIM, H.S., LEE, H.J., NAM, J.E., CHOE, K.O., CHOI, B.W. Assessment of atherosclerotic plaques in a rabbit model by delayed-phase contrast-enhanced CT angiography: comparison with histopathology. Int J Cardiovasc Imaging, 2012; Feb; 28(2):353-63.
- HUSSAIN, M.M., INNERARITY, T.L., BRECHT, W.J., MAHLEY, R.W. Chylomicron metabolism in normal, cholesterol-fed, and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Saturation of the sequestration step of the remnant clearance pathway. J Biol Chem, 1995; Apr 14; 270(15):8578-87.
- HUTTER, R., SAUTER, B., FALLON, J. Macrophages and carotid plaques are prone to apoptosis and tissue factor expression. J Am Coll Cardiol, 2001; 37 (Suppl A): 288A.

- IGNATOWSKI, A.I. Influence of animal food on the organism of rabbits. S. Perterb Izv Imp Voyenno Med Akad , 1908; 16:154-176.
- JOHNSTONE, M.T., BOTNAR, R.M., PEREZ, A.S., STEWART, R., QUIST, W.C., HAMILTON, J.A., MANNING, W.J. In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001; 21, 1556–1560.
- JORIS, I., ZAND, T., NUNNARI, J.J., KROLIKOWSKI, F.J., MAJNO, G. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. *Am J Pathol*, 1983; 113: 341-58.
- JOYE, J.D. The Clinical Application of Cryoplasty for Infrainguinal Peripheral Arterial Disease *Tech Vasc Interventional Rad*, 2005; 8:160-164.
- KAGAWA, R., MORITAKE, K., SHIMA, T., ET AL. Validity of B-mode ultrasonographic findings in patients undergoing carotid endarterectomy in comparison with angiographic and clinicopathologic features. *Stroke*, 1996; 27:700-5.
- KAINUMA, M., FUJIMOTO, M., SEKIYA, N., TSUNEYAMA, K., CHENG, C., TAKANO, Y., TERASAWA, K., SHIMADA, Y.J. Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis. *Gastroenterol*, 2006; Oct, 41(10):971-80.
- KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press. Fifth edition, 1997.
- KARNABATIDIS, D., KATSANOS, K., DIAMANTOPOULOS, A., KAGADIS, G.C., SIABLIS, D. Transarterial or venous access for cardiovascular experimental protocols in animals. *J Vasc Interv Radiol*, 2006; Nov, 17(11 Pt 1):1803-11.
- KHAN, S., CLEANTHIS, M., SMOUT, J., FLATHER, M., STANSBY, G. Life-style modification in peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2005; Jan; 29 (1): 2-9.
- KIM, M.S., JEONG, S.M., PARK, J.H., NAM, T.C., SEO, K.M. Reversal of medetomidine-ketamine combination anesthesia in rabbits by atipamezole. *Exp Anim*, 2004; Oct, 53(5):423-8.

- KOLOUDGIE, F.D., KATOCS, A.S. JR., LARGIS, E.E., WRENN, S.M., CORNHILL, J.F., HERDERICK, E.E., LEE, S.J., VIRMANI, R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996; 16, 1454–1464.
- KONO, Y., PINNELL, S.P., SIRLIN, C.B., ET AL. Carotid arteries: contrast-enhanced US angiography—preliminary clinical experience. *Radiology*, 2004; 230:561-8.
- KRANKENBERG. H., SCHLUTER, M., STEINKAMP, H.J. ET AL. Nitinol stent implantation versus percutaneous transluminal angioplasty in superficial femoral artery lesions up to 10 cm in length: the femoral artery stenting trial (FAST). *Circulation*, 2007; 116:285–292.
- KRITCHEVSKY, D., TEPPER, S.A., VESSELINOVITCH, D., WISSLER, R.W. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis, II: peanut oil. *Atherosclerosis*, 1971; 14:53-64.
- LAIRD, J.R. Limitations of percutaneous transluminal angioplasty and stenting for the treatment of disease of the superficial femoral and popliteal arteries. *J Endovasc Ther*, 2006; 13(Suppl 2):II30–II40.
- LAIRD, J., JAFF, M.R., BIAMINO, G. ET AL. Cryoplasty for the treatment of femoropopliteal arterial disease: results of a prospective, multi-center registry. *J Vasc Interv Radiol*, 2005; 16:1067-1073.
- LETH-ESPENSEN, P., STENDER, S., RAVN, H., KJELDTSEN, K. Antiatherogenic effect of olive and corn oils in cholesterol-fed rabbits with the same plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1988; 8:281-287.
- LEVEEN, R.F., WOLF, G.L., VILLANUEVA, T.G. New rabbit atherosclerosis model for the investigation of transluminal angioplasty. *Invest Radiol*, 1982; Sep-Oct; 17(5):470-5.
- LEVEEN, R.F., WOLF, G.L., BIERY, D. Angioplasty-induced vasospasm in rabbit model. Mechanisms and treatment. *Invest Radiol*, 1985; Dec, 20(9):938-44.
- L. TEN KATE, G.L., SIJBRANDS, E.J., STAUB, D., COLL, B., L. TEN CATE, F.J., FEINSTEIN, S.B., SCHINKEL, A.F.L. Noninvasive Imaging of the Vulnerable Atherosclerotic Plaque. *Curr Probl Cardiol*, 2010; 35:556-591.
- LIPMAN, N.S., PHILLIPS, P.A., NEWCOMER, C.E. Reversal of ketamine/ xylazine anaesthesia in the rabbit with yohimbine. *Laboratory Animal Science*, 1987; 37, 474-477.

- LUSIS, A.J., WEINREB, A., DRAKE, T.A. Textbook of Cardiovascular Medicine. Topol EJ, Editor. Lippincott-Raven: Philadelphia, 1998. p. 2389–2413.
- McCULLAGH, K.G., EHRHART, L.A., BUTKUS, A. Experimental canine atherosclerosis and its prevention. *Lab Invest*, 1976; 34:394-405.
- MCNALLY, M.A., SMALL, J.O., MOLLAN, R.A.B., WILSON, D.J. Arteriographic study of the rabbit lower limb. *Anat. Rec*, 1992; 233: 643-650.
- MAILLARD, L., VAN BELLE, E., TIO, F.O., RIVARD, A., KEARNEY, M., BRANELLEC, D., STEG, P.G., ISNER, J.M., WALSH, K. Effect of percutaneous adenovirus-mediated Gax gene delivery to the arterial wall in double-injured atheromatous stented rabbit iliac arteries. *Gene Ther*. 2000 Aug; 7(16):1353-61.
- MANDERSON, J.A., MOSSE, P.R., SAFSTROM, J.A., YOUNG, S.B., CAMPBELL, G.R. Balloon Catheter Injury to Rabbit Carotid Artery I. Changes in Smooth Muscle Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1989; 9:289-298.
- MATHERS, C.D., LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 2006; 3:e442.
- MEHRABIAN, M., WEN, P-Z., FISLER, J., DAVIS, R.C., LUSIS, A.J. Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model. *J Clin Invest*, 1998; 101: p. 2485–2496.
- MEURICE, T., BAUTERS, C., AUFRAY, J.L., VALLET, B., HAMON, M., VALERO, F., VAN BELLE, E., LABLANCHE, J.M., BERTRAND, M.E. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation*, 1996; Jan 1; 93(1):18-22.
- MEYER, D.J., HARVEY, J.W. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis*, Chap. 9. February 18, 2004.
- MILEI, J., OTTAVIANI, G., LAVEZZI, A.M., GRANA, D.R., STELLA, I., MATTURRI, L. Perinatal and infant early atherosclerotic coronary lesions. *Can J Cardiol*, 2008; Feb, 24(2):137-41.
- MULLER, D.W., ELLIS, S.G., TOPOL, E.J. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol*, 1992; 19:418-32.

- NÁCHER, M., SERRANO-MOLLAR, A., MONTSERRAT, J.M. Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS). De la biología a la clínica. Junio 2007. Número Supl.2- Volumen 43 p. 40 – 47.
- NEWMAN, A.B., SHEMANSKI, L., MANOLIO, T.A., CUSHMAN, M., MITTELMARK, M., POLAK, J.F. Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 538-45.
- NIGHOGHOSSIAN, N., DEREK, L., DOUEK, P. The Vulnerable Carotid Artery Plaque: Current Imaging Methods and New Perspectives, 2005; 2764-2772.
- O'LEARY D.H., POLAK J.F., KRONMAL R.A. ET AL. Carotid artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *N Engl J Med*, 1999; 340:14.
- OLSON, M.E., VIZZUTTI, D., MORRIS, D.W., COX, A.K. The parasympatholytic effects of atropine sulphate and glycopyrrolate in rats and rabbits. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1993; 57, 254-258.
- ORLANDI, A., MAURIELLO, A., DE ANGELIS, C., RAMACCI, M.T., SPAGNOLI, L.G. Age-related differences in the distribution and occurrence of atherosclerotic aortic lesions in the hyperlipemic rabbit. *Arch Gerontol Geriatr*, 1992; 16:295-302.
- ORR, H.E., ROUGHAN, J.V., FLECKNELL, P.A. Assessment of ketamine and medetomidine anaesthesia in the domestic rabbit. *Vet Anaesth Analg*, 2005; 32(5):271-9.
- OURIEL, K. Peripheral arterial disease. *Lancet*, 2001; Oct 13, 358 (9289): 1257-64.
- PALMER-KAZEN, U., WAHLBERG, E. Arteriogenesis in peripheral arterial disease. *Endothelium*, 2003; 10 (4-5): 225-232.
- PERLMAN, H., MAILLARD, L., KRASINSKI, K., WALSH, K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*, 1997; Feb 18; 95(4):981-7.
- POLISCA, A., SCOTTI, L., ORLANDI, R., BRECCHIA, G., BOITI, C. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in rabbits. *Theriogenology*, 2010; Feb; 73(3):358-66.

- POST, M.J., DE SMET, B.J., VAN DER, H.Y., BORST, C., KUNTZ, R.E. Arterial remodeling after balloon angioplasty or stenting in an atherosclerotic experimental model. *Circulation*, 1997; 96:996–1003.
- PRATI, F., ARBUSTINI, E., LABELLARTE, A., ET AL. Correlation between high frequency intravascular ultrasound and histomorphology in human coronary arteries. *Heart*, 2001; 85(5):567–70.
- RELVAS, W.G.M., IZAR, M.C.O., SEGRETO, H.R.C., GIORDANI, A.J., IHARA, S.S.M., ET AL. Resident peritoneal inflammatory cells are pivotal in the development of experimental atherosclerosis. *J Atheroscler thromb*, 2010; 17: 378-385.
- RIGATELLI, G., CARDAIOLI, P., GIORDAN, M. Endovascular treatment of femoro-popliteal obstructive disease. *Minerva Cardioangiol*, 2007; Feb, 55(1):125-32.
- ROBERTSON, J.H. Stress zones in foetal arteries. *J Clin Pathol*, 1960; 13:133-9.
- ROBERTSON, S.A., EBERHART, S. Efficacy of the intranasal route for administration of anesthetic agents to adult rabbits. *Lab. Animal Sci*, 1994; Apr, 44(2): 159-65.
- RODRÍGUEZ-PIÑERO, M., LINARES-PALOMINO, J.P., GARCÍA-RÓSPIDE, V., SALMERÓN-FEBRES, L.M., MORENO-ESCOBAR, G., URBANO-VALERO, G., ET AL. Un modelo animal para el estudio de la arterosclerosis experimental. *Angiología*, 1998; 3, 133-138.
- ROGERS, K.A., KARNOVSKY, M.J. A rapid method for the detection of early stages of atherosclerotic lesion formation. *Am J Pathol*, 1988; 133, 451–455.
- ROSS, A.C., MINICK, C.R., ZILVERSMIT, D.B. Equal atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free, low-fat diet or cholesterol-supplemented diet. *Atherosclerosis*, 1978; 29:301-15.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med*, 1986; 314: 488-500.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1900s. *Nature*, 1993; 362: 801-9.
- ROSS, R. Atherosclerosis –an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999; 340: 115-26.
- RUSSELL, J.C., KOESLAG, D.G., DOLPHIN, P.J., AMY, R.M. Beneficial effects of acarbose in the atherosclerosis-prone JCR: LA-corpulent rat. *Metabolism*, 1993; 42, 218–223.

- SABA, L., CADDEO, G., SANFILIPPO, R., ET AL. CT and ultrasound in the study of ulcerated carotid plaque compared with surgical results: potentialities and advantages of multidetector row CT angiography. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2007; 28:1061-6.
- SAREMBOCK, I. The limitations of the rabbit athero/injury model. *J Vasc Surg*, 1995; 22:93-4.
- SAVOLA, J.M. Cardiovascular actions of medetomidine and their reversal with atipamezole. *Acta Vet Scand*, 1989; 85: 39-47.
- SCHAINFELD, R.M. Management of peripheral arterial disease and intermittent claudication. *J Am Board Fam Pract*, 2001; Nov-Dec, 14 (6): 443-450.
- SCHMIEDER, G.C., MD, CARROLL, M., PANNETON, J.M. Poor outcomes with cryoplasty for lower extremity arterial occlusive disease. *J Vasc Surg*, 2010; 52: 362-8.
- SCHMIEDER, F.A., COMEROTA, A.J. Intermittent claudication: magnitude of problem, patient evaluation, and therapeutic strategies. *Am J Cardiol*, 2001; Jun 28, 87 (12A): 3D-13D.
- SCHWARTZ, R.S., TOPOL, E.J., SERRUYS, P.W., SANGIORGI, G., HOLMES, D.R.J.R. Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. *J Am Coll Cardiol*, 1998; 32:2087-2094.
- SCHWENKE, D.C., CAREW, T.E. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits, I: focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*, 1989; 9:895-907.
- SELDINGER, S.I. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography; a new technique. *Acta Radiologica*, 1953; May, 39(5):368-76.
- SEO, T.S., OH, J.H., LEE, D.H. KO, Y.T., YOON, Y. Radiologic anatomy of the rabbit liver on hepatic venography, arteriography, portography, and cholangiography. *Invest Radiol*, 2001; 36: 186-192.
- SHIH, J.C.H., PULLMAN, E.P., KAO, K.J. Genetic selection, general characterization, and histology of atherosclerosis susceptible and -resistant Japanese quail. *Atherosclerosis*, 1983; 49, 41-53.
- SILVA, G.V., FERNANDES, M.R., CARDOSO, C.O., MIRANDA, W.R., STRICKMAN, N., MORTAZAVI, A., HERNANDEZ-VILA, E.A., ACHARI, A., KRAJECER, Z. Cryoplasty for Peripheral Artery Disease in an Unselected Patient Population in a Tertiary Center. *Tex Heart Inst J*, 2011; 38(2):122-6.

- SPAGNOLI, L. G., ORLANDI, A., MAURIELLO, A. ET AL. Aging and atherosclerosis in the rabbit. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1991; 89:11-24.
- SPILIOPOULOS, S., KATSANOS, K., KARNABATIDIS, D., DIAMANTOPOULOS, A., KAGADIS, J.C., CHRISTEAS, N., SIABLIS, D. Cryoplasty Versus Conventional Balloon Angioplasty of the Femoropopliteal Artery in Diabetic Patients: Long-Term Results from a Prospective Randomized Single-Center Controlled Trial. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2010; 33:929-938.
- SPILIOPOULOS, S., DIAMANTOPOULOS, A., KATSANOS, K., RAVAZOULA, P., KARNABATIDIS, D., SIABLIS, D. PolarCath cryoplasty enhances smooth muscle cell apoptosis in a rabbit iliac artery model: An experimental in vivo controlled study *Cryobiology*, 2011; 63:267-272.
- ST JOHN, L.C., BELL, F.P. Arterial lipid biochemistry in the spontaneously hyperlipidemic Zucker rat and its similarity to early atherogenesis. *Atherosclerosis*, 1991; 86, 139-144.
- STARY, H.C., CHANDLER, A.B., GLAGOV, S., GUYTON, J.R., INSULL, W., ROSENFELD, M.E., SCHAFFER, S.A., SCHWARTZ, C.J., WAGNER, W.D., WISSLER, R.W. 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: 2462-78.
- STARY, H.C., CHANDLER, A.B., DINSMORE, R.E., FUSTER, V., GLALOV, S., INSULL, W., ROSENFELD, M.E., SCHWARTZ, C.J., WAGNER, W.D., WISSLER, R.W. 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. *Circulation*, 1995; 92: 1355-74.
- STARY, H.C. The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Atherosclerosis and coronary artery disease*, edited by V. Fuster, R. Ross, and E.J. Topol. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.
- STEELE, P.M., CHESEBRO, J.H., STANSON, A.W., HOLMES, D.R., DEWANJEE, M.K., BADIMON, L. ET AL. Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res*, 1985; 57: 105-12.
- STEMERMAN, M.B., ROSS, R. Experimental arteriosclerosis. I. Fibrous plaque formation in primates, an electron microscope study. *J Exp Med*, 1972; 136:769-789.

- STRAUSS, B.H., CHISHOLM, R.J., KEELEY, F.W., GOTLIEB, A.I., LOGAN, R.A., ARMSTRONG, P.W. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res*, 1994; 75: 650–658.
- TASC. Management of peripheral arterial disease (PAD). TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 19 Suppl A: SIXXVIII, S1-S250.
- TAYLOR, J.M., FAN, J. Transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 1997; 2, 298–308.
- TEDGUI, A., MALLAR, Z. Apoptosis as a determinant of atherotrombosis. *Thromb Haemost*, 2001; 86: 420-6.
- TEPE, G., SCHMEHL, J., HELLER, S., WIESINGER, B., CLAUSSEN, C.D., DUDA, S.H. Superficial femoral artery: current treatment options. *Eur Radiol*, 2006; 16:1316–1322.
- THOMPSON, K.H., ZILVERSMIT, D.B. Plasma very low density lipoprotein (VLDL) in cholesterol-fed rabbits: chylomicron remnants or liver lipoproteins? *J Nutr*, 1983; 113:2002-10.
- TSAI, A.W., FOLSOM, A.R., ROSAMOND, W.D., JONES, D.W. Ankle-brachial index and 7-year ischemic stroke incidence: the ARIC study. *Stroke*, 2001; 32:1721-4.
- TSURUTA, W., YAMAMOTO, T., SUZUKI, K., YOSHIDA, F., MATSUMURA, A. Simple new method for making a rat carotid artery post-angioplasty stenosis model. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2007; Nov, 47(11):525- 9.
- TOBIS, J.M., MALLERY, J., MAHON, D. ET AL. Intravascular ultrasound imaging of human coronary arteries in vivo. Analysis of tissue characterizations with comparison to in vitro histological specimens. *Circulation*, 1991; 83(3):913–26.
- TORRES, M., CARRIZALES, M., SUTIL, R., MÁRQUEZ, M., MUÑOZ, M., REIGOSA, A. y BARRIOS, V. Efecto del diltiazem sobre los lípidos séricos y lesiones ateroscleróticas en conejos hipercolesterolemicos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 2007; 26 (2): 120-126.
- VACHON, P. Self-mutilation in rabbits following intramuscular ketamine-xylazine-acepromazine injections. *Can Vet J*, 1999; Aug, 40(8):581-2.
- VAN ERVEN, L., VELEMA, E., BOS, A.N., POST, M.J., BORST, C. Thrombogenicity and intimal hyperplasia after conventional and thermal balloon dilation in normal rabbit iliac arteries. *J Vasc Res*, 1992; Nov-Dec, 29(6):426-34.

- VASSELINOVITCH, D. Animal models and the study of atherosclerosis. Arch Pathol Lab Med, 1988; 112:1011-7.
- VELICAN, C., VELICAN, D. The precursors of coronary atherosclerotic plaques in subjects up to 40 years old. Atherosclerosis, 1980; 37:33-46.
- VENKATASUBRAMANIAN, R.T., WOLKERS, W.F., SHENOI, M.M. ET AL. Freeze-thaw induced biomechanical changes in arteries: role of collagen matrix and smooth muscle cells, Ann Biomed Eng, 38 (3) (2010) 694–706.
- VILLA, R., RODRIGO, J.A. Arteriopatía periférica. En: Arturo Louro. Guías para la consulta de atención primaria. 1ª edición. A Coruña, 2003: 47-54.
- VIRCHOW, R. Gesammelte Adhandlunger zur Wissenschaftlichen Medicin Meidingir Sohn and Company, Frankfurt am main, 1856; 458.
- VON ROKITANSKY, C. A manual of pathological anatomy. Berlin: Syndheman, 1852; 261.
- WANG, S., GARNER, D.J., ROMANO, M., PENG, S.K., GOLDBERG, S.L., FRENCH, W.J. A Simple, Reproducible Animal Model of Arterial Occlusion with Mixed Thrombus. J Thromb Thrombolysis, 1996; 3(4):337-341.
- WARDLAW, J.M., CHAPPELL, F.M., BEST, J.J.K., ET AL. Non-invasive imaging compared with intra-arterial angiography in the diagnosis of symptomatic carotid stenosis: a meta-analysis. Lancet, 2006; 367:1503-12.
- WATANABE, Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). Atherosclerosis, 1980; 36:261-8.
- WEST, C.E., DEURING, K., SCHUTTE, J.B., TERPSTRA, A.H.M. The effect of age on the development of hypercholesterolemia in rabbits fed semipurified diets containing casein. J Nutr, 1982; 112, 1287–1295.
- WETTERHOLM, R., CAIDAH, K., VOLKMANN, R., BRANDT-ELIASSON, U., FRITSCHÉ-DANIELSON, R. y GAN, L.M. Imaging of atherosclerosis in WHHL rabbits using high-resolution ultrasound. Ultrasound Med Biol, 2007; 33:720-6.
- WILDGRUBER, M.G., BERGER, E.H. Cryoplasty for the Prevention of Arterial Restenosis. Cardiovasc Intervent Radiol, 2008; 31:1050–1058.

- WORTHLEY, S.G., HELFT, G., FUSTER, V., ZAMAN, A.G., FAYAD, Z.A., FALLON, J.T., BADIMON, J.J. Serial in vivo MRI documents arterial remodeling in experimental atherosclerosis. *Circulation*, 2000; 101, 586–589.
- WYATT, J.D., SCOTT, R.A., RICHARDSON, M.E. The effects of prolonged ketamine-xylazine intravenous infusion on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure, heart and respiratory rates, rectal temperature and reflexes in the rabbit. *Lab Anim Sci*, 1989; Sep, 39(5):411-6.
- WYTENBACH, R., GALLINO, A., ALERCI, M. ET AL. Effects of percutaneous transluminal angioplasty and endovascular brachytherapy on vascular remodeling of human femoropopliteal artery by noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2004; 110:1156-1161.
- XIANGDONG LI, YUANWU LIU, HUA ZHANG, LIMING REN, QIUYAN LI, NING LI. Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein Cell*, 2011; 2(3): 189-201.
- YAMAGISHI, M., TERASHIMA, M., AWANO, K. ET AL. Morphology of vulnerable coronary plaque: insights from follow-up of patients examined by intravascular ultrasound before an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 35(1):106-11.
- YANNI, A.E., YATZIDIS, H.A., KAVANTZAS, N.G., AGAPITOS, E.V., PERREA, D.N., KARAYANNACOS, P.E. Dietary L-aspartate and L-glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbit. *Nutr Metab Cardiovasc*, 2003; Dis 13, 80–86.
- YANG, B.C., PHILLIPS, M.I., MOHUCZY, D., MENG, H., SHEN, L., MEHTA, P. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998; 18:1433.
- YU, Q., LI, Y., WAQAR, A.B., WANG, Y., HUANG, B., CHEN, Y., ZHAO, S., YANG, P., FAN, J., Y LIU, E. Temporal and Quantitative Analysis of Atherosclerotic Lesions in Diet-Induced Hypercholesterolemic Rabbits. *J Biomed Biotechnol*, 2012; 2012:506159.
- ZHU, B.Q., SIEVERT, R. E., SUN, Y. P., ISENBERG, W. M., PARMLEY, W.W. Effect of lovastatin on suppression and regression of atherosclerosis in lipid-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; 19(2):246-255.