



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

TESIS DOCTORAL:

**EL PAPEL DE LAS NANOPARTÍCULAS EN LA
CALCIFICACIÓN ARTERIAL: MODELO EXPERIMENTAL EN
EL CONEJO**

Presentada por **Noelia Cenizo Revuelta**

para optar al grado de doctor por la

Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Prof. Dr. D. Jose Antonio González Fajardo

Prof. Dr. D. Carlos Vaquero Puerta

2012

A mi familia y a mi marido Juan

Quiero manifestar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido en el terreno profesional al desarrollo de este trabajo, y a aquellas que en el ámbito personal me han ofrecido su apoyo incondicional. Y de manera especial,

Al Prof. Dr. José Antonio González Fajardo, por su continuo y desinteresado asesoramiento y colaboración en la elaboración de este trabajo y de muchos otros. Por su estímulo y enseñanzas durante mi residencia en el Servicio de Angiología y Cirugía Vascul ar del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, por su amistad y sus buenos consejos.

Al Prof. Dr. Carlos Vaquero Puerta, por su apoyo, confianza y disponibilidad en todo momento, para desarrollar tanto la actividad investigadora como la asistencial. Y en especial por poner a mi disposición el Laboratorio de Cirugía Experimental y transmitirme sus conocimientos, teóricos y prácticos, para el trabajo con animales.

A mis compañeros del Servicio de Angiología y Cirugía Vascul ar del Hospital Clínico Universitario de Valladolid por su apoyo personal y profesional a lo largo de todos los años que hemos compartido juntos.

Al Dr. Tomás Álvarez por su ayuda en el procesamiento e interpretación del material histológico. Y a mi amigo el patólogo Carlos Álvarez, porque sin su ayuda no hubiera sido posible concluir este trabajo.

A la Dra. Beatriz Aguirre por su colaboración en la realización e interpretación de las pruebas analíticas.

Al Dr. Bratos por prestarme sus conocimientos en la etapa microbiológica del estudio.

A mi familia, por su paciencia y apoyo.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

INDICE

<u>INDICE</u>	7
<u>INDICE DE ABREVIATURAS</u>	15
I. INTRODUCCIÓN	21
A) FISIOPATOLOGÍA DE LA ARTERIOESCLEROSIS.....	23
A.1. Historia de la aterosclerosis.....	23
A.2. Factores que desencadenan la aterosclerosis.....	26
A.2.1. Respuesta del endotelio al daño arterial.....	26
A.2.2. Estrés hemodinámico.....	27
A.2.3. Infecciones.....	29
A.2.3.1. Posibles agentes patógenos implicados.....	29
A.2.3.2. Posible fisiopatogenia infección-aterosclerosis.....	33
A.2.4. Lipoproteínas de baja densidad.....	34
A.3. Patogénesis.....	35
A.3.1. Inflamación.....	35
A.3.2. El papel de los elementos celulares.....	39
A.3.2.1. Células endoteliales.....	39
A.3.2.2. Macrófagos.....	40
A.3.2.3. Linfocitos T.....	42
A.3.2.4. Plaquetas.....	43
A.4. Estadios de la placa aterosclerótica.....	43
A.4.1. Estría grasa.....	43
A.4.2. Lesión fibro-grasa.....	44
A.4.3. Placa fibrosa.	44
A.4.4. Estadificación.....	44

A.5. Evolución de las lesiones ateroscleróticas.....	47
A.6. Vulnerabilidad de la placa, su traducción clínica y su implicación en el diagnóstico.....	49
B) NANOPARTÍCULAS CALCIFICANTES.....	52
B.1. Morfología.....	53
B.2. Crecimiento y metabolismo.....	54
B.3. Consideración de las nanopartículas como seres vivos.....	55
B.4. Detección.....	57
B.5. Efectos de las nanopartículas.....	57
B.6. Relación de las nanopartículas con las enfermedades humanas..	60
C) CALCIFICACIÓN ARTERIAL.....	62
C.1. Definición y tipos.....	62
C.2. Relación entre la calcificación arterial y la desmineralización ósea.....	63
C.3. Importancia clínica de la calcificación arterial.....	67
C.4. Fases de la calcificación arterial y su relación con la complicación de la placa.....	69
C.5. Relación entre los niveles séricos de inhibidores de la calcificación y la vulnerabilidad de la placa.....	70
C.6. Factor causal que inicia la calcificación arterial.....	72
C.7. Posibles terapias.....	72
D) ATORVASTATINA.....	75
D.1. Ficha técnica.....	75
D.1.1. Composición cualitativa y cuantitativa.....	76
D.1.2. Forma farmacéutica.....	76
D.1.3. Datos clínicos: Indicaciones terapéuticas.....	76
D.1.4. Propiedades farmacológicas.....	77

D.2. Mecanismo de acción.....	80
D.2.1. Mecanismo de acción y su importancia en el metabolismo lipídico.....	80
D.2.2. Efectos pleiotrópicos.....	81
D.2.3. Efectos sobre la aposición de calcio.....	83
E) EL CONEJO COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.....	85
E.1. Taxonomía.....	85
E.2. Manejo del conejo.....	86
E.3. Modelos de experimentación cardiovascular en el conejo.....	86
E.4. Anatomía vascular del conejo.....	91
E.5. Histología arterial en el conejo.....	91
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	93
A) ANTECEDENTES.....	95
B) ELEMENTOS TEÓRICOS QUE FUNDAMENTEN LA INVESTIGACIÓN.....	95
C) IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	96
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	97
A) HIPÓTEIS.....	99
B) OBJETIVOS.....	100
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
A) PRINCIPIOS Y NORMAS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	103
B) DISEÑO DEL ESTUDIO.....	103
C) PRIMERA FASE: Aislamiento y cultivo de nanopartículas calcificantes.....	104
C.1. Muestras clínicas.....	104
C.2. Cultivo de las nanopartículas.....	104

C.3. Preparado para la inoculación animal.....	108
D) SEGUNDA FASE: Modelo experimental.....	108
D.1. Animales.....	108
D.2. Protocolo quirúrgico.....	109
D.2.1. Técnica anestésica.....	109
D.2.2. Técnica quirúrgica.....	110
D.3. Postoperatorio.....	115
E) TERCERA FASE: Extracción de muestras y análisis.....	115
E.1. Recolección de muestras.	115
E.2. Análisis histopatológico.....	118
E.2.1. Fijación.....	118
E.2.2. Lavado.....	118
E.2.3. Deshidratación.....	118
E.2.4. Inclusión en parafina.....	119
E.2.5. Formación de bloques y montaje en portaobjetos.....	119
E.2.6. Desparafinación de los cortes.....	120
E.2.7. Tintiones utilizadas.....	121
E.2.8. Aclaramiento y montaje.....	124
E.3. Análisis morfológico.....	125
E.4. Análisis morfométrico.....	125
E.4.1. Morfometría.....	125
E.4.2. Cálculo de parámetros.	126
F) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	128

F.1. Medidas de localización y dispersión.....	128
F.2. Comparación de los resultados.....	128
V.RESULTADOS.....	131
A) TAMAÑO MUESTRAL.....	133
B) RESULTADOS ANALÍTICOS.....	134
B.1. Glucosa.....	134
B.2. Triglicéridos.....	139
B.3. Colesterol total.....	144
B.4. Interleucina 6.....	149
C) RESULTADOS DESCRIPTIVOS MORFOLÓGICOS.....	153
C.1. Hallazgos histopatológicos.....	153
C.2. Resumen de los hallazgos histopatológicos.....	158
D) PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.....	159
D.1. Área de neoíntima.....	159
D.2. Área de capa media.....	163
D.3. Ratio de Intima/Media (IMR).....	167
D.4. Ratio de estrechamiento de la luz (ELR).....	171
E) CALCIFICACIÓN.....	175
VI. DISCUSIÓN.....	181
A) DISCUSIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	183
A.1. Justificación del animal del animal de experimentación.....	183
A.2. Justificación del modelo del daño intimal.....	183
A.2.1. Modelos animales de placa aterosclerosa.....	184
A.2.2. Modelos animales de calcificación arterial.....	187
A.3. Justificación de la utilización de Atorvastatina.....	188

A.3.1. Efecto de la Atorvastatina sobre la hiperplasia intimal....	188
A.3.2. Efecto de la Atorvastatina sobre la calcificación.....	188
A.4. Justificación de las técnicas de microscopía y morfometría.	190
A.4.1. Tinciones.....	190
A.4.2. Morfometría.....	191
B) DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	192
B.1. Resultados analíticos.....	192
B.1.1. Niveles de glucosa y triglicéridos.....	192
B.1.2. Niveles de colesterol plasmáticos.....	192
B.1.3. Niveles de Interleucina 6.....	193
B.2. Resultados descriptivos morfológicos.....	194
B.3. Resultados morfométricos.....	195
B.3.1. Área de neointima.....	195
B.3.2. Área de capa media.....	196
B.3.3. Ratio de Intima/Media (IMR).....	196
B.3.4. Ratio de estrechamiento de la luz (ELR).....	197
B.4. Calcificación.....	198
C) RESÚMEN DE LA DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	199
D) LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	204
E) ESTUDIOS FUTUROS.....	206
VII. CONCLUSIONES.....	207
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	211

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i> . Enzima convertidora de angiotensina
AUC	<i>Area under the curve</i> . Área por debajo de la curva
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein</i> . Proteína morfogénica ósea 2
CAC	Calcio en arterias coronarias
Cag A	Gen A asociado a citotoxina
CBFA1	Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor. Factor de transcripción osteoblástico
CD4	Cúmulo de diferenciación 4 (glicoproteína transmembrana)
CD8	Cúmulo de diferenciación 8 (glicoproteína transmembrana)
Cmax	Concentraciones plasmáticas máximas
CPK	Creatinfosfoquinasa
CT	Tomografía computerizada
DIC	Microscopía diferencial de contraste de interferencia
EC	Enfermedad coronaria
EDGF	<i>Endothelial-derived growth factor</i> . Factor de crecimiento derivado de endotelio

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDX	Energía de dispersión de rayos X
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> . Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ELR	Ratio de estrechamiento de la luz arterial
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> . Factor de crecimiento de fibroblastos
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> . Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos
GSM	<i>Grey scale median</i> . Mediana de escala de grises.
HMGC _o A	<i>3-hydroxi-3-metilglutaril Coenzima A</i>
HMWK	<i>High molecular weight kininogen</i> . Quininógeno de alto peso molecular
hs-PCR	Proteína C reactiva de alta especificidad
ICAM- 1	<i>Intercellular adhesion molecule</i> . Molécula de adhesión intercelular 1
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> . Factor de crecimiento insulínico
INF	Interferones

iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthasa</i> . Enzima sintetasa inducible del óxido nítrico
IL2	Interleuquina 2
IMR	<i>Intimo-medial Ratio</i> . Ratio íntima/media
IVUS	<i>Intravascular ultrasound</i> . Ultrasonido intravascular
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> . Lipoproteína de baja densidad
Lrp5	<i>LDL receptor-related protein</i> . Proteína relacionada con el receptor LDL
MAC	Molécula de adhesión celular
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> . Proteínas quinasa activadas por mitógenos
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein</i> . Proteína quimioatrayente de monocitos
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> Factor estimulante de colonias de monocitos
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> . Complejo mayor de histocompatibilidad
MMP 9	Metaloproteinasas 9
MMPs	Metaloproteinasas
NDA(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF-KB	Factor nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i> . Célula asesina natural
NO	<i>Nitric oxide</i> . Óxido nítrico
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PAF	<i>Platelet activating factor</i> . Factor activador de plaquetas
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> . Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina G 2
PGI ₂	Prostaglandina I 2
RANKL	Ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa B
SCA	Síndrome coronario agudo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico
SPARCL	Estudio para la prevención del <i>Stroke</i> mediante la reducción agresiva de los niveles de colesterol
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i> . Proteína de unión al elemento de respuesta a esteróles
TEM	Microscopio electrónico de transmission

TF	Factor tisular
TGF α	<i>Transforming growth factor α</i> . Factor de crecimiento transformante α
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i> . Factor de crecimiento transformante β
tPA	Activador tisular del plasminógeno
TXA ₂	Tromboxano A-2
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> . Factor de crecimiento de célula endotelial vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLDL	Very-low density lipoprotein. Lipoproteína de muy baja densidad
vWF	Factor de Von Willebrand

I. INTRODUCCIÓN

A) FISOPATOLOGÍA DE LA ATEROESCLEROSIS.

A.1. HISTORIA DE LA ATEROSCLEROSIS ¹.

El primer autor en utilizar el término *aterosclerosis* fue Jean F. M. Lobstein en 1833, para referirse al endurecimiento y pérdida de elasticidad de las arterias ². Posteriormente Digirolamo realizó una definición más fisiopatológica refiriéndose a la aterosclerosis coronaria: "Alteración patológica de las arterias coronarias caracterizada por el depósito anormal de lípidos y tejido fibroso en la pared arterial, que desorganiza la arquitectura, la función de los vasos y reduce en forma variable, el flujo sanguíneo al miocardio".

Sobre el origen etiopatogénico de la aterosclerosis han aparecido a lo largo de los tiempos numerosas teorías, las de mayor relevancia desde el punto de vista científico por la solidez de sus afirmaciones son tres: la teoría trombogénica, la teoría inflamatoria y la teoría lipídica, todas ellas relacionadas entre sí, como veremos posteriormente.

La más antigua es la *teoría trombogénica*, también conocida como *teoría de la incrustación de la aterosclerosis*, fue propuesta por Rokitanski ³. Defendía que los depósitos localizados en la capa interna de la pared arterial durante el proceso de aterosclerosis estaban compuestos sobre todo de fibrina y otros elementos sanguíneos, y no eran resultado de un proceso purulento. Esta teoría fue debatida en su tiempo por numerosos autores, pero no fue totalmente descartada, de hecho Mallory y Duguid defendían un papel crucial de la formación de trombos en el desarrollo de la placa aterosclerosa ⁴. Hoy en día, la formación de trombo en las placas ateroscleróticas sigue estudiándose, ya que se considera una vía fisiopatogénica de radical importancia clínica ⁵, pero el problema de la teoría

trombogénica es que no alcanza a explicar todas las características de la aterosclerosis, ni tampoco el depósito inicial de trombos.

La *teoría de la insudación o teoría inflamatoria* fue propuesta por Virchow ⁶. Sostiene que el colesterol de la sangre se filtra desde la luz del vaso hacia la pared, si dicho colesterol no difunde rápidamente hacia la adventicia para ser drenado por los linfáticos, el endotelio reacciona ante él y se produce reblandecimiento del tejido conectivo en el sitio de los depósitos, seguido por una proliferación activa del mismo tejido dentro de la íntima. Virchow acuña el término "*endarteritis deformans*", significando que el ateroma era el producto de un proceso inflamatorio dentro de la íntima, y que el engrosamiento fibroso era una reacción inducida por la proliferación del tejido conectivo en esa misma capa arterial. Sostenía que el estímulo irritativo era iniciado por factores mecánicos.

Esta teoría parece confirmarse en 1913 por las investigaciones de Anitskchow y Chalатов, que lograron reproducir la aterosclerosis en conejos sometidos a dietas ricas en colesterol ^{7,8}, y por este hecho concluyen que la enfermedad aterosclerosa tiene origen en un pasaje de lípidos plasmáticos hacia la pared arterial a través del endotelio, todo ello facilitado por la presencia de concentraciones altas de lípidos en plasma, por eso se llamó *teoría lipídica*.

Otros hallazgos que suponen una gran contribución para el esclarecimiento del complejo proceso de formación de la placa aterosclerosa han sido los realizados por Zinserling y Gofman. Zienseling demostró la presencia de estrías grasas en las arterias de niños de corta edad, considerándolas precursoras de la aterosclerosis en el adulto. Mencionó que los tres factores causales más importantes en la patogenia de esta afección eran la hipercolesterolemia, los factores mecánicos y el estado de la pared

arterial. Gofman demostró, mediante la ultrafiltración analítica, la diversidad considerable de los componentes que existían en las *beta* lipoproteínas. Probó que el mecanismo de transporte del colesterol en el suero se hacía mediante lipoproteínas de baja densidad. Sus hallazgos abrieron el camino para la clasificación de las lipoproteinemias en pacientes con tipos dominantes y recesivos, así como para el descubrimiento de los receptores anormales para las lipoproteínas de baja densidad ⁹.

Los últimos estudios sobre la etiopatogenia de la aterosclerosis se basan en la genética molecular y en los aspectos vinculados con la síntesis y transporte del colesterol por la sangre, y también con la homeostasis intracelular del colesterol y el análisis del origen y la progresión de las lesiones vasculares relacionadas con la proliferación de células del músculo liso ⁹.

En décadas recientes, la teoría inflamatoria de Virchow ha sido tomada en cuenta nuevamente, retomando el concepto de la disfunción de la célula endotelial. Además, se ha sostenido la posible participación de agentes infecciosos en la producción de la actividad inflamatoria, tanto en el desarrollo de la placa de ateroma como en su inestabilidad ¹⁰⁻¹².

A.2. FACTORES QUE DESENCADENAN LA ATEROSCLEROSIS ¹³.

A.2.1 respuesta del endotelio al daño arterial.

La teoría clásica sobre la aterosclerosis fue formulada por Russell Ross. Según su teoría el endotelio es la estructura clave, reguladora de la pared arterial, provee a la arteria de una superficie antitrombótica, sintetiza moléculas que modulan el tono arterial y es el regulador del paso de nutrientes hacia el músculo liso. Cuando el endotelio se daña, por fuerzas físicas, por componentes de la sangre o por ambas, se produce la aterosclerosis.

El óxido nítrico (NO) es una pieza fundamental en la regulación del vaso sanguíneo, se sintetiza a partir de L-arginina y moléculas de oxígeno mediante la óxido-nítrico-sintasa. Esta sintasa depende de muchos cofactores, entre ellos la tetrahidrobiopterina. Esta molécula tiene su síntesis alterada en personas fumadoras, incluso jóvenes, lo que produce una alteración de la vasoreactividad, que es el primer signo de disfunción vascular.

El papel del NO en el endotelio funciona de la siguiente manera:

- *En condiciones fisiológicas:* el incremento de flujo sanguíneo y otros agonistas que se adhieren al endotelio producen la entrada de calcio en la célula endotelial, lo cual aumenta la producción de NO en su citoplasma. Segregado en la luz del vaso produce una reducción de la adhesión plaquetaria y leucocitaria. El NO segregado hacia el músculo liso produce su relajación.

- *En condiciones patológicas:* el endotelio es frágil, las agresiones físicas o químicas (metabolitos del tabaco, los oxidantes o los lípidos) pueden producir alteraciones en su superficie, lo que produce su activación y facilita

la adhesión plaquetaria y leucocitaria. Los monocitos secretan enzimas y factores de crecimiento que facilitan su propia migración hacia la pared del vaso, produciendo allí su daño. Se produce la síntesis de receptores celulares de la superficie del endotelio que captan lípidos oxidados, colesterol y particularmente lipoproteínas de baja densidad (LDL). Se produce la expresión de factores de crecimiento y proteasas que desencadenan la proliferación y migración de las células musculares hacia la íntima, y disminuye la producción del NO por las células.

A.2.2. Estrés hemodinámico.

Existen dos tipos de estrés hemodinámico sobre la pared arterial: la tensión hemodinámica de cizallamiento (shear stress), fuerza de fricción que actúa en la interfase entre la sangre y el endotelio, sobre todo en zonas como bifurcaciones, ramas, estrechamientos y curvaturas (se relacionan con la distribución de las lesiones ateroscleróticas en arterias nativas). Y la presión o fuerza de deformación circunferencial, que actúa perpendicularmente al vaso ¹⁴. Dicho estrés de estiramiento mecánico determina que la hipertensión sea un factor de riesgo de aterosclerosis bien establecido ¹⁵. De hecho, existen estudios realizados en conejos con hiperlipemia hereditaria, en los que se induce una hipertensión que actúa como efecto sinérgico causando una intensificación de la aterosclerosis ¹⁶. La fuerza de cizallamiento estimula la liberación de óxido nítrico y prostaciclina por las células endoteliales, como mecanismo de defensa, produciendo la relajación vascular. Mientras, las células musculares lisas son estimuladas por el estrés de tensión cíclico ¹⁵.

- Apoptosis inducida por estrés mecánico.

La fuerza biomecánica a niveles fisiológicos es fundamental para mantener la estructura y la función orgánicas, pero a niveles elevados puede producir muerte celular o apoptosis. Hay que tener en cuenta que la apoptosis no es en sí misma un mecanismo patológico sino un proceso regulado y fisiológico ¹⁵. Sin embargo la aparición alteraciones en los mecanismos de regulación de la apoptosis inducida por estrés mecánico puede preceder al desarrollo de la aterosclerosis ¹⁷.

- Estrés mecánico e inflamación.

La expresión de moléculas de adhesión y de quimiocinas inducida por estrés mecánico en la pared vascular podría ser importante para la respuesta inflamatoria. Una importante vía activada por el estrés mecánico es la expresión de moléculas de la adhesión a través de las vías de transducción de señales MAPK ¹⁵.

- Proliferación de células musculares lisas inducida por estrés biomecánico.

La hipertensión aumenta la fuerza mecánica sobre la pared arterial hasta en un 30%, y debido a ello tienen lugar notables alteraciones de la transducción de señales y de la expresión génica en las células musculares lisas, que contribuyen a la síntesis de proteína de la matriz y a la proliferación y diferenciación celular ¹⁵.

Actualmente una importante vía de investigación se centra en los factores causantes de las reestenosis después del tratamiento mediante angioplastia. Diversas publicaciones demuestran que la angioplastia causa estiramiento de la pared arterial y provoca la activación rápida de las MAPK en las carótidas en regeneración ¹⁵. Esto explica que la causa más frecuente

de reestenosis después de un procedimiento vascular tipo angioplastia es la hiperplasia intimal. Su formación se debe fundamentalmente a la migración de células de músculo liso y depósitos de matriz extracelular en la capa íntima de la arteria. La hiperplasia intimal supone además el sustrato propicio para que se acumulen lipoproteínas y se produzca una aterosclerosis acelerada ¹⁸.

A.2.3. Infecciones.

Existen factores de riesgo bien establecidos de aterosclerosis, como la elevación del colesterol sanguíneo, el hábito tabáquico o la hipertensión. Sin embargo cada vez hay más datos que apoyan la existencia de microorganismos que intervienen en la patogenia de la aterosclerosis, y que además podrían ser un factor de riesgo fundamental en sujetos sin otros factores de riesgo conocidos ¹⁹. De hecho, cerca de la mitad de los pacientes que sufren un infarto no presentan ninguno de los factores de riesgo convencional identificable ²⁰.

A.2.3.1. Posibles agentes patógenos implicados:

El primer agente infeccioso identificado de manera directa con la aterosclerosis fue un tipo apícola de herpesvirus (asociado a la enfermedad de Mareck), el cual fue inoculado en gallinas libres de todo tipo de infección y alimentadas con una dieta rica en colesterol por Fabricant et al. ²¹ en 1978. Tras el sacrificio de estos animales y su estudio anatómopatológico, se apreciaron lesiones ateroscleróticas claramente visibles y de tipo avanzado, similares a las humanas. El mismo grupo inmunizó con posterioridad a este tipo de animales con el fin de prevenir el desarrollo de aterosclerosis

después de la inoculación, con resultados alentadores ²², documentando una particular acumulación de ésteres de colesterol en las células musculares lisas ²³.

Posteriormente, la investigación se centró en el vínculo intermedio entre la infección y la aterosclerosis, que viene determinado por el proceso inmunológico, más que por una acción directa de dichos agentes exógenos. Éstos parecen servir como gatillos o mediadores de la activación del proceso inmunitario, que pueden determinar el paso de placa estable a inestable, e incluso dar paso a la erosión de la superficie endotelial. Si bien existen datos experimentales importantes relacionados con cada una de estas etapas fisiopatológicas, en ningún caso las evidencias son concluyentes. Los patógenos que han sido vinculados con distintos grados de solidez científica a la enfermedad aterosclerótica son los *Herpesvirus*, *Citomegalovirus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori* y *Chlamydia pneumoniae* ²⁴⁻²⁶ (Tabla I).

El interés por establecer una posible relación entre los agentes infecciosos y el desarrollo de la aterosclerosis radica en posible utilidad terapéutica de esta interrelación. Existen varios estudios clínicos de intervención y observación, realizados con antibióticos macrólidos en pacientes con enfermedad coronaria, buscando establecer la relación particularmente con *C. pneumoniae*, un patógeno intracelular ^{24, 27}. Este tipo de *Chlamydia* fue originariamente identificado en 1986 por Grayston en un niño de origen taiwanés que padecía tracoma ²⁵. Ésta es la segunda bacteria más prevalente en las neumonías atípicas de la comunidad, cuyo contacto inicial suele ocurrir entre los 5-14 años de edad. La reinfección por *C. Pneumoniae* a lo largo de la vida es un hecho más que común, hasta el punto de estimarse que el 86% de la población adulta ha estado o está en contacto con ella. *C. pneumoniae* ha sido hallado, utilizando diferentes técnicas, en las placas ateroscleróticas humanas con diferentes estadios evolutivos. La

administración de esta bacteria via inhalatoria en modelos animales, ha demostrado inducir aterosclerosis¹⁰.

Sin embargo, los agentes bacterianos y virales comparten características que hacen difícil confirmar la relación de causa-efecto con la aterosclerosis e inestabilidad de la placa, particularmente debido a los métodos utilizados para el diagnóstico, la alta prevalencia en la población adulta de títulos de anticuerpos contra estos agentes, dificultades para el cultivo, la existencia de infecciones cruzadas y la elevada tasa de uso de antibióticos por otras enfermedades.

AUTOR	PATÓGENO	AÑO	RESULTADO
<i>Chlamidia pneumoniae</i>			
Saikku y cols.	Primer estudio	1988	Relación infección/ arteriopatía coronaria /aterosclerosis
Kuo et al.	Estudios en autopsias	1993	Alto grado de correlación : distribución de la aterosclerosis/C.pneumoniae
Fong et al.	Experimentos <i>in vitro</i>	1999	<i>C.pneumoniae</i> : <ul style="list-style-type: none"> • infecta a macrófagos del endotelio y músculo liso vascular • se reproduce en células endoteliales aórticas
Muhlestein	Modelo experimental en conejo	1998	Se induce aterogénesis tras administración inhalatoria de <i>C.pneumoniae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>			
Mendall et al		1994	Correlación seropositividad /riesgo de cardiopatía
Folson et al.		1998	Aislamiento <i>H.pylori</i> en placas ateroscleróticas
Danesh et al.	Metaanálisis	1998	No encontró correlación seropositividad/>riesgo
Mayr y cols.	Diferenciación cepas virulentas y avirulentas	2002	Las cepas <i>CagA</i> (<i>cytotoxinassociated gene A</i>) aumentan el riesgo de aterosclerosis

Tabla I: Resumen de trabajos publicados sobre aterosclerosis y agentes infecciosos.

A.2.3.2. Posible fisiopatogenia infección-aterosclerosis.

Se han intentado identificar posibles mecanismos fisiopatológicos que relacionen aterosclerosis e infección. Se ha probado que la carga viral induce la secreción de compuestos protrombóticos como el factor tisular y la trombina^{10, 28}. Además, esta carga viral facilita la inducción en el organismo de estímulos de proliferación celular, como en el caso del citomegalovirus²⁹. Varias son las hipótesis que se han formulado para explicar los posibles mecanismos que relacionan al *H. pylori* con la aterosclerosis. Una posibilidad especialmente interesante la representa la teoría de que las infecciones gastrointestinales crónicas puedan producir malabsorción y déficit de vitaminas B6 y B12, factores esenciales para la conversión de homocisteína en metionina, esto representaría una acción indirecta, que favorecería la aterosclerosis a través de la producción de hiperconcentración de homocisteína²⁴. Por otra parte, esta bacteria, al igual que *C. pneumoniae*, es capaz de sintetizar un antígeno de superficie conocido por su aparición bajo condiciones de inestabilidad térmica, denominado *heat shock protein* similar a la forma humana 60 (HSP60). Una vez expuestas, pueden no ser reconocidas como propias por el sistema inmunológico del huésped, iniciando así una significativa producción de anticuerpos. La exposición de estas proteínas antigénicas contribuye también a estimular la liberación de interleucinas, TNF- α e interferón- γ , los cuales vuelven a cerrar el círculo vicioso inflamatorio. Estas evidencias sugieren fuertemente la presencia de un mecanismo autoinmune relacionado con la génesis aterosclerosa²⁴.

Este tipo de infecciones crónicas, en las que los episodios de reinfección son muy frecuentes durante la vida, estimulan una y otra vez a un sistema activado con anterioridad, conduciendo a una intensa actividad inflamatoria capaz de modificar la composición de la placa²⁴.

A.2.4. Lipoproteínas de baja densidad.

Como se ha comentado anteriormente el endotelio activado, expresa en su pared receptores celulares de superficie que captan lipoproteínas de baja densidad (LDL). Tras esto, y cuando aún se encuentran en el fluido extracelular, si ingresan en un proceso de oxidación originado por ciertos estímulos no aún totalmente esclarecidos, contribuirán significativamente al fenómeno aterogénico. En el caso de que no sean oxidadas, podrán volver al torrente sanguíneo sin contribuir en apariencia a este último proceso. La alteración oxidativa provoca como consecuencia severas alteraciones en las funciones endoteliales, muchas de ellas mediadas por la enzima sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS), promoviéndose una mayor oxidación intravascular de moléculas de LDL. En efecto, el óxido nítrico (NO) sintetizado por la isoforma *i* permite su unión con aniones superóxidos, activando los factores de transcripción como el factor nuclear kappa-B (NF-kB), el cual promueve la expresión de moléculas de adhesión celulares como VCAM-1 e ICAM-1, y factores quimioattractivos de monocitos (MCP), con lo que se establece el puente necesario para la adhesión y migración de células inflamatorias ²⁴. Ésta activación, produce una reacción en cadena de otras células, como macrófagos capaces de generar a su vez numerosos compuestos activos y capaces asimismo de cambiar la morfología y composición relativa de las placas ateroscleróticas. Entre los factores más importantes se cuentan las interleucinas, los aniones superóxido, los factores de crecimiento como el factor transformador de crecimiento (TGF β) y el factor derivado de plaquetas (PDGF).

A.3. PATOGÉNESIS.

A.3.1. Inflamación

La inflamación es un proceso de gran protagonismo en la patogénesis de la aterosclerosis, estudios en humanos han demostrado un papel central de la infiltración por macrófagos en la ruptura de la placa carotídea y su consiguiente sintomatología ³⁰. Así mismo, se ha relacionado la infiltración neointimal de macrófagos con la aparición de reestenosis intrastent. El dato analítico relacionado con estos procesos es la elevación de la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-PCR) ³¹. Se ha demostrado una elevación en sangre tanto perilesional como en sangre periférica de la PCR en paciente con Síndrome coronario agudo (SCA).

El material obtenido por aterectomía direccional de placas ateroscleróticas coronarias en pacientes agudos, permitió comprobar la existencia de una elevada concentración de células macrófagas y células inflamatorias activadas en ellas, contrariamente a situaciones clínicas estables con placas sin alteraciones morfológicas ³².

Por tanto, se puede decir que los siguientes acontecimientos se suceden durante un fenómeno trombótico agudo: se produce un proceso inflamatorio activo en la pared vascular, lo cual predispone a la vulnerabilidad de la placa al alterarse su aspecto «topográfico» y da como resultado la generación de un coágulo rico en trombina que, parcial o totalmente oclusivo, conducirá a una isquemia arterial. Según esta hipótesis, debió existir previamente un daño sobre el endotelio vascular, desencadenado por señales complejas, que interrelacionan la actividad de las células del endotelio, las células del músculo liso, los monocitos, los macrófagos y las células T ²⁴.

De esta manera, un estímulo crónico como la infección puede inducir la adhesión y migración de monocitos hacia la íntima, sin necesidad de solución de continuidad en la capa endotelial. Por tanto, nos enfrentamos de manera permanente a una innumerable cantidad de microorganismos, algunos patógenos conocidos y otros potencialmente definidos como tales, que desafían a diario el sistema inmunológico. Sin embargo, el organismo presenta mecanismos capaces de defenderlo de dichas agresiones.

Hay dos tipos de mecanismos de defensa bien diferenciados pero interrelacionados entre sí: mecanismos inespecíficos y específicos.

Los mecanismos inespecíficos, o innatos, son preexistentes, antes de que cualquier agente penetre en el organismo. Se trata de una serie de estructuras primitivas de reconocimiento y destrucción de diversos orígenes. La capacidad de respuesta de las células que intervienen en esta categoría no resulta afectada por el contacto sucesivo con un determinado antígeno.

En este sentido podemos decir que no desarrollan «memoria». En ocasiones, la sola acción de esta rama del sistema inmunológico es suficiente para destruir a un agresor.

Contrariamente a éstos, los mecanismos específicos son adquiridos. Se desarrollan frente a la exposición a agentes extraños y poseen la peculiar capacidad de «individualizar» y «memorizar» a cada uno de ellos. Definiremos como antígeno a cualquier molécula que pueda ser reconocida por receptores de linfocitos y, por lo tanto, los active²⁴.

Se ha reconocido la contribución de las respuestas inmunitarias en la patogenia de la aterosclerosis. Para facilitar la comprensión de dichos mecanismos vamos a hacer un recuerdo somero de los mecanismos inmunes en respuesta a patógenos:

- Mecanismos inespecíficos:

- **Barreras naturales:**

Las primeras líneas de defensa están constituidas por los epitelios que recubren las superficies externas e internas del organismo.

- **Fagocitosis:**

La fagocitosis comprende la ingestión y destrucción posterior de bacterias, células infectadas y partículas inertes por células fagocíticas. Ésta se inicia con la llegada de las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares) al lugar de la agresión, atravesando las paredes de los capilares en respuesta a la acción de sustancias quimiotácticas presentes en la zona. La adhesión del microorganismo a la superficie del neutrófilo o del macrófago provoca la activación de la célula, con lo cual la membrana del fagocito comienza a invaginarse hasta rodear por completo al microorganismo en una vacuola denominada fagosoma. En el citoplasma del fagocito, el fagosoma se fusiona rápidamente con lisosomas para formar un fagolisosoma, donde el microorganismo es expuesto a una serie de sustancias microbicidas provenientes de los lisosomas que terminan, en general, con la lisis del microorganismo ingerido. Sin embargo algunos microorganismos han adquirido características especiales que les permiten escapar al reconocimiento directo por células fagocíticas. No obstante, la fagocitosis puede llevarse a cabo gracias a la existencia de factores solubles que se unen a la superficie de estos microorganismos invasores y advierten a los fagocitos de la presencia de un elemento extraño. Estos factores son los anticuerpos (Ac) IgG e IgM y la fracción C3b del componente C3 del sistema de complemento. Un microorganismo recubierto por estas moléculas puede ser fácilmente reconocido y captado por macrófagos y polimorfonucleares a través de receptores específicos para el fragmento Fc de las IgG y para C3b presentes en la

membrana celular de los fagocitos. Las moléculas capaces de favorecer la fagocitosis en esta forma, como IgG y C3b, se denominan opsoninas y el fenómeno en sí se denomina opsonización. Se ha comprobado que la IgG por sí sola es capaz de mediar la adhesión e ingestión de la célula opsonizada a través sus receptores específicos en fagocitos, mientras que la opsonización únicamente por C3b sólo promueve la adhesión ²⁴.

- **Interferones**

Los interferones (IFN) comprenden un grupo de proteínas responsables de mediar el fenómeno de interferencia viral, por el cual un animal infectado con un virus es a menudo resistente a la sobreinfección por un virus diferente. La acción de los interferones ocurre a través de la inducción de un estado antiviral en sus células diana y no por interacción directa con el virus mismo. Además de la actividad antiviral tienen efecto sobre el crecimiento y proliferación de células normales y tumorales y participan en la regulación de la respuesta inmunológica.

- **Citotoxicidad natural killer.**

Este fenómeno está representado por la capacidad innata que poseen ciertas subpoblaciones linfocitarias de destruir células tumorales y células infectadas por virus mediante la liberación de sustancias tóxicas al medio extracelular. Las células efectoras se denominan células *natural killer* o células NK. Al igual que el resto de los mecanismos de defensa inespecíficos, la intervención de las células NK no requiere exposición previa al antígeno para desarrollarse ni poseen memoria tras la inmunización ²⁴.

- Mecanismos específicos:

Las células predominantes de este sistema inmunológico son los linfocitos. Históricamente se han distinguido dos formas de respuesta inmunitaria, llevadas a cabo por dos subpoblaciones linfocitarias diferentes, los linfocitos B y T. La activación de linfocitos B seguida de su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos es responsable de la inmunidad humoral. Los linfocitos T no son capaces de secretar anticuerpos tras su activación, pero presentan una serie de funciones reguladoras y efectoras denominadas inmunidad celular. La inmunidad específica se caracteriza por presentar una gran capacidad adaptiva, por su especificidad y por la existencia de la llamada memoria inmunológica. Sin embargo para desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz es necesaria la presencia de ambas poblaciones celulares, linfocitos B y T, de forma simultánea, ya que presentan interacciones a través de señales celulares entre ellas, como veremos más adelante.

A.3.2. El papel de los elementos celulares³³.

A.3.2.1 Células endoteliales.

El primer paso de la aterosclerosis es producido por una disfunción del endotelio, que puede ser provocada por numerosas causas: elevación y oxidación de las LDL, radicales libres producidos por el tabaco, la hipertensión y su producción de estrés hemodinámico, la diabetes mellitus, alteraciones genéticas, elevación de las concentraciones plasmáticas de homocisteína, microorganismos infecciosos, o una combinación de todos estos factores.

La activación endotelial, produce respuestas compensatorias que alteran las propiedades homeostáticas normales del endotelio. Así, se incrementa la adhesividad del endotelio a leucocitos y plaquetas, y su permeabilidad, el endotelio, se torna procoagulante y forma moléculas vasoactivas, citoquinas y factores de crecimiento. La respuesta inflamatoria se pone en marcha, y si ésta no es capaz de neutralizar a los agentes promotores, se puede retroalimentar indefinidamente ³⁴.

A.3.2.2. Macrófagos.

Los macrófagos están presentes en todas las lesiones ateroscleróticas, pero su presencia es mayor en los estadios más tempranos de la enfermedad. Su función fundamental es la de *basurero-limpiador*, presentando antígenos a los linfocitos T. El macrófago es la principal célula mediadora de la inflamación en la aterosclerosis. Los monocitos son atraídos por moléculas de adhesión y factores quimiotácticos producidos por las células endoteliales. Emigran al espacio subendotelial y se transforman en macrófagos. En las fases iniciales de la aterogenia estas células captan LDL oxidadas y se convierten en células espumosas. La captación de LDL por los macrófagos estimula la producción de factores de crecimiento y citoquinas, las cuales estimulan así mismo a las células endoteliales a producir más moléculas de adhesión y factores quimiotácticos, que atraen más monocitos, en una cadena de retroalimentación positiva (Tabla II). Las sustancias producidas por los macrófagos estimulan la proliferación endotelial, y atraen y estimulan la proliferación de más monocitos y células musculares lisas.

ESTÍMULO	SUSTANCIAS PRODUCIDAS
MACRÓFAGOS	<ul style="list-style-type: none"> • Factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) • Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF) • PDGF • Factor de crecimiento epidérmico • FGF básico • TGF-α y TGF-β • Factor de crecimiento de célula endotelial vascular (VEGF)
LINFOCITOS T	<ul style="list-style-type: none"> • Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) • Interferon α (IFN- α) • GM-CSF • Interleucina 2 (IL-2)
MAC	<ul style="list-style-type: none"> • PDGF • FGF básico • Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) • MCP-1 • Selectina P • Interleucina 8 (IL-8) • ICAM-1
PLAQUETAS	<ul style="list-style-type: none"> • PDGF • TGF-α y TGF-β • EGF • MCP-1 • IGF-I • Tromboxano A₂ • Serotonina • Selectina P

Tabla II: Mediadores de la inflamación. Sustancias secretadas por cada uno de los tipos celulares.

A.3.2.3. Linfocitos T.

Los linfocitos T son una célula muy abundante en todas las lesiones ateroscleróticas. Su papel en la aterogénesis no está aún del todo determinado. Aunque no se han definido antígenos o anticuerpos específicos ligados a la aterosclerosis, sí existen autoanticuerpos anti LDL oxidadas en el ser humano, y parece existir una correlación entre los títulos de estos anticuerpos y la progresión de la aterosclerosis. Los linfocitos T se adhieren a las lesiones ateroscleróticas produciendo agentes quimiotácticos y citoquinas (Tabla II). Dichas sustancias atraen a macrófagos y células musculares lisas.

Los linfocitos que se localizan en las lesiones ateroscleróticas son de tipo policlonal, y por tanto no se generan en respuesta a un solo antígeno. Se han localizado subclases diferentes de linfocitos T en las lesiones ateromatosas, incluídos los CD4 (linfocitos T colaboradores-inductores) y los CD8 (linfocitos T citotóxicos). Prueba de la causalidad del sistema inmune en la intrincada etiología de la aterosclerosis se demuestra en la mayor proporción de linfocitos T y macrófagos encontrada en las lesiones de aterosclerosis coronaria acelerada como respuesta al rechazo del trasplante cardíaco en comparación con la aterosclerosis típica ³⁵.

La activación del sistema del complemento también puede tener en la iniciación y la aceleración de la lesión aterosclerótica. Las partículas de colesterol son un potente activador del sistema del complemento, que se puede activar por su vía clásica o alternativa. La activación del sistema complemento da lugar a la producción de moléculas proinflamatorias y al complejo terminal de ataque a la membrana (MAC). Las MAC han sido localizadas sobre todo en la placa fibrosa, e incrementan la producción y secreción de citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión (Tabla II).

A.3.2.4. Plaquetas.

La adherencia y agregación de las plaquetas a la superficie endotelial ocurre relativamente pronto en el proceso de desarrollo de la aterosclerosis. A medida que la aterosclerosis progresa los trombos plaquetarios se hacen más frecuentes, y en las fases más avanzadas es frecuente la complicación trombótica o embolígena de la placa aterosclerótica. Pero además las plaquetas por sí mismas ejercen un estímulo para la progresión de la arteriosclerosis secretando factores de crecimiento y sustancias vasoactivas (Tabla II) que facilitan el reclutamiento y la proliferación de leucocitos y de células musculares lisas.

*A.4. ESTADIOS DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA*³³.

Las lesiones ateroscleróticas se dividen tradicionalmente en tres categorías o estadios:

A.4.1. Estría grasa.

Es el estadio más precoz del desarrollo de la placa de ateroma. Macroscópicamente son vetas lineales amarillentas, ligeramente elevadas en la superficie intimal del vaso, sobre todo en zonas de bifurcación. Histológicamente las lesiones se componen de macrófagos repletos de lípidos (células espumosas) y linfocitos T acumulados en la íntima del vaso. Estas lesiones se producen incluso en la niñez (a partir de los 3 años), muchas décadas antes de que la enfermedad debute sintomáticamente. Pero pueden aparecer en personas de cualquier edad y convivir con lesiones ateroscleróticas avanzadas.

A.4.2. Lesión fibro-grasa.

Se trata del siguiente estadio en la progresión de la placa aterosclerosa, consiste en capas de macrófagos y linfocitos T, alternando con capas de células musculares lisas. Las células están rodeadas de una matriz de tejido conjuntivo, compuesta de colágenos, fibras elásticas y proteoglicanos.

A.4.3. Placa fibrosa.

Se trata de un tipo de lesión aterosclerosa más avanzada. Aparece a partir de la segunda década de la vida, pero no se hacen importantes o clínicamente significativas hasta la cuarta década. En este estadio, la placa produce protuberancia en la luz del vaso, produciendo alteraciones en el flujo sanguíneo y provocando síntomas. Son habitualmente excéntricas, y consisten en una cápsula fibrosa densa compuesta de tejido conjuntivo y células musculares lisas. Estudiadas mediante microscopía electrónica, las células musculares lisas se encuentran formando un espacio lagunar rodeado de múltiples capas de colágeno denso de membrana basal. Por debajo de esta cápsula, encontramos células musculares lisas y macrófagos alrededor de un núcleo de restos lipídicos y necróticos. Hay capas adicionales de células musculares lisas y tejido conjuntivo por debajo del núcleo. Las lesiones con cápsulas fibrosas densas y espesas tienden a ser estables, mientras que aquellas que presentan cápsulas más finas e irregulares tienden a producir complicaciones como hemorragia, rotura y ulceración, y por tanto son más proclives a producir sintomatología aguda.

A.4.4. Estadificación.

La *American Heart Association* propuso en 1994 un sistema de estadificación de la placa aterosclerosa según su estructura y composición histológica. Los tipos I y II son consideradas lesiones tempranas, las tipo III

son lesiones intermedias y las lesiones tipo IV, V y VI son lesiones aterosclerosas avanzadas:

- **Tipo I:** se caracteriza a nivel microscópico por presentar un aumento del número macrófagos en la íntima, dichos macrófagos presentan en su interior gotitas de lípidos por lo que se llaman células espumosas.

- **Tipo II:** son las primeras que se visualizan macroscópicamente, comprenden fundamentalmente las estrías grasas. Constan de capas de células espumosas y células musculares lisas vasculares que también contienen lípidos. Además aparece también un mayor número de macrófagos que no contiene lípidos, algunos linfocitos T y mastocitos. La mayoría de las gotas lipídicas son intracelulares, contenidas principalmente en los macrófagos, pero existe también una pequeña proporción de gotitas extracelulares dispersas en algunas lesiones. Estas lesiones se dividen a su vez en:
 - *Lesiones tipo IIa:* son aquellas que tienden a progresar. En comparación con las tipo IIb contienen más células espumosas y células musculares lisas. Se localizan en zonas de engrosamiento adaptativo de la íntima, que surgen en aquellas localizaciones sometidas a mayor estrés hemodinámico.

 - *Lesiones tipo IIb:* lesiones tipo II que se resisten a progresar.

- **Tipo III:** son similares a las de tipo II, pero contienen acúmulos característicos de gotitas lipídicas extracelulares dispersos entre las capas de células musculares lisas. Estos acúmulos se encuentran

localizados por debajo de las capas de macrófagos y células espumosas, produciendo disrupciones en la coherencia del orden habitual de las capas de células musculares lisas de la pared vascular.

- **Tipo IV:** se llaman habitualmente ateromas. Se caracterizan por presentar colecciones de lípidos extracelulares bien definidas en la íntima, llamadas *núcleo lipídico*. Se trata de la confluencia de los acúmulos visualizados en las lesiones de tipo III. Pueden presentar partículas de calcio dentro del núcleo lipídico. En el área intermedia entre el núcleo lipídico y la superficie endotelial se encuentran macrófagos, células espumosas, células musculares lisas vasculares y linfocitos T y mastocitos dispersos. Estas lesiones son habitualmente excéntricas y producen ya un estrechamiento arterial aunque no suelen producir clínica.
- **Tipo V:** se caracteriza por la formación de tejido conectivo fibroso que forma la cápsula fibrosa. Aparecen a partir de la cuarta década de la vida y producen estrechamiento significativo de la luz arterial y síntomas.

La lesiones tipo V se subdividen a su vez en:

- *Tipo Va:* presentan un *núcleo lipídico* similar al de las tipo IV, cubierto por la cápsula fibrosa gruesa compuesta por matriz de tejido conectivo extracelular.
- *Tipo Vb:* el *núcleo lipídico* está calcificado.

- *Tipo Vc*: las lesiones ya no poseen núcleo lipídico y su contenido en lípidos es escaso.

- **Tipo VI**: Se trata de lesiones complicadas y son las que causan la mayoría de la morbi-mortalidad de la aterosclerosis. Se proceden cuando una placa sufre una disrupción de su superficie intimal, como una ulceración o una hemorragia intraplaca. Son susceptibles de producir embolizaciones y trombosis. Sus síntomas habituales son isquemia aguda y síntomas que pueden poner en peligro la viabilidad de una extremidad o la vida del paciente.

A.5. EVOLUCIÓN DE LAS LESIONES ATROSCLERÓTICAS ³⁶.

La aparición de una lesión inicial aterosclerosa no implica inexorablemente su evolución hacia la complicación y aparición de síntomas. El proceso ateroscleroso es un proceso vivo de interacción entre la pared arterial y los factores de riesgo. Pese a los numerosos estudios experimentales sobre la progresión de la aterosclerosis, su historia natural aún no es completamente conocida.

- **Iniciación de la placa**: el mecanismo más aceptado de iniciación de la aterosclerosis es la disfunción endotelial, que produce un aumento de la permeabilidad del endotelio, la oxidación de moléculas lipídicas y consiguiente reclutamiento de macrófagos. Otros mecanismos que merecen atención son los estímulos que producen la proliferación de células musculares lisas y las altas concentraciones de lipoproteínas.

- **Progresión de la placa:** la placa puede aumentar paulatinamente su tamaño hasta producir el estrechamiento arterial y dificultar el flujo sanguíneo. Este proceso incluye la migración, proliferación y diferenciación celular, la acumulación de lípidos tanto en el espacio intracelular como en el extracelular, la acumulación de matriz extracelular y la necrosis y degeneración celular. Simultáneamente se producen una serie de mecanismos de autoprotección que tienen como objeto mantener una adecuada luz en el vaso el mayor tiempo posible, y el resultado es la formación de la cápsula fibrosa, el secuestro del material necrótico y aislamiento en un núcleo, mientras se mantiene físicamente la superficie del endotelio.
- **Regresión de la placa:** supone una disminución del volumen de la placa. Se lleva a cabo a través de la reabsorción de lípidos o matriz extracelular, muerte celular y migración celular fuera de la placa. La tendencia a progresión o regresión de la placa viene determinada por la exposición a los factores de riesgo, factores hemodinámicos e incluso factores terapéuticos, como se demuestra en estudios animales³⁷⁻³⁹.
- **Complicaciones y estabilidad de la placa:** la susceptibilidad de la placa a sufrir complicaciones se relaciona con su estructura, composición y consistencia. La fractura y disrupción de la placa son factores tan importantes o más en la producción de sintomatología como el propio estrechamiento del vaso. A este respecto las placas se dividen en varios tipos:
 - Blanda y flexible
 - Friable y cohesiva

- Esclerótica
- Calcificada y frágil

Así una placa puede tener una cápsula fibrosa bien formada y ser en su estructura similar a una arteria normal, siendo eficiente el aislamiento de los componentes patológicos de la luz arterial. Y en otros casos el núcleo necrótico puede estar separado de la luz arterial solo por una zona muy fina de tejido conjuntivo y endotelio, lo que le hace más susceptible a su fractura y complicación.

A.6. VULNERABILIDAD DE LA PLACA, SU TRADUCCIÓN CLÍNICA Y SU IMPLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO.

En los últimos años los esfuerzos se han centrado en diferenciar aquellas placas aterogénicas susceptibles de producir clínica de las que no lo son. En este respecto, se ha logrado relacionar la estructura histológica de la placa con su aspecto ultrasónico en modo B, las placas ecolúcidas están asociadas con una incidencia mayor de síntomas que las placas ecogénicas y los fenómenos ateroembólicos son menos frecuentes en aquellas placas con fibrosis, estructura densa y homogénea. La introducción de equipos de alta definición y el análisis computarizado de la placa (GSM) han mostrado recientemente la posibilidad de estandarizar las características de la imagen, proporcionando una valoración objetiva y reproducible de los parámetros morfológicos.

La relación de la morfología de la placa con el proceso inflamatorio es clara: La mayoría de los estudios han mostrado que la cubierta fibrosa en pacientes sintomáticos es más delgada y la reacción inflamatoria más intensa, con mayor número de macrófagos y linfocitos T activados en la

cápsula de placas sintomáticas. Con independencia del estatus clínico, no existen diferencias significativas en cuanto a la frecuencia o tamaño del núcleo necrótico entre placas de igual grado estenótico, si bien el núcleo aparece más próximo a la cápsula fibrosa en pacientes sintomáticos.

Diversos estudios examinando placas carotídeas han indicado que la disrupción de la cápsula fibrosa está asociada con una infiltración de macrófagos y un proceso inflamatorio activo ⁴⁰⁻⁴³. Estos datos cuantitativos soportan la hipótesis de que la infiltración de macrófagos es tanto mayor cuanto más reciente es el síntoma isquémico ⁴⁴. Los macrófagos desempeñan un importante papel en este proceso ya que pueden degradar la matriz extracelular mediante la secreción de enzimas proteolíticas (metaloproteinasas y catepsinas) que debilitan la cápsula fibrosa y predisponen a su ruptura. La rotura de la cubierta fibrosa da lugar a la exposición de los constituyentes trombogénicos de la placa (factor tisular y trombomodulina), considerándose este mecanismo como el evento que origina la aparición de complicaciones neurológicas en relación a fenómenos tromboembólicos ⁴⁵⁻⁴⁷. La presencia de factores procoagulantes locales y/o sistémicos puede modificar la extensión y duración del trombo, modulando la intensidad de las manifestaciones clínicas o bien contribuyendo a la progresión de la aterosclerosis.

Aunque los macrófagos juegan un papel relevante en promover la inestabilidad de la placa, otros componentes celulares pueden ser importantes ^{41, 44, 47, 48}. Estudios in-vitro sugieren que los linfocitos-T pueden desempeñar un papel central. Por un lado, induciendo a los macrófagos la producción de metaloproteinasas mediante estimulación de la *ligandina CD40*, y por otro, a través de la producción de *interleucina-1* induciendo la apoptosis de células musculares lisas, que son la principal fuente de tejido fibroso.

Múltiples evidencias científicas han confirmado el papel que la respuesta inflamatoria local y sistémica juegan en la lesión aterosclerótica y en el desarrollo de eventos clínicos agudos (coronarios o cerebrovasculares)^{46, 49}. La placa de ateroma es una estructura dinámica y su estabilidad depende en último término del balance entre la actividad de inflamatoria, que favorece la progresión y complicación de la placa, y la actividad reparadora, que limita la respuesta local y promueve la estabilidad de la lesión. Por ello, los niveles séricos de mediadores de la inflamación pueden servir como marcadores de actividad de la placa y ser indicadores de la severidad y riesgo de accidente cerebrovascular. Numerosas sustancias han sido identificadas en los últimos años. Entre las citoquinas pro-inflamatorias destacan las interleucinas (especialmente la IL-1, IL-6), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el interferón-gamma (INF- γ). Estas moléculas incrementan los niveles de reactantes de fase aguda de la inflamación, tales como el fibrinógeno, la proteína C-reactiva (PCR), la ceruloplasmina y proteína amiloide-A. Varios estudios han mostrado que la elevación de los niveles de PCR es un factor pronóstico independiente en pacientes con enfermedad coronaria, arteriopatía periférica e ictus. Recientemente, Alvarez et al⁴⁴ demostraron que el aumento de estos niveles puede estar relacionado con el incremento de macrófagos y linfocitos-T en la placa, la asociación con placas complicadas (fenómenos de ulceración o hemorragia reciente) y la aparición de síntomas neurológicos, lo que puede convertir la determinación de PCR circulante como un marcador adicional de riesgo en pacientes con estenosis carotídea. Otros autores han intentado correlacionar diversas enzimas y sustancias implicadas en el metabolismo de la matriz extracelular, tales como las metaloproteinasas. En este sentido, Loftus et al⁵⁰ identificaron los niveles séricos de MMP-9 como un marcador de inestabilidad de placa carotídea.

B) NANOPARTÍCULAS CALCIFICANTES.

El término *nanobacteria* fue acuñado por Kajander y cols en 1992, para definir un agente contaminante en un cultivo celular⁵¹⁻⁵⁴. Se trataba de estructuras no detectables con los métodos microbiológicos hasta entonces conocidos. Poseen propiedades inusuales: un tamaño extremadamente pequeño (0.1-0.5 μ m), son resistentes a la rotura, a tinciones y fijaciones habituales, y excepcionalmente resistentes al calor⁵⁵.

Sin embargo, estructuras similares fueron descritas por Torella y Morita como responsables de la formación de cálculos renales y placas arteriales en 1981. Lo más curioso y llamativo es su extremado parecido con las *nannobacterias* descritas por el geólogo Robert L. Folk procedentes de especímenes geológicos. Su hipótesis consistía en que se trataban de microfósiles que previamente eran nanobacterias activas⁵⁶. Estructuras parecidas fueron localizadas en los fondos oceánicos y según publicó la revista Science en 1996 en un meteorito procedente de Marte, con el nombre de ALH 84001⁵⁷.

El debate estaba servido: ¿se trataba de organismos primitivos con posible implicación en el origen de la vida en la tierra?, ¿eran la prueba de la existencia de vida previa en el planeta Marte?, ¿eran causantes y transmisores de enfermedades?.

Existe una importante controversia sobre si las nanobacterias, también llamadas nanopartículas calcificantes, se pueden considerar un agente infeccioso o no, e incluso si cumplen criterios para ser considerados *organismos vivos*, ya que sus características, como veremos más adelante, se alejan un poco de los criterios que deberían cumplir para ser consideradas como tales. Sin embargo, en cultivos celulares este novedoso agente es capaz de reproducirse de forma aparentemente indefinida, pudiendo

obtenerse pases en cultivo celular hasta por 10 años ⁵⁸. Además se trata de una estructura ubicua y que, como veremos posteriormente, se ha podido detectar en fluidos y órganos humanos a muy diversos niveles, y que se encuentra presente hasta en el 80% de los sueros bovinos comercializados (FBS) ⁵⁹.

Sus características más importantes son las siguientes ⁵⁸:

B.1. MORFOLOGÍA:

Tinción Gram-negativa, filtrable con poros 0.22 μm , apariencia “bacteria-like” (organismos cocoides provistos de pared celular) y coraza con acúmulos de carbonato de apatita. Tamaño individual entre 80 y 500 nm, con el microscopio electrónico su apariencia es de estructuras tipo iglú. Una característica morfológica de particular interés para el tema que tratamos, es el hecho de que las partículas están rodeadas de una gruesa cubierta de fosfato cálcico (hidroxiapatita) ^{54, 55, 58}.

Las nanopartículas son pleomórficas y adquieren formas diversas dependiendo de si se multiplican en medio con o sin suero. La cubierta de hidroxiapatita es más voluminosa en medio sin suero. Cuando la concentración de suero en el medio es reducida por debajo del 5%, las nanobacterias comienzan a mineralizar y su tamaño crece debido a la deposición de calcio y fosfato en su superficie ⁶⁰. A través de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) es posible observar una especie de anillo formado por capas de minerales formado alrededor de la nanorganismo. El análisis químico mediante energía de dispersión de rayos X (EDX) de dichas capas, muestra picos visibles de calcio y fósforo. La gran capacidad de biomineralización de las nanopartículas se demuestra teniendo en cuenta que dicha formación de apatita solo se frena cuando los niveles de

calcio disminuyen hasta en un 50% y los niveles de fosfato se acercan a cero. Se ha demostrado que la formación de calcio de las nanopartículas es posible a niveles de pH de 7.4, es decir, los encontrados en situaciones fisiológicas⁶⁰.

Hasta la actualidad no se ha detectado DNA propio de estas partículas, los fragmentos hallados se relacionan con contaminación o DNA absorbido de su entorno. Su morfología corresponde a una vesícula “célula-like”, que posee la capacidad de precipitar en su membrana fragmentos de hidroxiapatita, y combinar dichos precipitados formando estructuras concéntricas denominadas *iglús*, que pueden contener nuevas vesículas formando conglomerados de nanopartículas⁶¹.

B.2. CRECIMIENTO Y METABOLISMO.

Se regeneran en 3 días en suero, metabolismo 10.000 veces más lento que E.coli, crecen mejor en medios aerobios, 5% CO₂ 95% aire. En medio sin suero su tiempo de regeneración se duplica (6 días). Las Tetraciclinas y los inhibidores de síntesis de proteínas quelantes de apatita inhiben el crecimiento de las nanopartículas, del mismo modo que antibióticos como el Trimetropim Sulfametoxazol, la Nitrofuantoína y la Ampicilina. Los quelantes de calcio como el EDTA y el citrato inhiben su crecimiento in vitro, y los bifosfonatos son nanobactericidas^{54, 55}.

Si al ultrafiltrado de nanopartículas se le añade únicamente medio libre de suero crecen muy lentamente y se fijan firmemente a la superficie del matraz. Los cultivos con el tiempo generan formaciones multicelulares cubiertas por capas de varios micrómetros de hidroxiapatita. Cuando se añade suero estéril dicha capa desaparece, obteniendo la típica estructura de bacteria cocoide móvil, que posteriormente progresa y crece adquiriendo

formas más alargadas. Tanto las formas cocoides como las alargadas poseen idénticos antígenos de superficie, demostrando que se tratan de la misma estructura que adquiere diferente morfología⁶².

Su multiplicación puede ser detectada mediante técnicas específicas de ELISA, medida de la densidad óptica (absorbancia), conteo microscópico directo, SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) o incorporación de metionina y uridina.

Algunos experimentos aseguran que la microgravedad afecta al grado y propiedades de la apatita formada. De hecho, en microgravedad las nanobacterias se multiplican 4.6 veces más rápido que en condiciones estacionarias. Curiosamente, se ha observado que largos periodos en microgravedad en los astronautas, se acompañan de la pérdida de masa ósea y avance de la formación de piedras en el riñón⁶⁰.

B.3. CONSIDERACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS COMO SERES VIVOS⁵⁴.

Existe un arduo debate que discute cual es el tamaño y características mínimas necesarias para que una formación pueda considerarse que esté viva. Según Maniloff, la estructura celular debe poseer ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas funcionantes y su tamaño debe ser de al menos 140 nm, sin embargo recientemente se ha demostrado que un genoma más simple puede producir una célula sintética viable como el *Mycoplasma laboratorium*⁶⁰.

El aislamiento de alguna clase de ácido nucleico en la *nanobacteria* ha sido difícil. Debido a su espesa cubierta no pueden ser lisadas mediante métodos habituales y es necesario someterlas al uso de ácido o quelantes tipo EDTA. Kajander y cols., desarrollaron métodos específicos para la

detección y cultivo de estos organismos, y consiguieron extraer 16S rRNA de dichas estructuras, englobándolas en la subclase α -2 de las *Proteobacterias*, y por tanto afirmaron haber descubierto un nuevo organismo vivo denominándolo el “agente autoreplicante cultivable más pequeño del mundo”⁵³. Miller et al contribuyeron a esta labor, declarando a las *nanobacterias* capaces de sintetizar proteínas y al menos de un tipo de antígeno, estando en posesión de DNA⁶³. Sin embargo, tendencias opuestas encabezadas por Cisar argumentaron que el DNA hallado procedía de un contaminante, posiblemente de la bacteria *Phyllobacterium mysinacearum*, contaminante común en las reacciones PCR⁶⁴. Tras lo cual, el mismo Kajander reconoció no tener pruebas irrefutables de la condición de la estructura microscópica por lo que propuso un cambio de nomenclatura denominándolas *nanopartículas calcificantes*⁶⁵. En la misma línea, Puskas et al.⁶⁶ argumentaron dos características a favor de la consideración de las nanopartículas como seres vivos: la capacidad de presentar un crecimiento óptimo a 37°C, resultando inhibido su crecimiento a temperaturas menores, y el hecho de que la incorporación de aminoácidos radiomarcados, prueba de su actividad metabólica, es más eficaz cuando son sometidas a un proceso de desmineralización con EDTA, por tanto no se trata de un simple un proceso de absorción o cocrystalización que se produce sobre la cubierta de apatita. Desgraciadamente tampoco fueron capaces de extraer y amplificar secuencias específicas de rDNA para *nanobacteria*, y por tanto proponen también cambiar el nombre de “nanobacteria” por “agente o partícula nanobacteria-like”.

B.4. DETECCIÓN:

Debido a que las nanopartículas pasan a través de poros de tamaño de 0.22 μm , que excluyen la mayoría de los microbios comunes, la filtración es el primer método para su aislamiento y posterior cultivo ⁶⁰.

Al microscopio óptico, aparecen como diminutas partículas cocoides, que durante su cultivo se vuelven cada vez más visibles, opacas y de mayor tamaño. Al microscopio electrónico, las nanopartículas no adheridas tienen una forma irregular, con diámetros de entre 80-500nm, rodeándose en cultivos más antiguos de una áspera coraza de cristales de hidroxiapatita ⁶⁷.

Las nanopartículas intactas se pueden reconocer mediante anticuerpos monoclonales contra los peptidoglicanos y proteínas porinas propias de su estructura, como por ejemplo el anticuerpo monoclonal primario 8D10 *anti-nanobacteria*, que es específico para la proteína porina de superficie *nanobacteriana* ⁶⁶.

El método Hoechst DNA fluorocromo tiñe las nanopartículas. Bajo el microscopio electrónico de transmisión (TEM) y la tinción negativa aparecen como partículas oscuras debido a su contenido de apatita. El método más potente y novedoso, es la detección mediante anticuerpos *anti-nanobacteria* marcados con oro coloidal. Pero su estudio al TEM su soporte estructural con mineral de apatita las hace visibles sin necesidad de fijación ⁵⁵.

B.5. EFECTOS DE LAS NANOPARTÍCULAS.

La nanopartículas calcificantes pueden ser citotóxicas en cultivos celulares de fibroblastos. Tras la exposición se produce un fenómeno de endocitosis, y dicha internalización parece necesaria para la citotoxicidad,

posiblemente consecuencia de la degradación de productos tóxicos de las *nanobacterias* en los lisosomas ⁶⁸. Además, la citotoxicidad depende de la concentración de nanopartículas y el tiempo de exposición ⁶⁰. Parece que algunos linfocitos también se pueden ver afectados por estas estructuras *nanobacteria-like*, pero son necesarias dosis considerablemente mayores de las mismas para conseguir este efecto tóxico ^{62, 68}.

La ubicuidad de las nanopartículas y su potencial citotoxicidad suscita una alarma: ¿se trata de contaminantes de suero y vacunas potencialmente peligrosos para el ser humano?, ¿es necesario extremar las precauciones y aumentar los procedimientos de esterilización de dichos compuestos, añadiendo métodos que erradiquen eficazmente las nanopartículas?. Por suerte, las concentraciones de nanopartículas necesarias para ejercer esa citotoxicidad deben ser altas ⁵⁹. La prevalencia de antígeno de *nanobacteria* en el suero de voluntarios adultos finlandeses fue de aproximadamente el 5%. Otro estudio sueco revela la existencia de anticuerpos contra el agente en el 14% de la sangre de donantes sanos. Sin embargo, en algunas enfermedades (como la aterosclerosis o la hemodiálisis) los marcadores de *nanobacterias*, anticuerpos y antígenos, se encuentran presentes en suero u orina en la mayoría de los pacientes ⁵⁹.

Estudios de experimentación animal demuestran la apetencia de las nanopartículas por el riñón cuando son administradas via intravenosa, puede ser que el tracto urinario proporcione un nicho adecuado para su adherencia y crecimiento, con el resultado de la producción de biocristalización a ese nivel ^{60, 67} (Figura 1).

Sus defensores les atribuyen la capacidad de interactuar con otros microorganismos, de hecho afirman que su crecimiento es mayor en presencia de otras bacterias. A la vez, los acúmulos de calcio formados por

las nanopartículas pueden atraer a otros agentes y favorecer el desarrollo de infecciones ⁶⁵. También presentan la particularidad de adherirse a objetos inertes, como implantes protésicos, favoreciendo igualmente infecciones crónicas de difícil tratamiento antibiótico ⁶⁵.

La patogenicidad de estas estructuras incluye efectos conocidos sobre la coagulación sanguínea y formación de trombo, la elevación de los niveles de calcio (Ca^{+2}) intracelular, con sus consecuencias (estimulación de la muerte celular por apoptosis, crecimiento incontrolado de células tumorales...), siendo a su vez inductoras de enfermedades autoinmunes, de la inflamación y de la calcificación patológica ⁶⁵.

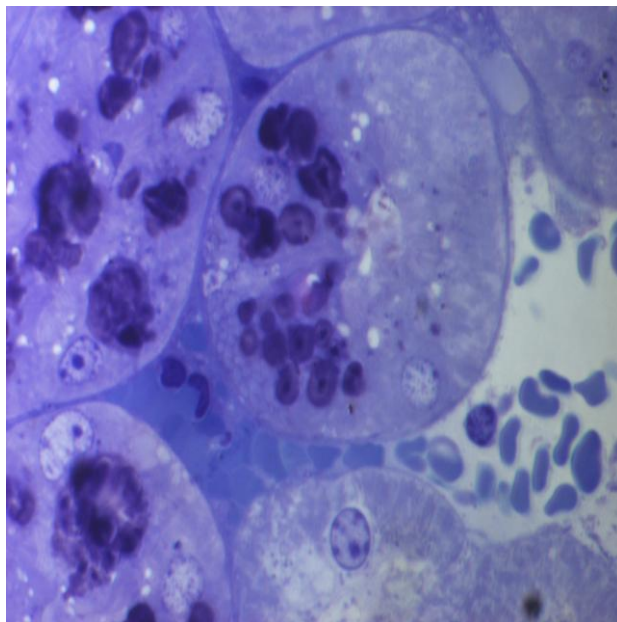


Figura 1: Estructuras *nanobacteria-like* detectadas a nivel del tejido renal.

B.6. RELACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON ENFERMEDADES HUMANAS.

Pese a la controversia que las rodea y la dificultad de su clasificación dentro de las especies conocidas, las nanopartículas son capaces de propagarse y producir muerte celular *in vitro*, y han sido detectadas o relacionadas con numerosas enfermedades humanas ^{54, 65}.

Una de sus principales capacidades es la de producir cristales de carbonato-apatita a pH neutro y a niveles fisiológicos de fosfato y calcio. Las *nanobacterias* han demostrado la capacidad de producir calcificación intra y extracelular en modelos *in vitro* ⁵⁵. Asimismo, se han detectado en el torrente sanguíneo, y se han relacionado con procesos de calcificación patológica a diferentes niveles: cálculos renales ⁵⁸, calcificaciones placentarias patológicas, microlitiasis testicular ^{69, 70}, periodontitis ⁷¹. Su detección en estructuras vasculares de especímenes humanos, válvulas cardíacas ⁷²⁻⁷⁵ y placas arterioscleróticas ⁶⁶ ha sido probada por numerosos estudios (Tabla III).

AÑO	AUTOR	HALLAZGO
1998	Kajander et al.	Cultivo nanopartículas a partir de cálculos renales.
2000	Hjelle et al.	Aislamiento NP en riñón poliquistico, ¿relación patogénica?.
	García-Cuerpo et al.	Cumplimiento de los postulados de Koch para la formación de cálculos renales.
2001	Kajander et al.	Presencia nanopartículas en vacunas humanas y animales.
2002	Wen et al.	Detección de nanopartículas en la bilis humana.
2003	Sedivy y Battistutti.	NP en cáncer de ovario con cuerpos de psammoma.
	Wen et al.	Detección de nanopartículas en la vesícula y cálculos biliares.
2004	Miller et al.	Detección de nanopartículas en calcificaciones cardiacas.
	Jelic et al.	Calcifilaxis de la válvula mitral causada por nanopartículas.
	Khullar et al.	Nanopartículas halladas en los cálculos renales.
2005	Puskas et al.	Estructuras similares a NP cultivadas a partir de placas ateroscleróticas de humanos.
2006	Shiekh et al.	Reproducción de calcificaciones a nivel de los túbulos renales mediante inyección intravenosa de nanopartículas.
	Tsurumoto et al.	Estructuras nanobacteria-like en líquidos sinoviales humanos
2007	Jelic et al.	Detección de nanobacterias en válvula aórtica calcificada.
2008	Bratos et al.	Detección y cultivo de NP a partir de válvulas aórticas.
	Zhou et al.	Detección de estructuras <i>nanobacteria-like</i> en prostatitis
	Schwartz et al.	Modelo experimental en conejo de daño arterial carotídeo y exposición a nanopartículas
2009	Zhang et al.	Relación de las nanopartículas con la periodontitis.
2010	Pasquinelli et al.	Detección de <i>nanobacteria</i> en calcificaciones placentarias.
2011	Kaya et al.	Relación niveles anticuerpos CNP/calcificación coronaria

Tabla III: Relación entre las nanopartículas (NP) y las enfermedades humanas⁵⁴.

C) CALCIFICACIÓN ARTERIAL.

C.1. DEFINICIÓN Y TIPOS.

La calcificación arterial es un proceso por el cual el calcio se deposita ectópicamente en los vasos sanguíneos, más frecuentemente en la capa elástica y muscular de arterias como la aorta, las coronarias, las carótidas o los vasos iliofemorales, así como en las válvulas cardíacas ⁷⁶. Se sospecha que la extensión y la severidad de la mineralización influye en la morbilidad y mortalidad de las enfermedades cardiovasculares ⁷⁷. Prueba de ello es el aumento exponencial de las publicaciones a este respecto, siendo actualmente un tema de gran interés ⁵⁴. Lo que previamente se tomó como un proceso pasivo, degenerativo y asociado a la edad, actualmente se entiende como un proceso patológico, producido por una disregulación del metabolismo mineral ^{78, 79}, que comparte mecanismos biológicos con la formación embriológica de hueso, como se comentará más adelante ⁷⁷.

Existen dos tipos de calcificación arterial: la calcificación intimal y la calcificación de la capa media. La calcificación intimal es la forma más frecuente, se asocia a la aterosclerosis y se trata de calcificación focal de la placa arterioesclerótica relacionada con el proceso inflamatorio que se produce en la zona ^{76, 80}.

La calcificación de la capa media, arterioesclerosis o esclerosis de Mönckeberg, se encuentra relacionada con la edad avanzada, la insuficiencia renal crónica, la osteoporosis, la hipertensión arterial y la diabetes ^{76, 80}. En un principio se consideró un proceso benigno no estenótico ni trombogénico, pero en la actualidad se ha demostrado su asociación con una mayor morbimortalidad cardiovascular y mayor riesgo de amputación en los pacientes diabéticos y en insuficiencia renal crónica terminal ^{76, 78}.

En general, la calcificación intimal y media no son distinguidas en los estudios epidemiológicos, por tanto, no se puede valorar si la localización de la calcificación tiene alguna repercusión sobre el aumento del riesgo cardiovascular. Sin embargo, en un estudio de London et al. sí se distinguía la localización morfológica de la calcificación arterial mediante rayos X, ambos tipos de calcificación, intimal y media, suponían un aumento de la mortalidad en pacientes en hemodiálisis ⁸¹. Estos dos tipos de calcificación están íntimamente ligados, ocurren con frecuencia simultáneamente, y contribuyen sinérgicamente a la enfermedad ⁸².

Hasta hace poco tiempo, el proceso de calcificación se consideraba un proceso pasivo que ocurría como consecuencia a una respuesta no específica al daño tisular o necrosis ⁸². Actualmente, se considera que el proceso de calcificación arterial se trata de un proceso activo, controlado por la expresión de proteínas que controlan tanto la activación como la inhibición de la calcificación por diversas células. Las células implicadas varían según el lugar donde se origine la calcificación. En la calcificación intimal se implican macrófagos, mastocitos y células musculares lisas vasculares. La calcificación de la media es generada casi exclusivamente por las células musculares lisas ⁷⁹.

C.2. RELACIÓN ENTRE LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL Y LA DESMINERALIZACIÓN ÓSEA.

La aparición simultánea de calcificación vascular y desmineralización ósea se tomó en un primer momento como un hallazgo relacionado con la edad y el proceso de envejecimiento, pero en numerosos estudios esta asociación ha continuado siendo significativa una vez ajustados los pacientes por edad, por tanto esto sugiere que se trata de un proceso independiente

de la edad. Sin embargo, los mecanismos responsables de esta asociación no son bien conocidos. Se han expuesto las siguientes teorías^{77, 80}:

- I. Que la enfermedad arterial sea la responsable de las anomalías óseas.

Como resultado de la afectación por aterosclerosis de la circulación intraósea se puede producir una reducción del aporte sanguíneo a la médula ósea. A favor de esta teoría existen estudios que demuestran una reducción de la perfusión ósea en mujeres con osteoporosis, comparadas con mujeres que presentan simplemente osteopenia o densidad ósea normal.

- II. La existencia de factores dismetabólicos o tóxicos actuando de forma simultánea sobre los vasos y el hueso.

Esta teoría defiende que tanto la osteoporosis como la calcificación arterial son influenciadas por factores de riesgo comunes, como la diabetes, la dislipemia, el estrés oxidativo o la acumulación de productos finales de la glucosilación. Todos estos factores de riesgo tienen como denominador final el proceso de la inflamación.

- III. La influencia directa o indirecta de las células y el metabolismo óseo sobre el sistema arterial.

Existen estudios que relacionan a los osteoblastos con el metabolismo del tejido graso y la secreción de insulina. La *osteocalcina* juega un papel importante, regulando la expresión y secreción de *adiponectina* en los adipocitos. La adiponectina protege de la hipertensión arterial, suprime la aterosclerosis y activa a la osteoblastogénesis. Existe una correlación inversa entre los niveles de adiponectina y osteocalcina, la rigidez arterial y la progresión de

las calcificaciones coronarias. Otras hormonas involucradas en la regulación endocrina del tejido adiposo y el metabolismo energético pueden afectar a la estructura ósea como la *leptina*. La leptina es un inhibidor potente de la formación de hueso y favorece la calcificación arterial.

La calcificación de los vasos sanguíneos que se acompaña de un descenso de la mineralización en el hueso ha sido denominada *calcificación paradójica*, y se ha podido observar tanto en la población general como en enfermedades como la osteoporosis, insuficiencia renal crónica o enfermedad de Paget ⁷⁶. Este proceso de correlación inversa de calcificación vascular y pérdida de la mineralización ósea no solo se da en procesos de enfermedad ósea grave, también se ha podido detectar en mujeres perimenopáusicas con baja prevalencia de osteoporosis y en población sana de mediana edad, hombres y mujeres ^{76, 78}.

La calcificación de la capa media arterial en estudios experimentales es un proceso activo mediado por células musculares lisas que activamente depositan cristales de hidroxapatita. En la calcificación vascular tiene un papel clave el fosfato y por tanto niveles elevados de fosfato en pacientes nefróticas y en hemodiálisis son un factor de riesgo para la calcificación vascular ⁷⁶.

La calcificación arterial y valvular es un proceso activo similar al de formación de hueso en el tejido óseo, en el que intervienen una variedad de genes y proteínas relacionadas con el metabolismo óseo, que supone la transdiferenciación de las células musculares lisas vasculares a células fenotípicamente distintas, *células osteoblasto-like* ⁸⁰. Así mismo las células musculares lisas de la túnica media de arterias calcificadas de pacientes en

diálisis expresan proteínas relacionadas con osteoblastos como la osteopontina, el colágeno tipo I, sialo-proteínas del hueso y fosfatasa alcalina y el factor de transcripción osteoblástico CBFA-1. Así adquieren un fenotipo *osteoblasto-like* a la vez que existe un infrarregulación de los marcadores típicos de las propias células musculares lisas. Esta transdiferenciación a un fenotipo osteogénico es posible por el origen común de las células musculares lisas y las células óseas. Queda por determinar cuál es el estímulo que inicia este proceso, se han presentado como posibles candidatos: los niveles de fosfato y calcio, la fosfatasa alcalina, el BMP-2, la LDL, la IL-4, TGF- β , el estrés mecánico y el suero de paciente urémicos ⁷⁶.

Cabe preguntarse si el proceso de calcificación vascular es o no irreversible. Algunos investigadores creen que osteoclastos o células *osteoclasto-like* pueden producir remodelación de las calcificaciones vasculares. La pared vascular contiene o puede atraer precursores osteoclastóticos en forma de monocitos o bien células multinucleadas *osteoclasto-like* durante el proceso de inflamación aterosclerótica. Además, la diferenciación y la actividad de los osteoclastos óseos se regula por el estímulo de citoquinas producidas por los osteoblastos, como el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), el receptor activador del NG- κ B ligando (RANKL), y citoquinas inhibitorias como la osteoprotegerina (OPG), IL-18 e IL-12. Todas estas moléculas se han detectado en la pared vascular bajo determinadas circunstancias: M-CSF es producido por endotelio y células musculares, RANKL no se produce en arterias normales pero sí en el contexto de aterosclerosis o calcificación arterial, y las células endoteliales estimuladas producen RANKL ⁷⁶.

La diferencia con respecto al hueso consiste en que los osteoblastos activos en el hueso comienzan el ciclo de remodelación mediante la activación y reclutamiento de osteoclastos, mientras que las células

vasculares con fenotipo osteoclástico, activamente *inhiben* la reabsorción de las calcificaciones vasculares. Esto puede explicar la progresiva calcificación vascular que ocurre en presencia de la activación osteoclástica elevada durante el proceso osteoporótico ⁷⁶.

La Osteoprotegerina (OPG) es una molécula de la familia de los factores de necrosis tumoral que regula la masa ósea mediante la inhibición de la diferenciación y activación de los osteoclastos. Esta proteína actúa como un receptor competitivo que previene que el RANKL de las células estromales medulares del hueso y de los osteoblastos se ligue al RANK de los precursores de osteoclastos y se produzca la diferenciación osteoclástica. Como se ha dicho, la osteoprotegerina se produce entre otros muchos tejidos en la pared vascular, sin embargo el RANK y RANKL no se expresan en las arterias normales.

Por último, el TGF- β incrementa la expresión de RANKL y suprime la OPG en las células endoteliales, mientras suprime el RANKL del linaje osteoblástico e incrementa el ratio OPG/RANKL en el hueso, inhibiendo su reabsorción ⁷⁶.

C.3. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL.

La frecuencia de aparición de calcificaciones en estructuras vasculares no es desdeñable. La osificación se ha identificado en el 60% de las reestenosis de válvulas aórticas después de realizar una valvuloplastia con balón. Aproximadamente el 15% de los especímenes procedentes de placas ateroscleróticas carotídeas están calcificados ⁸³.

El deterioro de la complianza y la elasticidad de la pared arterial producido por la progresiva calcificación de la arteria aorta en el humano

puede terminar provocando un fracaso cardíaco congestivo^{77,78}. A nivel de la válvula aórtica, las calcificaciones pueden producir una estenosis aórtica que amenace la vida del sujeto. Los últimos estudios apuntan a un origen común de las calcificaciones en la válvula aórtica y las arterias periféricas. Sobre las arterias coronarias, las calcificaciones producen una reducción de la respuesta vasomotora y alteración de la estabilidad de la placa aterosclerosa. Además parece producirse un aumento de las fuerzas hemodinámicas de estrés en aquellas zonas de transición entre los depósitos de calcio y otros componentes de la placa⁷⁷.

Por tanto, aunque algunos estudios iniciales conferían un efecto protector y estabilizador de placa a la presencia de calcificaciones^{84, 85}, la creencia actual se inclina hacia un peor pronóstico de aquellas lesiones que presentan calcificaciones. El dato clave que determina que la calcificación favorezca o proteja de puede estar relacionado con la extensión y distribución de las calcificaciones así como a la presencia de células inflamatorias asociadas⁷⁹. Algunos autores defienden que la calcificación inicialmente desestabiliza la placa, ya que la rotura se produce más frecuentemente en áreas de interfase de diferentes densidades, más tarde las áreas calcificadas empiezan a unirse, disminuyendo las áreas de interfase y estabilizando la placa⁸³.

En la actualidad, la calcificación arterial por sí misma, se puede considerar como un marcador de aterosclerosis. Cuanto más extensa es la calcificación en las arterias coronarias, más significativas son las estenosis halladas, la detección de calcificación vascular en una radiografía simple, se considera como un marcador sensible de aterosclerosis. Pero los métodos más sensibles para diagnóstico de calcificaciones en el territorio vascular son la radiación mediante haz de electrones (electron beam) o la tomografía computerizada multidetector. Estas últimas técnicas nos permiten medir la

masa de calcio en las arterias o el llamado *score* de calcio, y utilizarlo para detectar aquellos pacientes de alto riesgo para eventos adversos cardiovasculares^{54, 83}. La “*American Heart Association*” y el “*American College of Cardiology*” incluyen en sus guías el *score* de calcio como herramienta para tomar decisiones clínicas⁸⁶. La cuantificación de calcio en las arterias coronarias mediante tomografía computerizada multidetector parece ser un predictor de futuros eventos cardiológicos mejor que cualquiera de los otros factores de riesgo convencionales⁸⁷.

C.4. FASES DE LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL Y SU RELACIÓN CON LA COMPLICACIÓN DE LA PLACA.

Sobre la base de modelos experimentales en ratón, New et al., exponen un prototipo de modelo de calcificación arterial durante el proceso de inflamatorio ateroscleroso que se compondría de las siguientes fases⁷⁸:

- **Fase inicial:** los macrófagos secretan citoquinas pro-osteogénicas.
- **Fase de propagación:** las células musculares lisas vasculares estimuladas se diferencian hacia un fenotipo osteogénico y segregan vesículas matriciales calcificantes. Las células que mueren por apoptosis en el proceso inflamatorio producen asimismo núcleos apoptóticos que forman focos de deposición de hidroxapatita y, por tanto, microcalcificaciones. En la placa arterial los procesos de inflamación y calcificación se dan simultáneamente, existiendo zonas en las que se superponen. En este estadio las calcificaciones visualizadas son puntiformes (*spotty calcification*). En los estudios *in vitro* se ha detectado la presencia de una retroalimentación positiva entre la inflamación y la calcificación, que hace progresar la

calcificación arterial. Las placas que presentan calcificaciones puntiformes ($<65\mu\text{m}$), que se localizan en la cápsula fibrosa que recubre el núcleo necrótico de las placas aterosclerosas, son más peligrosas y tendentes a complicarse⁸⁸.

- **Estadio final:** se caracteriza por presentar muy poca inflamación y una calcificación avanzada. Se piensa que la calcificación en este estadio es irreversible, y por tanto todas aquellas medidas terapéuticas se deben poner en marcha en los estadios anteriores. La placa presenta calcificaciones macroscópicas y es más estable.

C.5. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES SÉRICOS DE INHIBIDORES DE LA CALCIFICACIÓN Y LA VULNERABILIDAD DE LA PLACA.

De forma análoga a lo expuesto anteriormente en el apartado sobre la vulnerabilidad de la placa y sus marcadores séricos, recientemente han aparecido sustancias cuyos niveles séricos se relacionan con el proceso e intensidad de la calcificación arterial. La identificación de factores séricos que se puedan utilizar como marcadores de calcificación arterial y del aumento del riesgo cardiovascular que asocia, supondría un gran avance en el diagnóstico y prevención de las enfermedades cardiovasculares. Por eso en los últimos años proliferan las publicaciones en este sentido⁸⁹⁻⁹¹.

La osteopontina (OPN) es un inhibidor de la calcificación que puede ser secretado por diferentes tipos celulares en respuesta a determinados estímulos, su secreción es posible por todas las células vasculares, incluidos los macrófagos activados de la aterosclerosis. La osteoprotegerina (OPG) por su lado, pertenece a la familia de factores/receptores de necrosis tumoral, las células lisas vasculares producen OPG, en circunstancias normales es un

factor angioprotector, que aumenta las defensas, previene la apoptosis de las células endoteliales e inhibe la calcificación vascular.

Niveles elevados de OPG en suero se han correlacionado con la severidad de la arteriopatía periférica ⁹², la insuficiencia cardíaca ⁹³, la angina inestable ⁹⁴, y el infarto agudo de miocardio ⁹⁵. Una revisión del tema realizada por Nybo confirma a la OPG como un predictor independiente de afectación cardiovascular y mortalidad ⁹⁶.

Vik et al. En su estudio demostraron una relación inversa entre la escala GSM de la placa carotídea y los niveles en suero de OPG en una muestra relativamente pequeña de pacientes con placa carotídea ⁹⁰. Más tarde, el estudio de Kadoglou et al ⁸⁹ vino a confirmar dichos hallazgos, demostrando que los niveles en suero de OPN y OPG estaban elevados en aquellos pacientes que presentan estenosis carotídea, y que dichos niveles se relacionan inversamente con el valor del GSM ecográfico. Este último estudio fue más allá relacionando los niveles más elevados de marcadores séricos con aquellos pacientes que habían presentado sintomatología previa.

Quercioli et al ⁹¹, proponen a los niveles séricos del complejo RANKL/OPG como potencial marcador de la calcificación coronaria y predictor de eventos coronarios en asociación con la prueba de imagen CAC (*coronary artery calcium*) score, calculada a través de estudio CT de las arterias coronarias. Sin embargo, se necesita una investigación más amplia, la localización de isoformas selectivas de tejido que mejoren la sensibilidad y especificidad del RANKL/OPG como marcador. Straface et al, en un artículo reciente publicado en la revista *Stroke*, relacionan algunos genotipos del gen de la OPG y la elevación de la OPG en suero como factor de riesgo independiente que contribuye a la patogénesis de la aterosclerosis carotídea ⁹⁷.

C.6. FACTOR CAUSAL QUE INICIA LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL.

Para que se inicie el proceso de biomineralización se precisa como comienzo un *nidi* (núcleo de mineralización inicial) y un ambiente favorable en el que se encuentren disueltos los componentes de los cristales a concentraciones cercanas a la saturación, en conjunción con la ausencia de inhibidores de la formación de cristales. Por tanto, las nanopartículas, capaces de formar estos *nidi*, son las candidatas ideales para inicial y acelerar el proceso de calcificación patológica *in vivo*, más aún teniendo en cuenta que la sangre contiene fosfatos a niveles cercanos a los de saturación⁶⁰.

Kajander et al. demostraron la capacidad de los cultivos de nanopartículas para producir calcificación *in vitro*, la principal condición para que esto ocurra es que el medio de cultivo presente bajos niveles de suero, ya que el suero contiene inhibidores de la formación de cristales de apatita (osteopontina, osteocalcina, fetuina...) ⁵⁵. Por tanto la presencia de nanopartículas, por sí sola, no causa la calcificación de manera inexorable, sino que, otros componentes ambientales se tienen que cumplir para que esto ocurra.

C.7. POSIBLES TERAPIAS.

Varias terapias han sido ensayadas para el tratamiento de la calcificación arterial y la erradicación de la posible causa mediada por nanobacterias.

La terapia de quelación con EDTA, teóricamente presenta el beneficio de eliminar el calcio y también añade un efecto antioxidante. Sin embargo Ernst et al. defienden que dicho beneficio no existe y además provoca numerosos efectos colaterales, y por tanto se trata de una terapia

completamente obsoleta tanto para el tratamiento coronario como a nivel periférico^{98,99}.

Maniscalco et al., sin embargo, diseñaron un estudio observacional para evaluar el efecto de una terapéutica combinada con un preparado de vitaminas, EDTA y Tetraciclinas, sobre el score de calcio coronario de pacientes con angina estable. Sus resultados objetivaban una disminución del score de calcio en un alto porcentaje de pacientes, mientras que los efectos adversos fueron muy leves. Sin embargo el carácter observacional del estudio, la falta de grupo control y el escaso tamaño muestral restan evidencia a dichos hallazgos⁸⁷.

La vitamina K parece intervenir en el proceso de calcificación mediante la carboxilación de dos proteínas: la osteocalcina (promotora de la mineralización ósea) y la proteína matricial G1a (inhibidora de la calcificación de tejidos blandos). Existen estudios que demuestran que la vitamina K posee un papel primordial para el mantenimiento de la masa ósea, y que la cantidad de vitamina necesaria para la óptima γ -carboxilación de la osteocalcina es significativamente mayor que la proporcionada únicamente por la dieta. Recientes investigaciones sugieren, aunque con mucho menor grado de evidencia, que la deficiencia de vitamina K supone un factor de riesgo para la calcificación arterial, relacionando de esta manera ambas patologías: osteoporosis y calcificación arterial. Sin embargo existen aún importantes dudas por esclarecer antes de utilizar este tipo de terapéutica, sobre todo la dosis ideal para conseguir el efecto beneficioso sin importantes efectos adversos¹⁰⁰.

Dentro de la misma línea de investigación que relaciona la osteoporosis y la calcificación arterial, experimentos animales con bifosfonatos concluyen que dicho medicamento es capaz de inhibir la

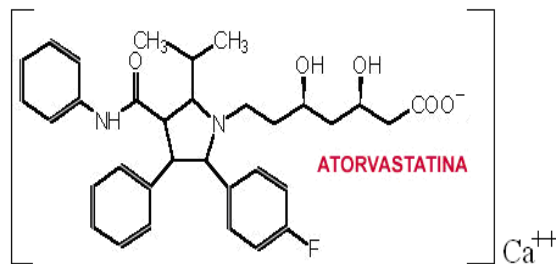
calcificación en arterias y válvulas cardíacas a dosis similares a las utilizadas para inhibir la reabsorción de hueso ¹⁰¹.

Estudios experimentales han probado la acción inhibidora de la formación de osteoclastos y de la reabsorción ósea de las estatinas, así como su efecto promotor de la formación de nuevo hueso. Estas características inducen a pensar que las estatinas pueden ser fármacos beneficiosos para el tratamiento de la osteoporosis y por consiguiente de la calcificación arterial ⁷⁹. Sin embargo muy pocos estudios han mostrado su efectividad en este sentido ¹⁰².

D) ATORVASTATINA.**D.1. FICHA TÉCNICA.**

En nuestro estudio utilizamos la Atorvastatina Ratiopharm. La ficha técnica de este medicamento es ofrecida por el Ministerio de Sanidad y Consumo a través de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.

Su fórmula química es $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2Ca$ y tiene un peso molecular de 1155.34, como chorzidrato. Sus formas farmacéuticas son: tabletas.



Se dispensa en la siguientes presentaciones:

- Atorvastatina ratiopharm 10 mg comprimidos recubiertos con película EFG
- Atorvastatina ratiopharm 20 mg comprimidos recubiertos con película EFG
- Atorvastatina ratiopharm 40 mg comprimidos recubiertos con película EFG
- Atorvastatina ratiopharm 80 mg comprimidos recubiertos con película EFG

En nuestro caso utilizamos la Atorvastatina ratiopharm 10 mg comprimidos recubiertos con película EFG.

D.1.1. Composición cualitativa y cuantitativa.

Cada comprimido recubierto con película contiene: Atorvastatina (cálcica) 10mg. Excipientes: principalmente Lactosa monohidrato 64,0 mg.

Lista completa de excipientes: estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio, celulosa microcristalina (E-460), sílice coloidal anhidra, butilhidroxianisol (E-320), crospovidona, hidrogenocarbonato de sodio, sacarosa, triesterato de sorbitán, estearato de macrogol 40, dimeticona y 2, Bromo-2-Nitropropano-1,3-diol.

Recubrimiento: lactosa monohidrato, hipromelosa (E-464), dióxido de titanio (E-171) y macrogol 4000.

D.1.2. Forma farmacéutica.

Comprimidos recubiertos con película.

Son comprimidos oblongos, biconvexos, ranurados y de color blanco.

El comprimido se puede dividir en mitades iguales.

D.1.3. Datos clínicos: Indicaciones terapéuticas.

- **Hipercolesterolemia:**

Como tratamiento adicional a la dieta en la reducción del colesterol total elevado, el colesterol LDL, la apoproteína B y los triglicéridos en pacientes con hipercolesterolemia primaria incluyendo la hipercolesterolemia familiar (variante heterocigótica) o hiperlipidemia combinada (mixta) (correspondiente a los Tipos IIa y IIb de la clasificación de Fredrickson) cuando la respuesta obtenida con la dieta u otras medidas no farmacológicas ha sido inadecuada.

También está también indicada, para reducir el colesterol total y colesterol LDL en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica, en terapia combinada con otros tratamientos hipolipemiantes (por ejemplo, aferesis de las LDL) o si no se dispone de estos tratamientos.

- **Prevención de la enfermedad cardiovascular:**

Prevención de eventos cardiovasculares en pacientes considerados de alto riesgo de sufrir un primer evento cardiovascular, como tratamiento adyuvante a la corrección de otros factores de riesgo.

D.1.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

D.1.4.1. Propiedades farmacodinámicas:

Atorvastatina pertenece al grupo farmacoterapéutico de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (Código ATC: C10A A05).

Atorvastatina es un inhibidor selectivo y competitivo de la HMG-CoA reductasa, la enzima limitante responsable de la conversión del 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A a mevalonato, un precursor de los esteroides, incluyendo el colesterol. En el hígado se incorporan los triglicéridos y el colesterol a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y se liberan al plasma para su distribución en los tejidos periféricos. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se forman a partir de las VLDL y se catabolizan principalmente a través del receptor con elevada afinidad para las LDL (receptor LDL).

Atorvastatina reduce las concentraciones plasmáticas de colesterol y de las lipoproteínas Inhibiendo en el hígado la HMG-CoA reductasa y la subsiguiente biosíntesis hepática de colesterol y aumentando en la superficie

celular el número de receptores hepáticos para la LDL, lo que da lugar a un incremento de la absorción y el catabolismo de las LDL.

Atorvastatina reduce la producción de LDL y el número de partículas LDL. Atorvastatina produce un profundo y sostenido aumento en la actividad de los receptores para la LDL, junto con una modificación beneficiosa en la calidad de las LDL circulantes. Atorvastatina es eficaz en la reducción del colesterol-LDL en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica, una población que no responde habitualmente a la medicación hipolipemiente.

Las reducciones del colesterol total, colesterol-LDL y apoproteína B han demostrado reducir el riesgo de episodios cardiovasculares y la mortalidad cardiovascular. Aún no han finalizado los estudios de mortalidad y morbilidad con atorvastatina.

D.1.4.2 Propiedades farmacocinéticas:

- **Absorción:** Atorvastatina se absorbe rápidamente tras su administración oral; las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) se alcanzan al cabo de 1 a 2 horas. El grado de absorción aumenta en proporción con la dosis de atorvastatina. Tras su administración oral, los comprimidos recubiertos de atorvastatina tienen una biodisponibilidad del 95% al 99% comparados con la de las soluciones orales. La biodisponibilidad absoluta de atorvastatina es de aproximadamente un 12% y la disponibilidad sistémica de la actividad inhibitoria de la HMG-CoA reductasa es de aproximadamente un 30%. La baja disponibilidad sistémica se atribuye a un aclaramiento pre-sistémico en la mucosa gastrointestinal y/o a un metabolismo hepático de primer paso.

- **Distribución:** El volumen medio de distribución de atorvastatina es de aproximadamente 381 L. La atorvastatina se une a las proteínas plasmáticas en $\geq 98\%$.
- **Metabolismo:** La atorvastatina se metaboliza por el citocromo P450 3A4 a sus derivados orto- y parahidroxilados y a distintos productos de la beta-oxidación. Aparte de utilizar otras rutas metabólicas, estos productos son posteriormente metabolizados mediante glucuronidación. Aproximadamente el 70% de la actividad inhibitoria de la HMG-CoA reductasa circulante se atribuye a los metabolitos activos.
- **Excreción:** atorvastatina se elimina principalmente por la bilis tras el metabolismo hepático y/o extrahepático. No obstante, el fármaco no parece sufrir una significativa recirculación enterohepática. La semivida de eliminación plasmática de atorvastatina en el hombre es de aproximadamente 14 horas. La semivida de la actividad inhibitoria para la HMG-CoA reductasa es de aproximadamente 20 a 30 horas debido al efecto de los metabolitos activos.

D.2.MECANISMOS DE ACCIÓN ¹⁰³:

D.2.1. Mecanismo de acción y su importancia sobre el metabolismo lipídico.

La hidroximetilglutarilCoA reductasa (HMG-CoA reductasa) es la enzima que regula la velocidad de síntesis de colesterol en el hígado y en otros tejidos. Su estructura es un tetrámero; los cuatro monómeros que la componen son idénticos, y todos contribuyen al sitio activo de la enzima. El colesterol, y otros productos intermediarios, llamados isoprenoides, ejercen un control negativo sobre la expresión del gen encargado de codificar la enzima HMG-CoA reductasa.

Las estatinas se unen de manera covalente al sitio activo de la reductasa, con mayor afinidad que la HMG-CoA y, por lo tanto, funcionan como inhibidores competitivos, por lo cual disminuyen la síntesis y el contenido intracelular de colesterol.

Las estatinas no solo compiten con el sustrato natural por el sitio activo de la enzima sino que, además, alteran la conformación de esta última y limitan su actividad funcional, lo que aumenta su eficacia y su especificidad ¹⁰³.

A consecuencia de la disminución intracelular de colesterol, se activa una proteasa (SREBP) que libera proteínas reguladoras del retículo endoplásmico; a nivel nuclear, esas proteínas facilitan la expresión del gen que codifica al receptor B/E (receptor de reconocimiento de la apo B-100 y la apo E). La mayor disponibilidad de receptores B/E en la membrana celular provoca un aumento en la captura, mediante endocitosis, de LDL y otros tipos de lipoproteínas, principalmente en el hígado, la glándula suprarrenal y el tejido graso.

Como resultado final, se produce una disminución significativa del colesterol LDL (17 a 54%), aumento discreto del colesterol HDL (5 a 10%) y, en el caso de algunas estatinas, descenso de los triglicéridos. La magnitud de esos cambios en el perfil de lípidos dependerá del fármaco específico y de la dosis utilizada. El máximo efecto sobre los niveles sanguíneos de lipoproteínas se consigue después de 4 a 6 semanas de uso del medicamento, independientemente de las características cinéticas de cada droga.

D.2.2. Efectos pleiotrópicos.

Se han detectado y analizado experimentalmente muchas otras acciones de las estatinas; éstas propiedades no lipídicas pueden diferir entre las distintas drogas de la clase. La existencia de estos efectos llamados pleiotrópicos de las estatinas se debe a que el *mevalonato*, el producto de la reacción de la HMG-CoA reductasa, no solo es precursor del colesterol, sino de otros muchos compuestos isoprenoides no esteroideos¹⁰⁴. Los diferentes compuestos isoprenoides son vitales para diferentes funciones celulares, que van desde la síntesis del colesterol al control del crecimiento y diferenciación celular¹⁰⁴.

Todas esas otras propiedades de las estatinas combaten, directa o indirectamente, la disfunción endotelial, y modifican la estructura y la composición de las placas de ateroma, que se vuelven más estables a la erosión y a la ruptura¹⁰⁵. Algunos de esos cambios aparecen poco tiempo después del inicio de la administración de las drogas, y transforman las características protrombóticas y vasoespásticas que tiene el endotelio en los estados de hipercolesterolemia.

Se deben aclarar los otros mecanismos de acción propuestos, independientes de su acción sobre el metabolismo del colesterol, ya que podrían convertirse en nuevos sitios importantes para la manipulación

farmacológica, de manera que el proceso de aterosclerosis pueda atacarse a diferentes niveles.

Dentro de los efectos pleiotrópicos de las estatinas se han descrito los siguientes efectos beneficiosos ¹⁰⁶ :

D.2.2.1. Restauración de la función endotelial.

El endotelio vascular actúa como un importante órgano autocrino y paracrino regulando la contracción de la pared vascular y su composición celular. Las estatinas mejoran la disfunción endotelial mediante una disminución de los niveles sanguíneos de colesterol y mediante un aumento en la síntesis endotelial de NO, estimulando y regulando la acción de la NO sintasa endotelial (eNOS) ¹⁰⁷.

D.2.2.2. Disminución del estrés oxidativo.

Entre los efectos antioxidantes de las estatinas se encuentran la modulación del estrés oxidativo, además de reducir la generación de especies reactivas del oxígeno por NAD(P)H oxidasa vascular, antagonizar los efectos prooxidantes de angiotensina II y endotelina-1 y aumentar la síntesis vascular de óxido nítrico ¹⁰⁸.

D.2.2.3. Efectos sobre la inflamación.

Las estatinas disminuyen la expresión de moléculas sobre la superficie de los linfocitos, el número de macrófagos en el endotelio, además son capaces de inhibir la migración transendotelial y quimiotaxis de neutrófilos y la secreción de interleukina 6 ¹⁰⁹.

Existe evidencia que las estatinas disminuyen ciertos marcadores de inflamación dentro de los cuales se incluyen la proteína C reactiva (PCR) ¹¹⁰, la proteína de adhesión intracelular soluble y la interleucina 6 ¹¹¹.

D.2.2.4. Efectos sobre la proliferación, migración y apoptosis de células musculares lisas vasculares.

Algunas estatinas son capaces de inhibir la proliferación y migración de células musculares lisas vasculares que se produce durante el proceso inflamatorio de la aterosclerosis, y se ha demostrado que las estatinas promueven la apoptosis de células musculares lisas vasculares en cultivos celulares y estudios en modelos animales ^{112, 113}.

D.2.2.5. Estabilización de la placa de ateroma.

En un estudio realizado en conejos, se demostró que la Atorvastatina es capaz de estabilizar la placa carotídea regulando la vía de la 5-lipooxigenasa en animales ateroscleróticos ¹¹⁴.

D.2.2.6. Efectos antitrombóticos.

En algunos estudios en animales, las estatinas reducen marcadores indirectos de activación plaquetaria y de formación de trombos a dosis altas, lo que en parte podría estar mediado por los efectos de inhibición plaquetaria atribuidos al óxido nítrico (NO). Las estatinas regulan el balance fibrinolítico al aumentar el activador tisular de plasminógeno (tPA) e inhibir simultáneamente el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI) ¹¹⁵.

D.2.3. Efectos sobre la aposición de calcio.

Un reciente metaanálisis atribuye a las estatinas un modesto beneficio en la densidad de mineralización del hueso de la cadera estadísticamente significativo. Sin embargo, el papel de las estatinas sobre la calcificación vascular es motivo de controversia ⁷⁶. Existen estudios a favor y

en contra de su efecto beneficioso sobre la calcificación arterial ^{76, 110, 116-118}. Un reciente estudio publicado en *el Journal of Vascular Surgery* atribuye a una estatina, la pitavastatina, un efecto inductor de arteriogénesis, cuando se administra en forma de un preparado de nanopartículas para que ejerza su acción sobre las células endoteliales ¹⁰⁵. Así mismo, existen estudios clínicos que relacionan a las estatinas con un efecto beneficioso sobre la estabilidad de la placa monitorizado mediante marcadores serológicos y el GSM ecográfico ^{119, 120}.

E) EL CONEJO COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

El conejo utilizado en experimentación es un descendiente del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Esta especie procedente de Asia llegó a Europa a través de España y se empezó a utilizar para fines científicos en el siglo XVIII. Su manejo en el campo de la experimentación presenta algunos inconvenientes, como presentar un sistema nervioso autónomo inestable y una fragilidad vascular y ósea. Pero otras de sus características, como la sensibilidad a los anestésicos y la tendencia a la obesidad, así como el ser un animal manso y temeroso lo han convertido en protagonista de la investigación cardiovascular, siendo uno de los modelos más importantes para el estudio de la ateromatosis ¹²¹.

E.1 TAXONOMÍA.

El conejo Europeo, *Oryctolagus cuniculus*, junto con la liebre (genus *Lepus*) y el conejo Americano, se engloban en la familia *Leporidae* de la orden *Lagomorpha* ¹²².

La raza de conejo Nueva Zelanda es la más utilizada en la investigación ^{122, 123}. Los conejos fueron considerados roedores hasta 1912, pero la existencia de diferencias en su dentición dio lugar al establecimiento de un nuevo orden: *Lagomorpha*. Los miembros de este orden, poseen 6 incisivos, en contraste los roedores tienen solo 4 incisivos. La clasificación taxonómica del conejo es: Reino Animal, Phylum Chordata, Clase Mammalia, Orden *Lagomorpha*, Familia *Leporidae*, Género *Oryctolagus*, Especie *cuniculus*.

Existen más de 100 razas de conejos, siendo Nueva Zelanda y Dutch las más comúnmente usadas en laboratorio. Hay además variedades

empleadas en investigación, incluyendo el conejo Watanabe, que tiene una predisposición genética para elevados niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

E.2 MANEJO DEL CONEJO:

El consumo diario de alimento es aproximadamente el 5% del peso del animal, mientras el consumo diario de agua representa alrededor del 10% del peso. La dieta típica en el conejo de laboratorio contiene aproximadamente 15% de proteínas, 40-50% de carbohidratos, 2% de grasa vegetal y 15-25% de fibra ^{122, 124}. Una dieta apropiada tiene como objetivo el impedir el desarrollo de obesidad y alteraciones renales típicas en esta especie.

Para la correcta manipulación y manejo de los animales de laboratorio, y con el objetivo de evitar problemas de maltrato, los animales deben ser manejados por personal formado y que conozca las regulaciones existentes para este propósito.

E.3. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN CARDIOVASCULAR EN EL CONEJO.

El modelo animal ideal en la enfermedad cardiovascular deberá reproducir a sujetos humanos, metabólica y fisiopatológicamente, y conseguir desarrollar las etapas finales de la enfermedad de forma comparable a las presentadas en humanos. Dada la compleja naturaleza multifactorial de la enfermedad cardiovascular, ninguna especie animal resulta apropiada para todos los estudios ^{125, 126}.

La información obtenida a partir de los modelos animales requiere el análisis de su aplicabilidad a la patología humana, y por ello, la información procedente de ambos contextos debe ser complementaria. En la actualidad, la experimentación animal es un requisito legal encaminado a garantizar la seguridad antes de introducir fármacos y diversos procedimientos diagnósticos y terapéuticos en la clínica. Conejos alimentados con dietas altas en colesterol, se han empleado ampliamente para analizar la formación y evolución de las lesiones ateroscleróticas, así como su regresión al modificar la dieta o recibir tratamiento farmacológico ¹²².

El primero en usar el conejo como animal de experimentación para el estudio de la aterosclerosis fue Ignatowski en 1908 ¹²⁷, desde entonces se ha utilizado al conejo para la inducción de lesiones aterosclerosas mediante las más variadas dietas.

El modelo de conejo alimentado con colesterol es muy útil por el rápido desarrollo de lesiones y bajo costo para manutención, se suelen utilizar regímenes alimenticios de suplementación con 0,5% a 4% de colesterol por peso en aproximadamente 8 a 16 semanas. Conejos más viejos, con 3-4,5 años de edad, exhiben placas fibróticas, mientras que animales más jóvenes (4 meses de edad) no presentan lesiones avanzadas ¹²⁸. Parece que las hembras son menos propensas a la inducción de lesiones arterioscleróticas en comparación con los conejos machos. La protección de las hembras parece deberse a la presencia de altas concentraciones de estrógenos ¹²⁹.

Investigadores hindúes ¹³⁰, seleccionaron conejos Nueva Zelanda para inducirles experimentalmente aterosclerosis, resultando un apropiado costo-efectivo modelo animal. Por todas estas razones, el uso de conejo

blanco Nueva Zelanda como modelo de aterosclerosis está muy extendido actualmente.

Sin embargo, la exposición a altas dosis de colesterol en la dieta de estos animales ocasiona que las lesiones producidas son topográfica y morfológicamente diferentes a aquellas vistas en humanos. Esa diferencia es debida, en parte, al hecho de que humanos comúnmente no ingieren grandes cantidades de colesterol. Además, experimentos de larga duración en conejos con dietas conteniendo grandes cantidades de colesterol son desalentadores debido a la hepatotoxicidad y al alto riesgo de mortalidad del animal que esto produce ¹²⁸. Por esta razón, actualmente se tiende a realizar dietas ricas en colesterol de forma intermitente. Por otro lado, se ha demostrado que la asociación de dieta aterosclerosa y daño intimal produce lesiones aterosclerosas avanzadas en estos animales en espacios más cortos de tiempo ^{131, 132}.

El primer estudio prospectivo e intervencional llevado a cabo en conejos alimentados con colesterol que demostró una sustancial reducción de lesiones ateroscleróticas, fue publicado en 1957. Se sometió a los animales a tratamientos intravenosos con fosfatidilcolina, las placas que fueron aisladas presentaban un tamaño mucho menor que al inicio del estudio, y gran parte de las reservas de colesterol del animal se vieron disminuidas. La idea de revertir el ateroma, aunque deseable, se ha resistido durante décadas. Esto es debido al hecho de que el ateroma avanzado en humanos y modelos animales, tiene componentes que dan la impresión de permanencia, como necrosis, calcificación y fibrosis.

Desde este primer estudio, se han sucedido otros muchos que utilizan al conejo como base para desarrollar un modelo aterogénico y posteriormente someterle a diferentes dietas, manipulaciones genéticas, tratamientos farmacológicos, exposición a agentes ambientales o

infecciosos, con el objetivo de demostrar el efecto de dichos métodos sobre la evolución de la placa aterosclerótica. Algunos ejemplos se exponen en la Tabla IV.

Considerando que la prevalencia de aterosclerosis y enfermedad cardíaca isquémica está aumentando en el mundo, ocasionando serias consecuencias clínicas que exigen esfuerzos para mejorar el conocimiento de su patogénesis, se entiende que es necesario buscar mejoras en las técnicas experimentales y en los nuevos tratamientos, con avances en el uso de modelos experimentales.

En ese sentido, el conejo como modelo experimental supone una herramienta fundamental para el estudio de la aterosclerosis.

AUTOR	TIPO DE ESTUDIO	AÑO	RESULTADO
<i>SUPLEMENTACIÓN DIETA</i>			
Alfonzo y Ortiz	Dieta aceite crudo de palma (experimental)/ aceite de maíz (control)	2001	Aumento no significativo de los triglicéridos y del colesterol total en el grupo experimental
Aguilera y col.	Dieta rica colesterol/dieta rica grasas insaturadas	2003	Dieta grasas insaturadas, mejora el perfil sistema antioxidante hepático
De la Cruz y col., Tsantila y col.	Administración de aceite de oliva en conejos con alto colesterol	2000 2007	<trombogenicidad vascular >actividad antitrombótica y <porcentaje células espumosas
Alfonso y col.	suplementados 12 semanas con 0.5% / 1% colesterol	2001	Grupo 1% de colesterol presentó estrías adiposas en ambas carótidas
<i>FARMACOLÓGICO</i>			
Jeanpierre y col.	Tratamiento con FENOFIBRATO	2009	<Expresión de Factor Tisular <Contenido de colesterol > reendotelialización y estabilización placa
Vidal y col.	LICOFELONE	2007	< inflamación y la formación de neointima
Camera y col.	Fluvastatina en conejos hipercolesterolémicos	2002	< tendencia protrombótica mediada por la inhibición de la síntesis de TF
<i>AGENTES INFECCIOSOS</i>			
Lehr y col.	Endotoxinas de E. coli	2001	Significativa aceleración de la aterosclerosis
Fong y cols. Muhlestein	Chlamydia pneumoniae	1997 2000	Cambios aórticos consistentes con lesiones tempranas de aterosclerosis

Tabla IV: Estudios de enfermedad cardiovascular con el conejo como animal de experimentación.

*E.4. ANATOMÍA VASCULAR DEL CONEJO*¹³³.

En el conejo, habitualmente la arteria carótida común derecha nace de un tronco común a la arteria subclavia derecha, sin embargo la arteria carótida común izquierda emerge de forma independiente a la subclavia, directamente del arco aórtico, en una manera similar a la anatomía humana. Las carótidas comunes recorren la parte anterior del cuello, a ambos lados de la tráquea, dando pequeñas ramas. A nivel del borde anterior de la glándula tiroidea ambas carótidas dan una rama tiroidea superior para irrigar dicha glándula. Posteriormente, emiten ramas laríngeas, y una rama occipital dirigida a los músculos dorsales del cuello en ambos lados. En el nivel donde la carótida común pasa el borde dorsal del ligamento del músculo digástrico nace la carótida interna. Finalmente, la carótida interna se dirige dorsalmente hasta entrar en el cráneo. Este es el modelo anatómico más frecuente (93%), por supuesto existen variaciones en las cuales la carótida común derecha se origina directamente de la aorta, o donde la carótida común izquierda se origina en conjunto del tronco braquiocefálico¹³⁴.

E.5. HISTOPATOLOGÍA ARTERIAL EN EL CONEJO.

La histología arterial del conejo normal es similar a la del humano, presentando las capas íntima, media y adventicia claramente diferenciadas y limitadas por la lámina elástica interna y la lámina elástica externa.

El modelo de aterosclerosis en conejos hipercolesterolémicos, desarrolla lesiones arteriales ricas en lípidos y células inflamatorias con características histopatológicas de aterosclerosis temprana, ricas en células espumosas originadas a partir de macrófagos. Tienen un estrecho parecido con las estrías grasas desarrolladas en humanos. La morfología de las

lesiones en el conejo se modifica según el porcentaje de colesterol en la dieta y el tiempo de evolución ^{122, 135}. Dietas cortas y altas en porcentaje de colesterol (2%) ocasionan lesiones ricas en células espumosas y macrófagos, dietas más bajas en colesterol pero de mayor duración provocan lesiones más ricas en células musculares lisas y depósitos de colesterol. Lesiones más avanzadas precisan una mayor duración de la exposición a colesterol, para evitar la toxicidad que provoca se han probado dietas intermitentes aterogénicas ¹²². Algunos autores defienden que el desarrollo de lesiones avanzadas depende de la edad del animal ¹³⁶.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A) ANTECEDENTES.

Una de las hipótesis etiopatogénicas de la arteriosclerosis relaciona su origen con un proceso infeccioso, en el que diversos gérmenes patógenos han sido sugeridos como posibles agentes desencadenantes ⁶⁶. La calcificación arterial, cuando ocurre, es un factor agravante de la enfermedad y que empeora el pronóstico cardiovascular de los pacientes ⁶⁶.

Estudios recientes han demostrado la existencia de una nanopartícula, que podría tratarse de una bacteria gramnegativa atípica, capaz de causar calcinosis local sobre válvulas cardíacas a niveles fisiológicos de calcio y fosfato ^{73-75, 137, 138}. En este sentido, Miller et al. localizaron estructuras de tamaño nanométrico similares a las nanobacterias aisladas de especímenes geológicos y piedras renales humanas, en cultivos de tejidos humanos calcificados procedentes de paredes de aneurismas, placas carotídeas, placas ateroscleróticas femorales y válvulas cardíacas ⁶³. Por su parte Puskas. et al. detectaron estructuras “*nano-bacteria like*” en especímenes de placas carotídeas y aórticas obtenidos de autopsias ⁶⁶.

B) ELEMENTOS TEÓRICOS QUE FUNDAMENTEN LA INVESTIGACIÓN.

Existen estudios en la literatura que demuestran la posibilidad de aislar nanopartículas tanto a partir de válvulas cardíacas calcificadas, como de especímenes arteriales. Posteriormente, dichas estructuras se pueden detectar mediante microscopía óptica, microscopía electrónica e inmunoanálisis, y finalmente pueden ser cultivadas ^{63, 66, 73-75, 137-139}.

Shiekh et al lograron la transmisión de partículas nanobacteria-like cultivadas, mediante inyección intravenosa en ratas ⁷³.

En 2008 Schwartz et al. intentaron demostrar una relación causal entre las nanopartículas calcificantes y el desarrollo de calcificación arterial en un modelo desarrollado en conejo. El resultado fue positivo, aunque el estudio presentaba limitaciones, como el escaso tamaño muestral ^{121, 137}.

C) IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La arterioesclerosis es la causa principal de mortalidad entre los adultos de países industrializados. El tratamiento de las complicaciones relacionadas con su evolución en los diferentes órganos diana a los que afecta supone una parte importante del gasto sanitario ⁶⁶. La calcificación arterial se relaciona con un empeoramiento del pronóstico de los pacientes cardiovasculares y, por el momento, su origen permanece oscuro. La determinación del mecanismo que provoca la calcinosis de la pared arterial tiene, por tanto, gran relevancia clínica, ya que supondría mejorar el pronóstico de la enfermedad y la introducción de nuevas terapias frente a la arteriosclerosis que ayudarían a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A) HIPÓTESIS.

La aparición de focos de calcificación tanto en las placas de ateroma como en la pared arterial ha sido observada en la enfermedad cardiovascular. El origen de esta calcinosis se ha relacionado con el proceso inflamatorio, la apoptosis celular o el estrés oxidativo. Sin embargo, el factor inicial causante de que unas arterias desarrollen calcificación y otras no se desconoce.

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico en la pared de las arterias que aparece en respuesta a una disfunción endotelial. Entre los múltiples factores que pueden ocasionarla se ha señalado la implicación de ciertas infecciones subclínicas que podrían precipitar el depósito de inmunocomplejos. Recientemente, nanopartículas con un rango de 0.08-0.5 μm han sido aisladas de tejidos humanos calcificados. A nivel vascular, estas asociaciones han sido observadas con microscopio electrónico en carótidas, aneurismas, válvulas cardíacas y placas de ateroma. La capacidad de estas nanopartículas de precipitar calcio en forma de cristales de hidroxapatita en condiciones fisiológicas de pH y a las concentraciones de fósforo y calcio presentes en la sangre, sugiere a estos agentes, auto-replicantes y referidos como nanopartículas, como posibles candidatos involucrados en la génesis de estas calcificaciones patológicas vasculares. No obstante, una relación causa-efecto permanece incierta dada la escasez de estudios clínicos y experimentales.

Por lo tanto, este estudio fue diseñado para comprobar la hipótesis de que la inoculación en animales sanos de preparados de nanopartículas contribuiría a desencadenar la presencia de calcificaciones y agravar el pronóstico de las lesiones inducidas experimentalmente.

B) OBJETIVOS.

Los postulados de Koch, en relación con los microorganismos, dictan que las partículas o agentes implicados en una enfermedad deberían ser identificados en los tejidos enfermos, que pudieran ser aislados y cultivados, y que inoculados en un animal sano deberían reproducir la enfermedad.

Por este motivo, el **OBJETIVO PRINCIPAL** de este estudio ha sido:

1. Analizar el efecto de la administración parenteral de una solución de nanopartículas calcificantes procedentes de muestras de válvulas aórticas calcificadas humanas en un modelo experimental de daño intimal en el conejo, con la finalidad de ver si estos agentes contribuyen a estimular el daño parietal.

Para lograr este fin, secundariamente, se consideraron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. Valorar morfométricamente las lesiones histopatológicas inducidas en el endotelio arterial de la carótida del conejo sometidos a daño intimal.
2. Determinar la presencia o no de focos de microcalcificación en las arterias lesionadas.
3. Evaluar el efecto terapéutico de la administración de estatinas (Atorvastatina) en cuanto a la evolución de las lesiones arteriales inducidas experimentalmente.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

A) PRINCIPIOS Y NORMAS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las Normas de Legislación vigente sobre Experimentación Animal, como son:

- Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

B) DISEÑO DEL ESTUDIO.

El protocolo experimental constó de tres fases:

1. **FASE 1:** A partir de válvulas aórticas calcificadas procedentes de pacientes operados con indicación de recambio valvular se aislaron y cultivaron las nanopartículas calcificantes.
2. **FASE 2:** Se desarrolló un modelo experimental de daño intimal en el conejo, mediante angioplastia controlada de la carótida primitiva derecha, en el que se inocularon por vía sistémica las nanopartículas calcificantes que resultaron de la fase anterior.

3. **FASE 3:** Tras 30 días de seguimiento, los animales fueron sacrificados y ambas carótidas resecadas para análisis histopatológico y estudio morfométrico de las lesiones.

C) PRIMERA FASE: AISLAMIENTO Y CULTIVO DE NANOPARTÍCULAS CALCIFICANTES.

C.1. MUESTRAS CLÍNICAS.

Previo consentimiento quirúrgico, válvulas aórticas severamente calcificadas fueron obtenidas asépticamente de pacientes sometidos a recambio valvular en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, dichos pacientes eran operados porque presentaban criterios de intervención siguiendo las guías de actuación clínica del propio hospital. Todos los pacientes fueron intervenidos siguiendo la misma sistemática quirúrgica, que incluyó la profilaxis antibiótica preoperatoria con cefazolina 2 gr/ iv al inicio de la cirugía.

Para su procesamiento, las válvulas fueron trasladadas al laboratorio en un frasco estéril sin ningún tipo de solución conservante.

C.2. CULTIVO DE LAS NANOPARTÍCULAS.

En el laboratorio la válvula se dividió a la mitad con bisturí estéril, una parte se congeló a -80° C para posibles análisis futuros y la otra mitad se destinó al cultivo. Para realizar el cultivo, la muestra se trituró manualmente en un mortero de cristal estéril. Posteriormente, se procedió a su desmineralización añadiendo 1 M de HCl, que subsecuentemente fue

neutralizada con 1M de NaOH. La solución resultante se filtró utilizando un filtro de poros de $0.22\mu\text{m}$ (Millex-GS, Millipore) y este filtrado se cultivó en Medio Dubecco Eagle Modificado (DMEM), suplementado al 10% con suero fetal bovino (FBS) gamma-irradiado (GIBCO). El cultivo se incubó a 37°C en atmósfera con 5-10% de CO_2 durante al menos 2 meses. Al cabo de este tiempo el cultivo presentaba un granulado blanquecino adherido a las paredes del tubo apreciable a simple vista (Figura 2). Cada 3 meses de incubación se hicieron pases de los cultivos, para ello se resuspendió la película adherida a la pared con perlas de vidrio estériles y una fracción se volvió a inocular en un frasco de Roux con DMEM sin suero incubándolo a 37°C en atmósfera aeróbica.

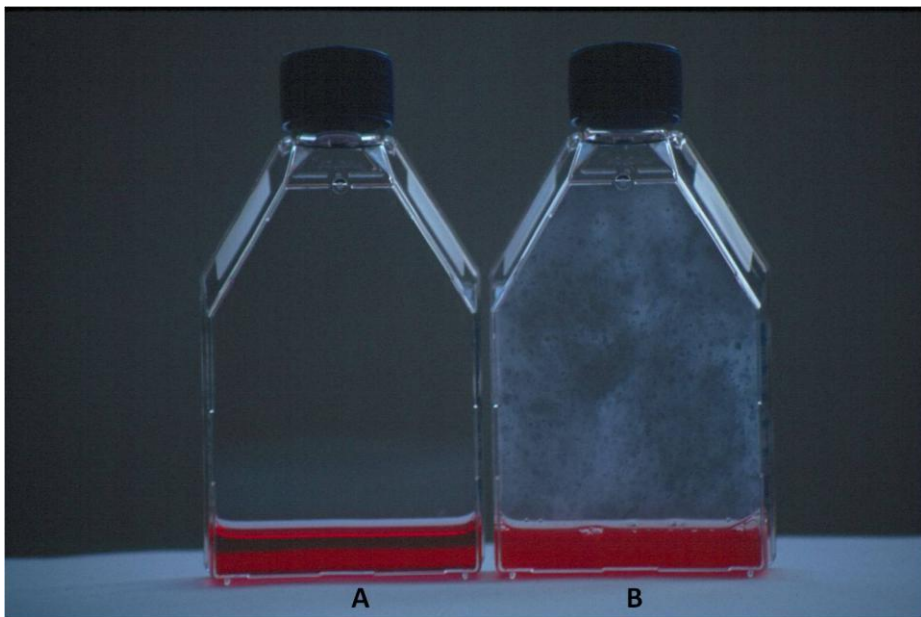


FIGURA 2: El cultivo A fue negativo, el cultivo B presentaba un granulado blanquecino adherido a las paredes del tubo apreciable a simple vista (cultivo positivo).

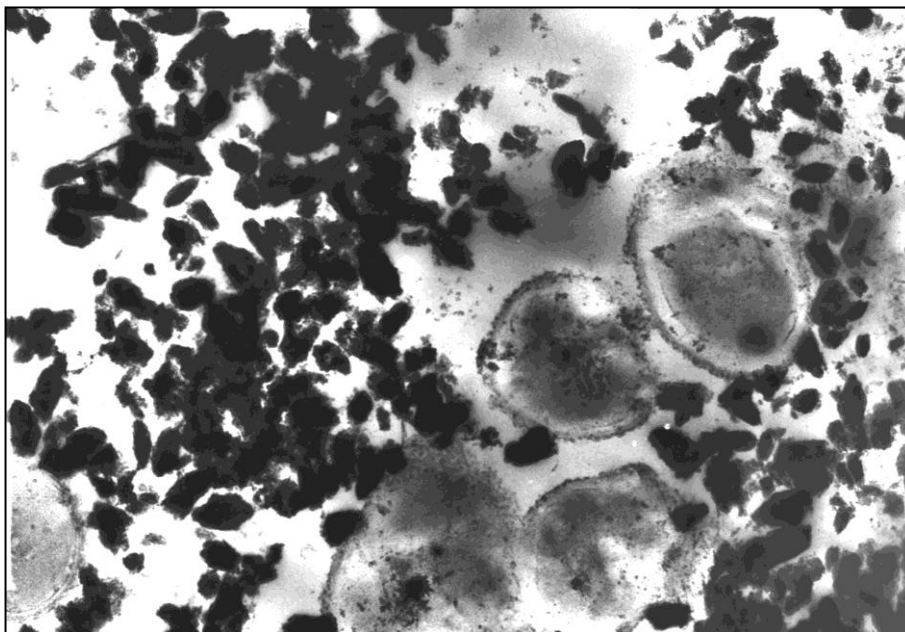


FIGURA 3: Imagen de microscopio de transmisión electrónica (TEM) que muestra la imagen típica de las nanopartículas calcificantes, pleomórficas, 0.2-0.5 μm de tamaño, forma celular con pared de grosor variable.

En estos subcultivos, los depósitos se incrementaron, comprobándose la presencia de nanopartículas calcificantes mediante la observación tanto al microscopio óptico como electrónico. Para ello se realizaron raspados de cultivos de cada frasco que posteriormente eran centrifugados, combinando los diferentes sedimentos, y finalmente lavados con agua destilada.

El sedimento se observó al microscopio de contraste de fase, aplicando las tinciones Gram, Ziehl-Neelsen, Naranja de Acridina y Hoechst 33258. Para la observación en el microscopio de transmisión electrónica (TEM) (Figura 3), el sedimento fue fijado con glutaraldehído y sometido a osmio, deshidratación con acetona e inclusión en resina. Los bloques fueron

posteriormente tallados y cortados con un grosor de 300 Å (amstrongs) y montados en una rejilla de cobre. Las muestras se visualizaron en el microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM-1200 EXII. Para su observación en el microscopio electrónico de barrido (SEM), las nanopartículas fueron previamente cultivadas sobre un portaobjetos durante 8 semanas, siguiendo el método descrito anteriormente (Figura 4). Más tarde, el portaobjetos fue sometido a un lavado con agua destilada, y fijado con glutaraldehido al 2.5% y posteriormente deshidratado en acetona y contrastado con oro. La visualización se realizó con un microscopio JEOL JSM-820.

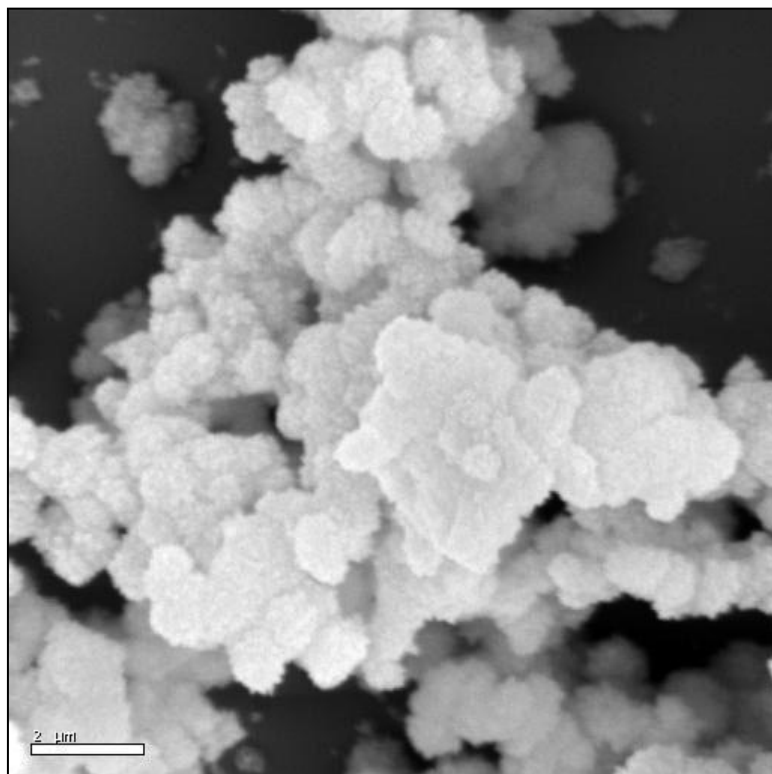


FIGURA 4: Observación al microscopio electrónico de barrido (SEM). Típica imagen en la que las nanopartículas se asocian formando conglomerados.

C.3. PREPARADO PARA LA INOCULACIÓN ANIMAL.

Para la obtención de la solución de nanopartículas calcificantes, se hicieron pases según la técnica anterior en frascos de Roux y se resuspendió la película adherida a los frascos mediante perlas de vidrio estériles. Posteriormente, se centrifugó el medio, obteniéndose el sedimento de nanopartículas que se lavaron dos veces con agua destilada. Las nanopartículas así obtenidas se resuspendieron en 2 ml de NaCl al 0,9%. Esta suspensión fue la que se utilizó en la inoculación a los conejos.

D) SEGUNDA FASE: MODELO EXPERIMENTAL.

D.1. ANIMALES.

Veinticuatro conejos tipo Neo-Zelandés albino y aproximadamente 3 kilogramos de peso, fueron utilizados para el estudio. Todos los animales fueron mantenidos en jaulas individuales con ciclos de 12h de luz y alimentados mediante dieta de laboratorio enriquecida con 0.25% de colesterol y agua *ad-libitum*.

Los animales sometidos a daño intimal mediante angioplastia de la carótida se dividieron en 3 grupos (Figura 5):

- un **grupo control (A)** a los que se perfundi6 100mL de soluci6n salina por v6a endovenosa durante la intervenci6n;
- un **grupo tratado (B)** a los que se administr6 durante la intervenci6n 100mL de soluci6n salina por v6a endovenosa en la

que se diluyó el preparado con 2ml de NaCl al 0.9% que contenía las nanopartículas cultivadas;

- y un **grupo tratado terapéutico (C)** al que después de la intervención quirúrgica y la perfusión de nanopartículas, similar al grupo B, se le administró **Atorvastatina** (2.5mg/kg/24h) durante su seguimiento.

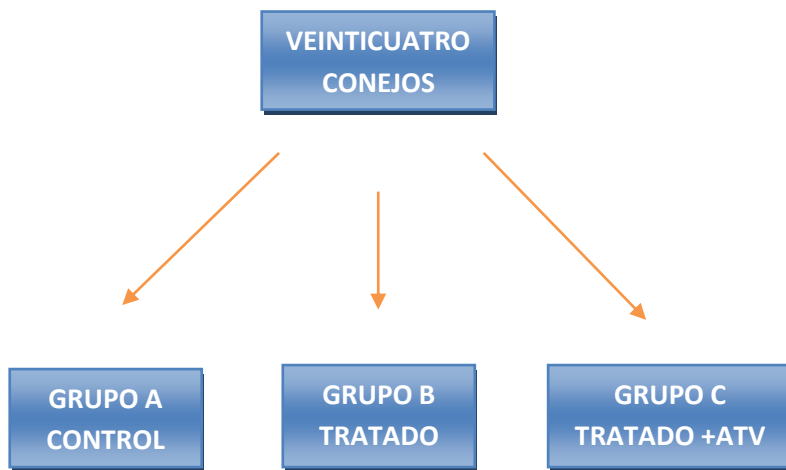


Figura 5: Distribución de los grupos de estudio.

D.2. PROTOCOLO QUIRÚRGICO.

D.2.1. Técnica anestésica:

Los animales fueron sedados con una solución intramuscular de Ketamina (35 mg/kg), Xilacina (5 mg/kg) y Acepromacina (1 mg/kg) y mantenidos con administraciones periódicas intramusculares de Ketamina (Figura 6). Ninguno precisó de intubación endotraqueal o ventilación

mecánica. No se realizó profilaxis antibiótica para evitar posibles interferencias medicamentosas con el experimento.



Figura 6: Anestesia del animal mediante inyecciones periódicas intramusculares.

D.2.2. Técnica quirúrgica:

Los animales fueron inmovilizados en decúbito supino mediante la sujeción de las cuatro extremidades. De forma previa al abordaje quirúrgico, se rasuró la zona del cuello y se preparó con una solución iodada. Como complemento a la sedación intramuscular, se realizó una infiltración local de Clorhidrato de Mepivacaína (Mepivacaína Braun, 1%) a dosis de 10mg/kg a nivel del cuello.

Mediante técnica aséptica, se realizó una incisión latero-cervical derecha en el cuello hiperextendido de los animales y se identificaron los

vasos cervicales. La vena yugular derecha se controló proximal y distalmente mediante ligaduras de seda de 3/0 (Silkam, Braun), posteriormente se canuló mediante un Abocath de 20 GA (BD Insyte, BD Vialon Material) conectado a una llave de 3 vías (Viasend, Sendal), que se comunicó con un sistema de infusión a un suero salino. Una muestra de sangre de 2 mL se extrajo entonces para estudio bioquímico y análisis de las condiciones basales de los animales (BD Vacutainer) (Figura 7). Esta vía venosa se utilizó durante el experimento para la perfusión de una solución salina isotónica (0.9% NaCl) de 100 mL a un ritmo de 2 mL/min, con el objeto de reponer la pérdidas hídricas (Figura 8). Asimismo, se empleó para la administración de heparina sódica durante el periodo de clampaje arterial y en su caso la inoculación del preparado de nanopartículas calcificantes.



Figura 7: Extracción de 2 ml de sangre del animal que se conservaba en un recipiente (BD Vacutainer).

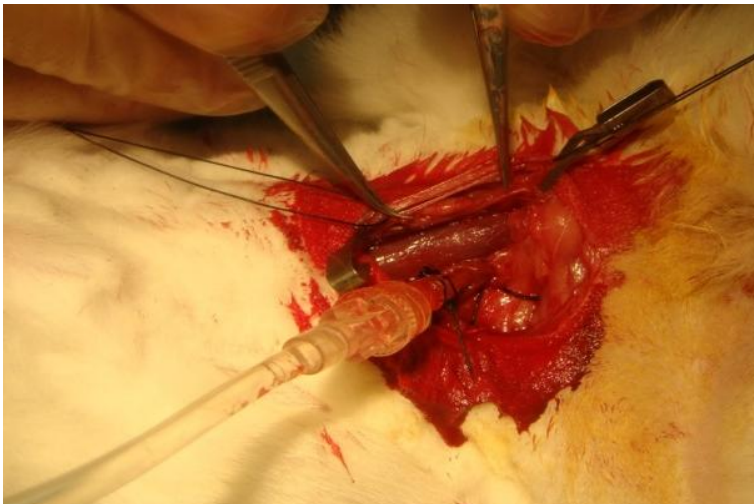


Figura 8: Dilución del preparado de nanopartículas en Suero Fisiológico e infusión mediante colocación de catéter introducido en la vena yugular del conejo.

En todos los animales se expuso la arteria carótida común derecha como vaso tratado. Mediante técnica cuidadosa y el uso auxiliar de lentes de aumento (x 2.5), se disecó y controló la arteria carótida con el empleo de *vessel-loops* (Figura 9). Previa a la oclusión temporal de un segmento de arteria con *micro-clamps*, se anticoaguló el animal con un bolo de heparina sódica intravenosa (800 U/kg). Posteriormente, se realizó una pequeña arteriotomía transversa sobre la pared anterior de la arteria carótida común con la finalidad de introducir un balón de angioplastica coronario de 3.5 mm de diámetro máximo (NC Stormer OTW 3.5 x 14 mm; Medtronic, Minneapolis, USA). Para lograr la lesión intimal, el balón se dilató de manera controlada con una jeringa de presión hasta su presión nominal durante 30 segundos, retirándose y volviendo a repetir el inflado del balón hasta 3 veces con objeto de conseguir el daño endotelial en la arteria tratada (Figura 10). El segmento dañado era marcado con una pequeña sutura que indicaba la porción distal de arteria expandida con el balón de angioplastia. Posteriormente, el cierre arterial se realizó con una sutura discontinua de monofilamento 8-0 (Ethilon), controlándose el posible sangrado con el uso temporal de una sustancia hemostática (Surgicel). Una vez garantizada la hemostasia y la permeabilidad del vaso, se retiraron los *micro-clamps*. Finalmente, se retiró la vía venosa yugular y se procedió al cierre de la herida quirúrgica en dos planos con sutura reabsorbible (Vicryl rapid 3/0, Ethicon).

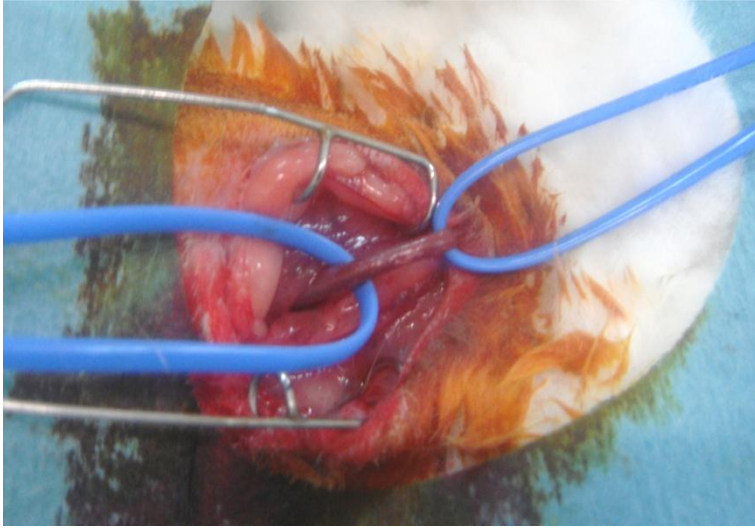


Figura 9: Carótida del conejo controlada mediante *vessel- loops*.

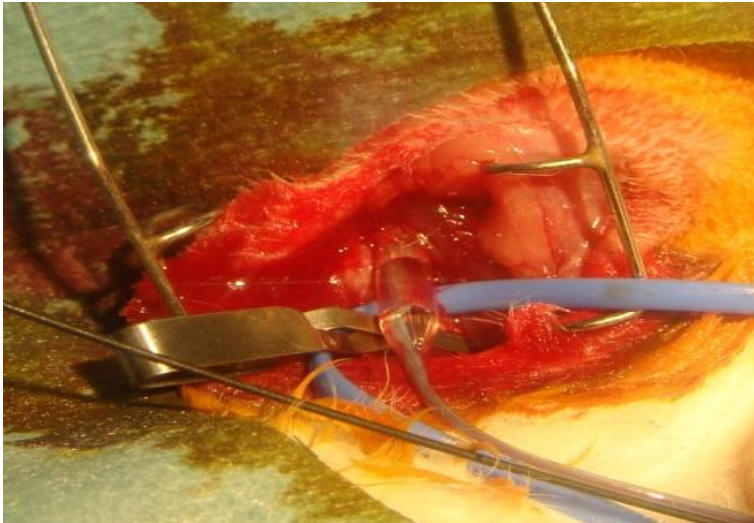


Figura 10: Lesión intimal mediante balón de angioplastia.

D.3. POSTOPERATORIO.

Los conejos fueron aislados en jaulas individuales con un ciclo de 12 horas de día/ 12 horas de noche. Se mantuvieron en un rango de temperatura entre 8º- 18º C y un promedio de humedad del 80%. Todos los animales fueron alimentados con una dieta enriquecida con 0.25% de colesterol y agua *ad-libitum*.

Los animales del grupo-C fueron tratados durante el postoperatorio inmediato y los días sucesivos hasta su sacrificio (30 días) con Atorvastatina a dosis de 2.5 mg/ kg/24 h. Para ello, los comprimidos orales de Atorvastatina (Atorvastatina-Ratiopharm 20mg) fueron triturados con mortero hasta obtener una textura de polvo seco. Dicho polvo se diluyó en un frasco con suero fisiológico, administrándose la dosis calculada mediante gotas de la disolución vertidas sobre la comida diaria (pienso seco) de cada animal.

E) TERCERA FASE: EXTRACCIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS.

E.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.

A los 30 días del postoperatorio, los animales fueron sacrificados. Para ello, se procedió a la sedación anestésica con Ketamina, Xilacina y Acepromacina intramuscular en las mismas dosis terapéuticas que al inicio del experimento. En esta ocasión, se preparó el área cervical bilateral mediante el rasurado completo del cuello, la aplicación de solución yodada y el infiltrado de anestesia local con Mepivacaína. A través de una incisión transversa, se controlaron mediante ligadura de seda ambas carótidas primitivas, procediendo posteriormente a su resección: la operada (derecha), desde la

sutura proximal de la arteriotomía a la marca distal de la lesión endotelial; y la contralateral (izquierda), como control. Las muestras arteriales extraídas se colocaron en frascos estériles en formol para su conservación (Figura 11). Finalmente, se procedió a la extracción de una muestra de sangre (2 ml) de la vena yugular izquierda y a la eutanasia del animal con la administración intravenosa de Pentobarbital sódico a dosis de 40-60 mg/kg.

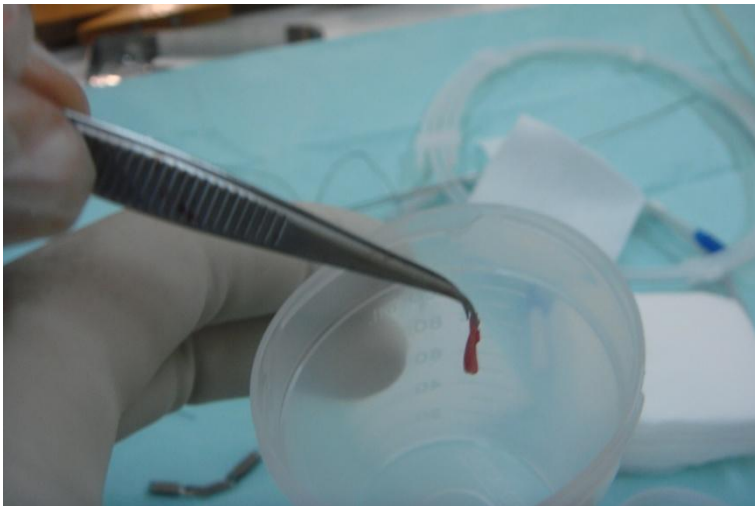
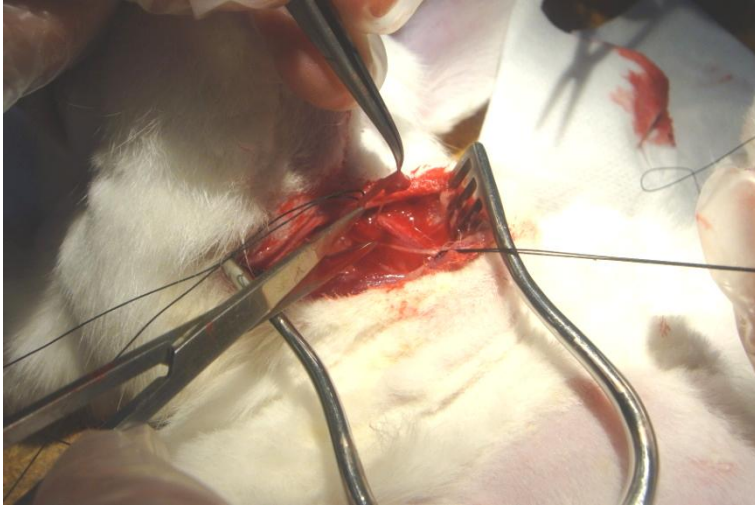


Figura 11: Extracción de las dos arterias carótidas del animal.

E.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Las muestras arteriales recolectadas fueron procesadas para su estudio histopatológico y morfométrico, de acuerdo con el siguiente protocolo técnico:

E.2.1. Fijación.

Se procedió a la inmersión inmediata en una solución fijadora de formol al 10%, sobre un recipiente de cristal oscuro. La relación de volumen entre el líquido fijador y la pieza fue de 20: 1 (relación mínima para combatir la pérdida de solución fijadora).

E.2.2. Lavado.

Transcurrido el tiempo de fijación de las piezas (24 horas), se lavó con agua destilada durante dos horas para eliminar el exceso de fijador.

E.2.3. Deshidratación.

Se sumergieron las piezas en alcohol etílico a concentraciones crecientes, sustituyendo toda el agua del tejido por alcohol.

El procedimiento ha sido el siguiente:

- Alcohol al 70% I.....2 horas.
- Alcohol al 70% II.....2 horas.
- Alcohol al 96% I.....1 hora.

- Alcohol al 96% II.....1 hora.
- Alcohol al 100% I.....1 hora.
- Alcohol al 100% II.....1 hora.
- Benzoato de metilo I.....2 horas.
- Benzoato de metilo II.....2 horas.
- Benzoato de metilo III.....3 horas.
- Benzol I.....15 minutos.
- Benzol II.....15 minutos.

E.2.4. Inclusión en Parafina.

Extraídas las piezas del benzol, se sumergieron durante 30 minutos en una mezcla a partes iguales de benzol y parafina blanda.

Posteriormente, se pasaron por diferentes tipos de parafinas blandas y duras, hasta que el benzol fue totalmente sustituido y la parafina penetró en los tejidos, impregnando todas las estructuras.

Los pasos por los diferentes tipos de parafina se realizaron en una estufa de temperaturas, siendo ésta diferente para la parafina blanda (51-53°C) que para la parafina dura (57º-60°C). El proceso duró aproximadamente 24 horas.

E.2.5. Formación de Bloques y montaje en Portaobjetos.

Para obtener una parafina adecuada para ser seccionada fue preciso efectuar el quemado de la misma hasta que adquiriera un color pardo-amarillento, con lo cual ésta quedó dispuesta para ser utilizada en la formación de bloques.

La parafina se depositó en unos moldes metálicos especiales donde posteriormente fueron depositados los fragmentos arteriales objeto del estudio.

Una vez que se enfrió la parafina, los bloques quedaron preparados para el corte al microtomo. De cada arteria se realizaron secciones adyacentes de 5 μm , que posteriormente se colocaron en el portaobjetos, adecuadamente preparado con albúmina, con el fin de facilitar la adherencia a las muestras. Los portaobjetos fueron desengrasados mediante inmersión alcohol-éter. Por último, se introdujeron en una estufa a 37°C durante 24 horas con el objeto de que la albúmina coagulase y se produjera una buena adherencia de los cortes al portaobjetos.

E.2.6. Desparafinación de los cortes.

Los portaobjetos fueron sometidos a inmersión en xilol y luego en alcoholes de concentración creciente. La secuencia que se empleó fue la siguiente:

- Xilol I.....10 minutos.
- Xilol II.....10 minutos.
- Alcohol de 100° I.....2 minutos.
- Alcohol de 100° II.....2 minutos.
- Alcohol de 96°.....2 minutos.
- Alcohol de 80°.....2 minutos.

E.2.7. Tintiones utilizadas.**✓ Tinción con Hematoxilina-Eosina.**

Los colorantes utilizados fueron la hematoxilina de Harris y la eosina amarillenta. La pauta empleada fue la siguiente:

- Se sumergieron las preparaciones, previamente desparafinadas, en hematoxilina durante 7 minutos.
- A continuación se lavaron los cortes en agua destilada (pH neutro).
- Al objeto de eliminar el exceso de colorante se pusieron en alcohol clorhídrico durante 10 segundos.
- Se sumergieron los portaobjetos en agua corriente (pH alcalino) durante 24 horas.
- Se depositaron durante 10 minutos en agua oxigenada para eliminar el agua corriente.
- Se sumergieron en eosina durante 1 minuto.
- Por último, se depositaron los portaobjetos en agua destilada durante 10 minutos.

El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma.

Como resultado las estructuras histológicas se tiñeron de la siguiente manera:

- Núcleo celular: Azul
- Citoplasma celular: Rosa
- Musculatura: Rojo , rosa o fucsia
- Glóbulos rojos: Rojo, anaranjado
- Fibrina: Rosa

✓ **Tinción de Van Gieson.**

Los colorantes utilizados son el ácido pícrico-fucsina ácida y la hematoxilina férrica de Weigert. Se trata un método de tinción simple para diferenciar el colágeno de otros tejidos conectivos.

La pauta utilizada fue la siguiente:

- Los preparados histológicos fueron sumergidos en agua por unos 5 minutos.
- Se sumergieron 5 minutos en hematoxilina férrica de Weigert.
- Se lavaron en agua corriente (hasta que no eliminaron más colorante).
- Se lavaron en agua destilada.
- Se sumergieron en ácido pícrico-fucsina ácida por 5 minutos.
- Se sumergieron en alcohol al 95° por 10 minutos.
- Se sumergieron en alcohol al 100° por 5 minutos.
- Se sumergieron dos veces diferentes frascos de xilol 5 minutos en cada ocasión.

Como resultado las estructuras se tiñeron de la siguiente manera:

- Núcleos celulares: Color marrón a negro.
- Colágeno (tejido conectivo fibroso): Color rosa o rojo.
- Músculo y Citoplasma: Color amarillo.

✓ **Tinción de Von Kossa.**

Se trata de una tinción especial para teñir sales de calcio, que utiliza como reactivo el Nitrato de Plata al 5%.

El procedimiento consistió en:

- Después de desparafinar e hidratar la preparación, ésta se sumergió en una solución de Nitrato de Plata al 5% durante 30-60 minutos.
- Se lavó con agua.
- Se lavó en solución de Tiosulfato durante 5 minutos.
- Se realizó un nuevo lavado con agua.
- Se sumergió en rojo neutro durante 2-3 minutos.
- Se realizó un último lavado con agua.
- Finalmente, se deshidrató, aclaró y montó.

Como resultado se tiñeron:

- Núcleos celulares: en rojo.
- Calcio: en negro.

E.2.8. Aclaramiento y montaje.

Terminado el proceso de coloración, los cortes pasaron por baños sucesivos de alcohol de concentraciones crecientes, terminando en alcohol absoluto.

A continuación, los portaobjetos se pasaron por baños de xilol para eliminar el alcohol y lograr la máxima transparencia de los cortes. La pauta que se siguió fue la siguiente:

- Alcohol de 80º.....5 minutos.
- Alcohol de 96º.....5 minutos.
- Alcohol de 100º I.....5 minutos.
- Alcohol de 100º II.....5 minutos.
- Xilol I.....5 minutos.
- Xilol II.....5 minutos.

Una vez aclaradas las preparaciones se depositó sobre los cortes pegamento Eukitt® colocando encima el cubreobjetos.

La valoración histológica se realizó en un microscopio óptico (Nikon Labophot) usando un poder de resolución de 4x, 10x y 40x aumentos.

E.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

Las muestras histológicas con tinción de Hematoxilina-Eosina fueron analizadas de manera ciega (sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las muestras), y clasificadas según su grado de hiperplasia. Los grados de hiperplasia que se definieron fueron los siguientes:

- *Cambios mínimos intimaes*: mínima desestructuración del endotelio.
- *Hiperplasia parcheada*: hiperplasia que no comprende la circunferencia total del vaso.
- *Hiperplasia concéntrica*: hiperplasia que implica la circunferencia total del vaso.
- *Trombosis*: oclusión total del vaso.

Posteriormente, se analizó la presencia o no de focos de calcificación en las muestras, de acuerdo con la tinción de Von Kossa.

E. 4. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

E.4.1. Morfometría.

Las preparaciones histológicas fueron analizadas también de manera ciega (sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las muestras) mediante un sistema informático morfométrico (Nikon DS Camera Contol Unit DS-L2), que consta de un microscopio óptico convencional al que va acoplado un sistema óptico e informático que permite la proyección de la imagen del

microscopio (Nikon Alphaphot-2 YS2) sobre una pantalla de ordenador de alta resolución. Asimismo, tiene un lápiz óptico que permite la medición de los distintos parámetros de la imagen de la pantalla. Una de las opciones, la medición de áreas, fue la utilizada en nuestro trabajo.

Las preparaciones fueron examinadas a 4 aumentos (4x), para poder encuadrar la sección arterial completa en la pantalla. De cada una de ellas, se eligió el corte que estuviese más libre de posibles de artefactos, realizándose todas las mediciones sobre el campo elegido. Todas las mediciones se realizaron utilizando la tinción de Van Gieson, que nos permite distinguir con mayor nitidez las láminas elásticas de la pared arterial dada la tinción de sus fibras de colágeno.

Las áreas que se midieron fueron los siguientes (Figura 12):

- Área de luz (AL)
- Área englobada por la lámina elástica interna (IEL)
- Área englobada por la lámina elástica externa (EEL)

E.4.2. Cálculo de parámetros.

A partir de las áreas medidas mediante el análisis morfométrico, se calcularon una serie de parámetros con el objetivo de valorar el grado de hiperplasia desarrollado en cada una de las arterias de los tres grupos, y así compararlo posteriormente.

Los parámetros calculados fueron los siguientes:

- Área de neointima (NI): es el resultado de la sustracción: IEL - AL.
- Área de la capa media (MA): es el resultado de la sustracción: EEL - IEL.
- Ratio Íntima/Media (IMR): es el resultado del cociente: NI / MA.
- Ratio de estrechamiento de la luz (ELR): es el resultado del cociente: NI / IEL.

Todos estos cálculos se realizaron mediante el programa Excel 2007.



Figura 12: Medición de Área de Luz (rojo), Área de lámina elástica interna (azul) y Área de lámina elástica externa (amarillo) con el morfómetro (en μm^2).

F) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos cuantitativos se expresaron como media +/- desviación estándar. Una probabilidad menor de 5% ($p < 0.05$) fue considerada estadísticamente significativa. Para el estudio estadístico se empleó el paquete estadístico SPSS 17.0 (SPSS, Chicago. IL, USA).

F.1. MEDIDAS DE LOCALIZACIÓN Y DISPERSIÓN.

Para cada uno de los parámetros se calculó la media muestral, y la desviación estándar. Asimismo, se calculó el intervalo de confianza para la media poblacional con un nivel del 95%.

F.2. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS.

F.2.1. Variables cuantitativas.

Se analizaron, por separado, cada uno de los datos analíticos (pre y postoperatorio) referidos a glucemia, cifra de triglicéridos, colesterol plasmático total e IL-6, así como los parámetros morfométricos estudiados: Área de Neoíntima (NI), Área de Capa Media (MA), Ratio de Área Íntima/Media (IMR) y Ratio de Estrechamiento de la Luz (ELR).

Como paso previo, se comprobó el cumplimiento de los criterios de *normalidad* y *homocedasticidad* en la muestra. La normalidad significa que la

variable dependiente se distribuye normalmente en las poblaciones estudiadas (tantas como grupos definidos por la variable independiente o factor). En nuestro caso se realizaron los test de normalidad de Shapiro-Wilk, dado el tamaño muestral restringido. Para contrastar la homocedasticidad se utilizó la prueba de Levene que estudia la igualdad de la varianza. De este modo, se utilizaron test paramétricos en aquellas comparaciones donde las poblaciones estudiadas cumplieran los dos criterios, en el caso contrario se utilizaron test no paramétricos.

La comparación de cifras de los parámetros analíticos en el momento basal y final del experimento se realizó aplicando una Prueba T-Student para variables dependientes.

Las diferencias entre las medias de las carótidas tratadas y las carótidas control no operadas se contrastaron mediante Prueba T-Student para variables independientes, cuando se cumplían los criterios para usar test paramétricos.

Las diferencias entre las medias de los distintos grupos (A, B y C) se estudiaron mediante un test ANOVA de un factor en el caso en que la muestra tuviera distribución normal y existiera homogeneidad de la varianza, y las diferencias específicas entre grupos mediante una prueba *post-hoc* de Tukey (B Vs C) o un test de Dunnett (B ó C Vs A). En el caso en que la distribución no fuera normal y/o la varianza no fuera homogénea, los estudios estadísticos realizados fueron una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y un test de U de Mann-Whitney, respectivamente.

F.2.2. Variables cualitativas.

Se construyeron tablas de contingencia para estudiar la asociación entre dos variables cualitativas (pertenencia a un grupo y presencia de calcificación) y se calculó el estadístico Chi-cuadrado χ^2 , para determinar si existía asociación entre ambas variables. Para ello, en primer lugar, se enfrentaron las variables cualitativas “pertenencia a un grupo” (con tres categorías: A, B y C) y “presencia de calcificación” (con dos categorías: Si o No) mediante el estadístico *Razón de verosimilitud* (Likelihood Ratio), y posteriormente se agruparon todos los casos en un solo grupo de casos (fundiendo los grupos B y C en uno solo), comparando las variables cualitativas “pertenencia a un grupo” (con dos categorías: Caso/control) y “presencia de calcificación” (con dos categorías: Si/No) mediante el *Test exacto de Fisher*. Para comparar los grupos B y C, y buscar diferencias significativas entre ellos, se utilizó de igual modo el Test exacto de Fisher.

V. RESULTADOS

A) TAMAÑO MUESTRAL.

Veinticuatro conejos Neo-Zelandeses albinos fueron inicialmente incluidos en este estudio experimental de daño intímil carotídeo y perfusión intravenosa de nanopartículas calcificantes. Durante el seguimiento, sin embargo, 3 animales fallecieron (uno del grupo control A, otro del grupo tratado B, y otro del grupo C tratado con Atorvastatina), lo que hizo una muestra final total de 21 animales, que se distribuyeron en 3 grupos de 7 animales cada uno (Figura 13).

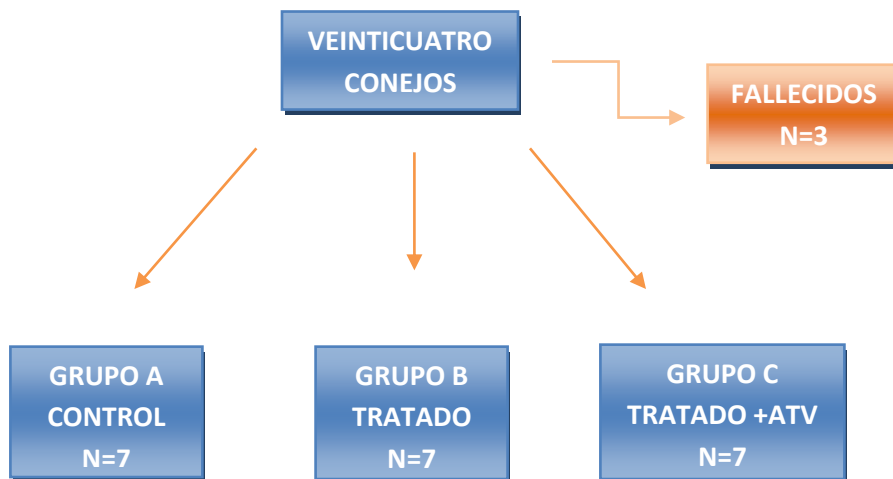


Figura 13: Distribución final de los grupos de estudio.

B) RESULTADOS ANALÍTICOS.

El análisis bioquímico de los animales intervenidos puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas entre los datos basales y postoperatorios finales previos a su sacrificio, lo que subraya la homogeneidad de la muestra. Se destaca en particular que los niveles de colesterol en sangre se mantuvieron estables, por estar este parámetro íntimamente ligado a la dieta administrada, y por su posible influencia en la respuesta histopatológica de la pared arterial. El único parámetro analítico que presentó diferencias significativas entre las medias de cifras basales y finales fue la interleucina-6 (IL-6), como marcador sérico de la inflamación.

B.1. GLUCOSA.

La cifra de glucemia basal y final de cada uno de los individuos del estudio está esta especificada en la Tabla V.

El análisis bioquímico mostró que no hubo diferencias significativas en cuanto a la glucemia basal y final previa al sacrificio, entre los diferentes grupos entre sí, ni tampoco comparando los dos grupos expuestos a nanopartículas entre ellos (B/C) o con el control (B/A o C/A) (Tabla VI y Tabla VII) (Figura 14 y Figura 15).

Esto se justifica en parte porque los niveles de glucosa en cada uno de los animales se mantuvieron estables a lo largo del experimento. (Tabla VIII).

ANIMAL	GLUCOSA (mg/dl) BASAL	GLUCOSA (mg/dl) FINAL
A1	196	210
A2	182	198
A3	234	187
A4	240	189
A5	188	192
A6	166	199
A7	171	193
B1	230	211
B2	182	235
B3	168	166
B4	210	203
B5	197	196
B6	192	209
B7	193	165
C1	203	197
C2	220	212
C3	193	187
C4	188	197
C5	211	230
C6	194	201
C7	165	203

TABLA V: Cifras glucosa medidas en el momento basal (previo a la intervención) y en el momento final (previo al sacrificio).

GRUPO	Media	DE	IC 95%	<i>p</i> (A,B,C)	<i>p</i> (B Vs C)	<i>p</i> (Vs A)
A	196.71	29.33	169.59-223.84	ANOVA	Tukey 1.000	Dunnett
B	196.00	19.82	177.67-214.33	0.998		B/A 0.997
C	196.29	17.74	179.88-212.69			C/A 0.999

TABLA VI: Comparación de cifras de glucosa BASAL mg/dl entre grupos.

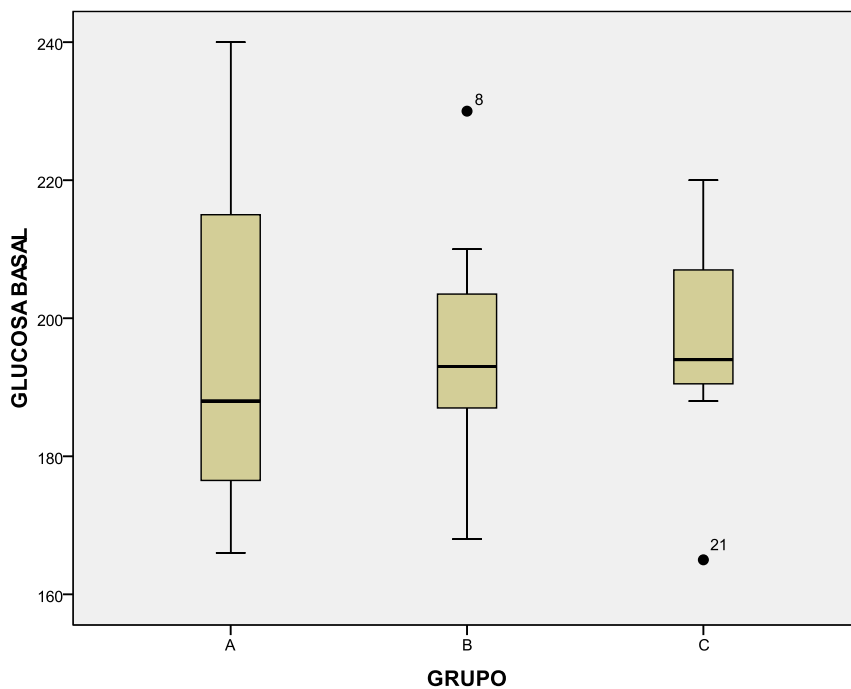


FIGURA 14: Comparación de cifras de glucosa BASAL mg/dl entre grupos.

GRUPO	Media	DE	IC 95%	$p (A,B,C)$	$p (B Vs C)$	$p (Vs A)$
A	195.43	7.76	188.25-202.61	ANOVA 0.646	Tukey 0.792	Dunnett B/A 0.950 C/A 0.567
B	197.86	25.17	174.58-221.13			
C	203.86	13.77	191.13-216.59			

TABLA VII: Comparación de las cifras de glucosa FINAL mg/dl entre grupos.

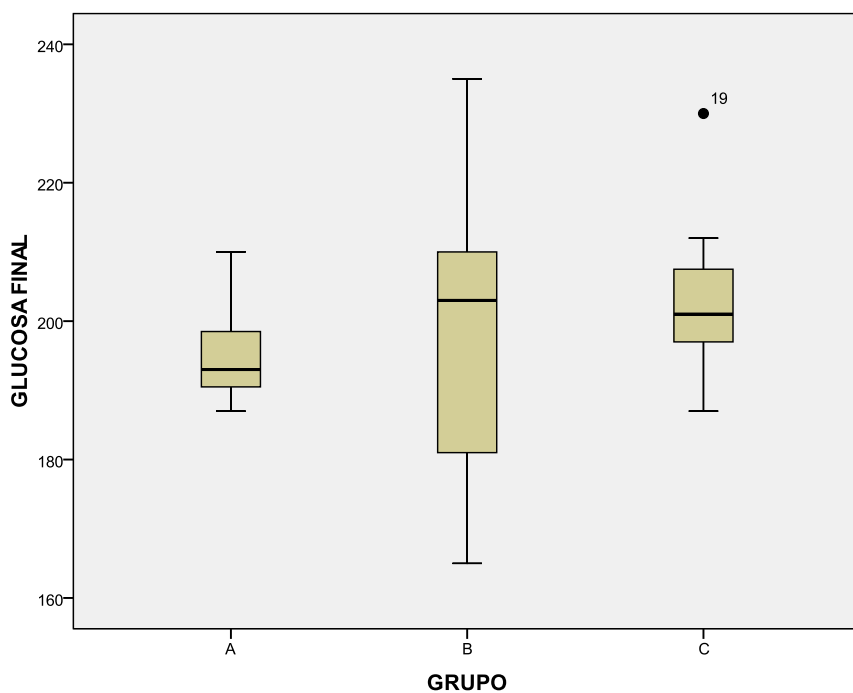


FIGURA 15: Comparación de las cifras de glucosa FINAL mg/dl entre grupos.

	Media	DE	IC 95%	T Student
GLUCOSA BASAL	169.33	21.69	186.46-206.21	$p = 0.632$
GLUCOSA FINAL	201.06	15.87	191.46-206.64	

TABLA VIII: Comparación cifras glucosa basal y final valorado mediante la prueba T-Student para variables pareadas.

B.2. Triglicéidos.

La cifra de triglicéidos basal y final de cada uno de los individuos del estudio está especificada en la Tabla IX.

El análisis bioquímico mostró que no hubo diferencias significativas en cuanto a la tasa de triglicéidos basal y final previa al sacrificio, entre los diferentes grupos entre sí, ni tampoco comparando los dos grupos expuestos a nanopartículas entre ellos (B/C) o con el control (B/A o C/A) (Tabla X y Tabla XI) (Figura 16 y 17).

Esto se justifica en parte porque los niveles de triglicéidos en cada uno de los animales se mantuvieron estables a lo largo del experimento (Tabla XII).

ANIMAL	TRIGLICERIDOS (mg/dl) BASAL	TRIGLICERIDOS (mg/dl) FINAL
A1	81	76
A2	31	56
A3	35	43
A4	49	40
A5	87	75
A6	22	45
A7	74	83
B1	54	60
B2	37	37
B3	37	41
B4	68	53
B5	33	43
B6	22	23
B7	80	85
C1	58	63
C2	56	45
C3	86	73
C4	71	67
C5	34	49
C6	80	67
C7	37	28

TABLA IX: Cifras de triglicéridos medidas en el momento basal (previo a la intervención) y en el momento final (previo al sacrificio).

GRUPO	Media	DE	IC 95%	<i>p</i> (A,B,C)	<i>p</i> (B Vs C)	<i>p</i> (Vs A)
A	54.14	26.32	29.80-78.49	ANOVA	Tukey	Dunnett
B	47.29	20.81	28.04-66.54	0.570	0.540	B/A 0.796
C	60.29	20.09	41.71-78.87			C/A 0.831

TABLA X: Comparación de cifras de triglicéridos en el momento BASAL mg/dl entre grupos.

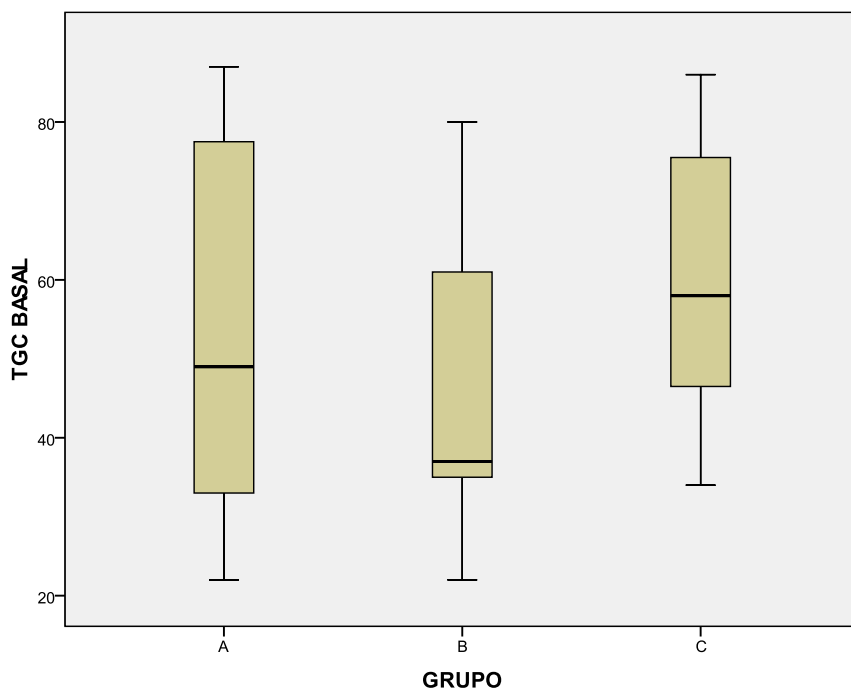


FIGURA 16: Comparación de las cifras de triglicéridos BASAL mg/dl entre grupos.

GRUPO	Media	DE	IC 95%	<i>p</i> (A,B,C)	<i>p</i> (B Vs C)	<i>p</i> (Vs A)
A	55.83	16.16	38.87-55.59	ANOVA 0.530	Tukey 0.742	Dunnett B/A 0.437 C/A 0.898
B	42.83	12.87	29.32-56.34			
C	60.67	11.13	48.99-72.35			

TABLA XI: Comparación de las cifras de triglicéridos FINAL mg/dl entre grupos.

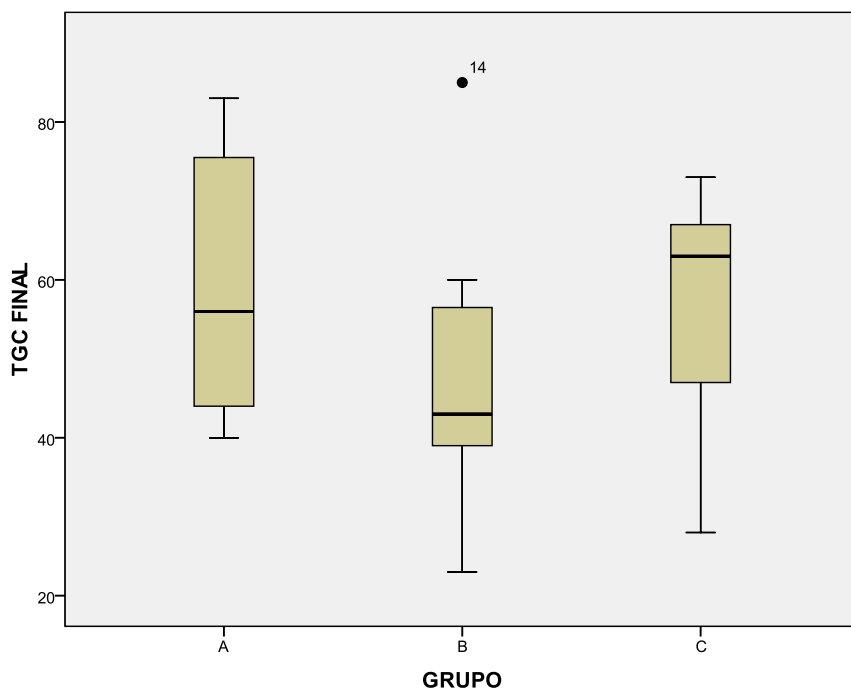


FIGURA 17: Comparación de las cifras de triglicéridos FINAL mg/dl entre grupos.

	Media	DE	IC 95%	p
TRIGLICERIDOS BASAL	53.90	22.10	43.84-63.97	0.713
TRIGLICERIDOS FINAL	54.86	17.68	46.81-62.91	

TABLA XII: Comparación cifras triglicéridos basal y final. Valorado mediante la prueba T-Student para variables pareadas.

B.3. Colesterol total.

Las cifras de colesterol basal y final de los diferentes individuos del estudio están especificadas en la Tabla XII.

El análisis bioquímico mostró que no hubo diferencias significativas en cuanto a la tasa de colesterol total basal y final previa al sacrificio, entre los diferentes grupos entre sí, ni tampoco comparando los dos grupos expuestos a nanopartículas entre ellos (B/C) o con el control (B/A o C/A) (Tabla XIV, Tabla Tabla XV)(Figura 18 y 19).

Esto se justifica en parte porque los niveles de colesterol en cada uno de los animales se mantuvieron estables a lo largo del experimento. (Tabla XVI).

ANIMAL	COLESTEROL TOTAL (mg/dl) BASAL	COLESTEROL TOTAL (mg/dl) FINAL
A1	33,00	35,00
A2	36,00	40,00
A3	45,00	43,00
A4	36,00	38,00
A5	51,00	51,00
A6	38,00	40,00
A7	38,00	47,00
B1	60,00	58,00
B2	35,00	39,00
B3	44,00	45,00
B4	33,00	37,00
B5	37,00	36,00
B6	52,00	49,00
B7	41,00	38,00
C1	41,00	40,00
C2	37,00	38,00
C3	32,00	33,00
C4	29,00	29,00
C5	39,00	41,00
C6	32,00	35,00
C7	57,00	34,00

TABLA XIII: Cifras de colesterol total medidas en el momento basal y final (previo al sacrificio).

GRUPO	Media	DE	IC 95%	$p (A,B,C)$	$p (B Vs C)$	$p (Vs A)$
A	39.57	6.24	33.79-45.34	ANOVA	Tukey	Dunnett
B	43.14	9.79	34.09-52.20	0.546	0.534	B/A 0.661
C	38.14	9.35	29.49-46.79			C/A 0.932

TABLA XIV: Comparación de las cifras de Colesterol total BASAL mg/dl entre grupos.

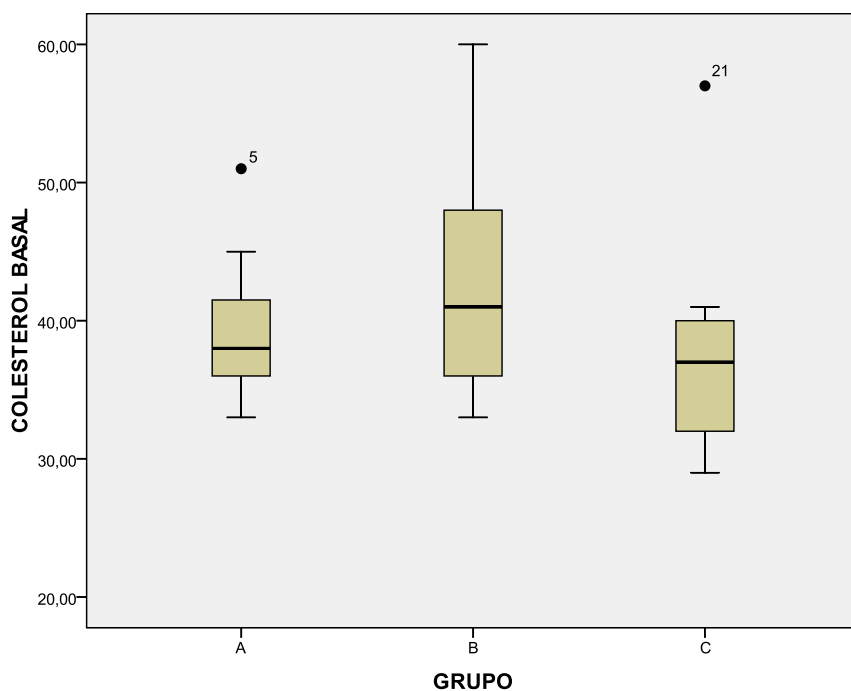


FIGURA 18: Comparación de las cifras de Colesterol total BASAL mg/dl entre grupos.

GRUPO	Media	DE	IC 95%	$p (A,B,C)$	$p (B Vs C)$	$p (Vs A)$
A	42.00	5.48	36.93-47.07	ANOVA	Tukey	Dunnett
B	38.00	17.32	21.98-54.02	0.530	0.917	B/A 0.715
C	35.71	4.23	31.80-39.63			C/A 0.459

TABLA XV: Comparación de las cifras de colesterol total FINAL mg/dl entre grupos.

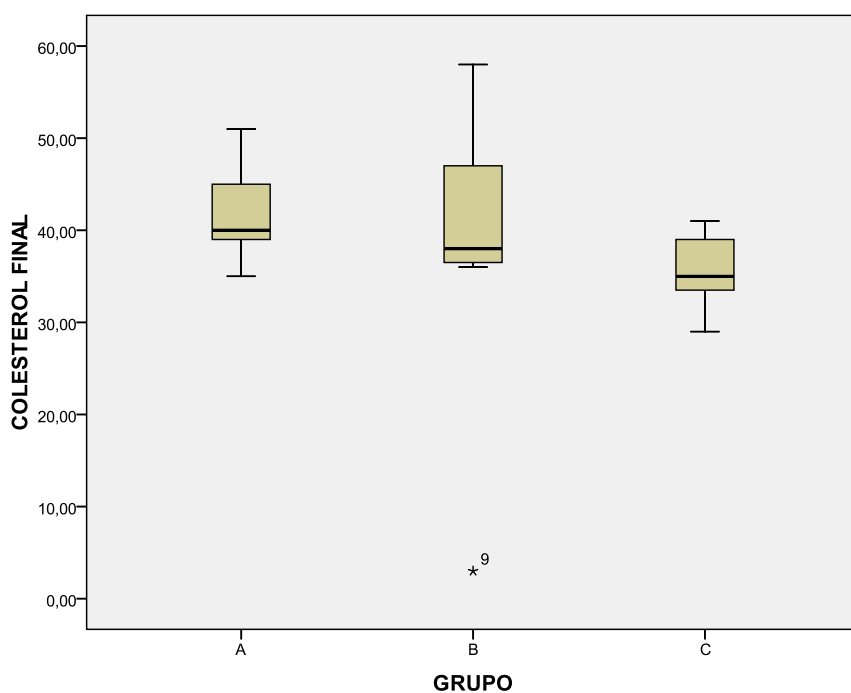


FIGURA 19: Comparación de las cifras de Colesterol total FINAL mg/dl entre grupos.

	Media	DE	IC 95%	p
COLESTEROL BASAL	40.29	8,44	36.44-44.13	0.399
COLESTEROL FINAL	38.57	10.56	33.77-43.38	

TABLA XVI: Comparación cifras totales de colesterol basal y final. Valorado mediante la prueba T-Student para variables pareadas.

B.2. Interleucina 6.

Los niveles de IL-6 basal y final de cada uno de los individuos del estudio están especificadas en la Tabla XVII.

Los niveles de interleucina 6 basales presentaron niveles menores de 2 en todos los animales del estudio. Los niveles de IL-6 final no presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio (Tabla XVIII) (Figura 20).

Sin embargo, como se puede observar, a diferencia de los parámetros bioquímicos anteriores, los niveles de IL-6 mostraron una elevación significativa de los niveles finales con respecto a los basales, sugestivos de la existencia de una respuesta inflamatoria postquirúrgica en todos los animales, con independencia del grupo al que fuesen adscritos (Tabla XIX).

ANIMAL	IL-6 BASAL	IL-6 FINAL
A1	<2	3,41
A2	<2	2,31
A3	<2	2,56
A4	<2	3,50
A5	<2	2,00
A6	<2	2,15
A7	<2	2,70
B1	<2	2,00
B2	<2	2,00
B3	<2	2,88
B4	<2	5,75
B5	<2	3,56
B6	<2	2,85
B7	<2	2,50
C1	<2	3,57
C2	<2	2,00
C3	<2	3,21
C4	<2	2,00
C5	<2	3,56
C6	<2	2,75
C7	<2	2,35

TABLA XVII: Niveles de IL-6 medidas en el momento basal y final (previo al sacrificio).

GRUPO	Media	DE	IC 95%	<i>p</i> (A,B,C)	<i>p</i> (B Vs C)	<i>p</i> (Vs A)
A	2.77	0.69	2.14-3.41	ANOVA	Tukey	Dunnett
B	2.66	0.59	2.11-3.20	0.685	0.814	B/A 0.611
C	3.07	1.30	1.88-4.29			C/A 0.960

TABLA XVIII: Comparación de las cifras de IL-6 FINAL mg/dl entre grupos.

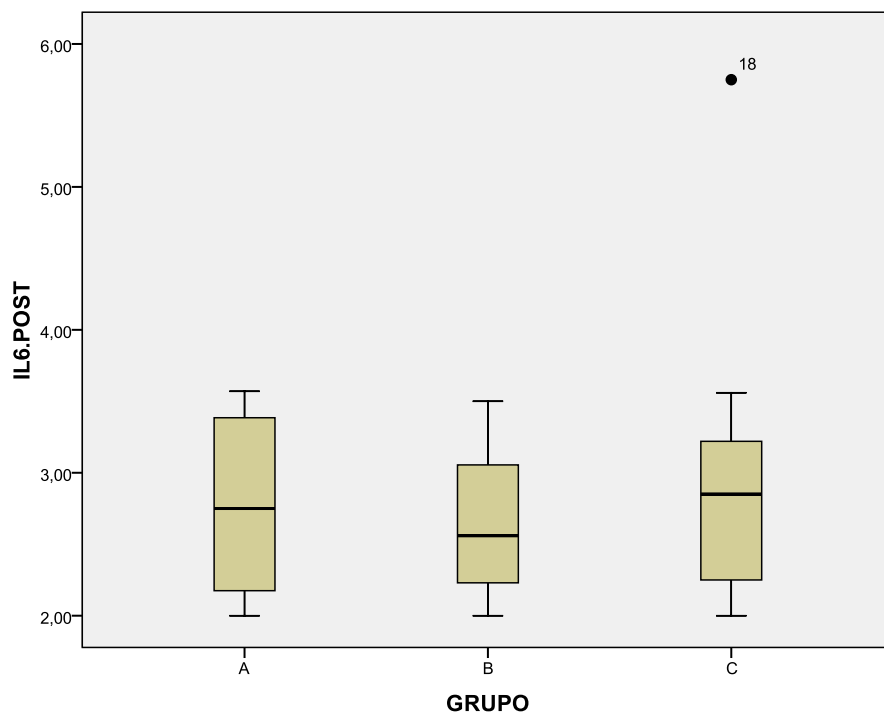


FIGURA 20: Comparación de las cifras de IL-6 FINAL mg/dl entre grupos.

	Media	DE	IC 95%	p
IL-6 BASAL	2	0	2	0.001
IL-6 FINAL	2.89	0.95	2.42-3.36	

TABLA XIX: Comparación cifras totales de IL-6 Basal y Final. Valorado mediante la prueba T-Student para variables pareadas.

C) RESULTADOS DESCRIPTIVOS MORFOLÓGICOS.

C.1. Hallazgos Histopatológicos.

El análisis histopatológico de las muestras de arteria carótida común recolectadas puso de manifiesto la ausencia de respuesta inflamatoria en la carótida contralateral (control) en cada uno de los grupos. La integridad histológica indica que la perfusión de nanopartículas calcificantes o el tratamiento adyuvante con estatinas no ejerce efecto alguno en arterias sanas (carótida izquierda) (Figura 21).

Por el contrario, la arteria carótida tratada mostró diferentes grados de alteración dependiendo del grupo al que fueran adscritos los animales. Según el tipo de lesión predominante, estos hallazgos se describieron en 5 categorías: cambios mínimos intimaes (Figura 22), hiperplasia parcheada (Figura 23), hiperplasia concéntrica (Figura 24), trombosis (Figura 25) y calcificación (Tabla XX).



Figura 21: Imagen histológica de endotelio normal de arteria no dañada (carótida izquierda), correspondiente a el animal A₆.

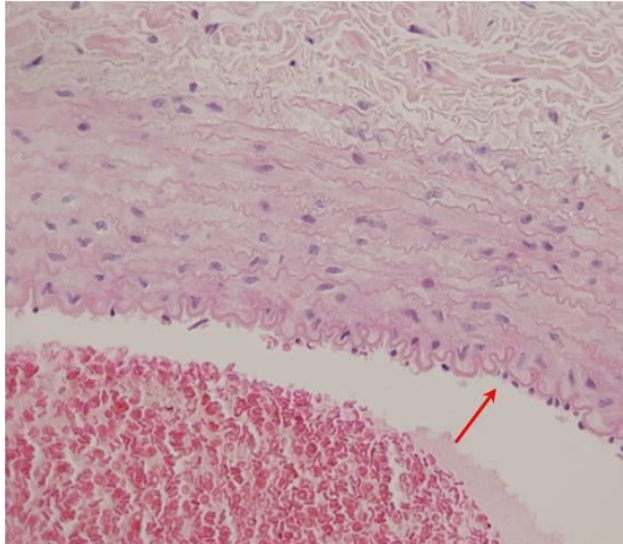


Figura 22: Imagen histológica de endotelio ligeramente desestructurado (cambios mínimos), correspondiente al animal A₂.

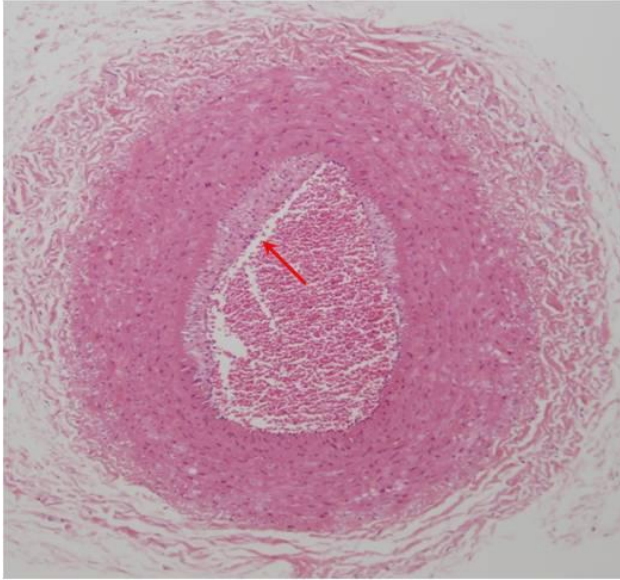


Figura 23: Imagen histológica de hiperplasia parcheada, correspondiente al animal A₄.

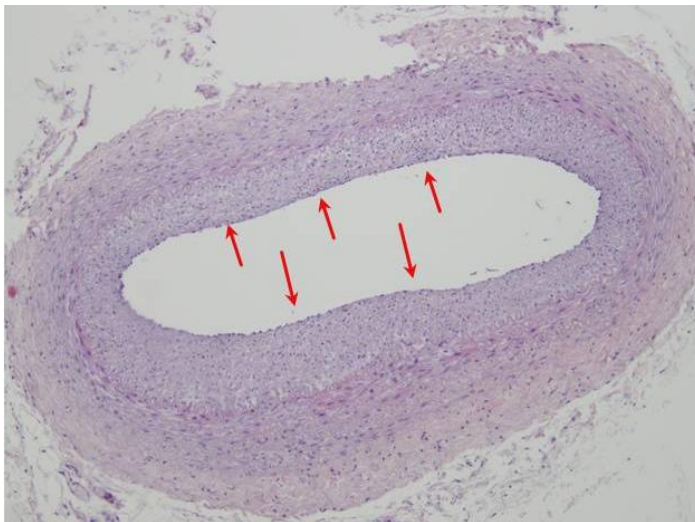


Figura 24: Imagen histológica de hiperplasia concéntrica, correspondiente al animal C₅.

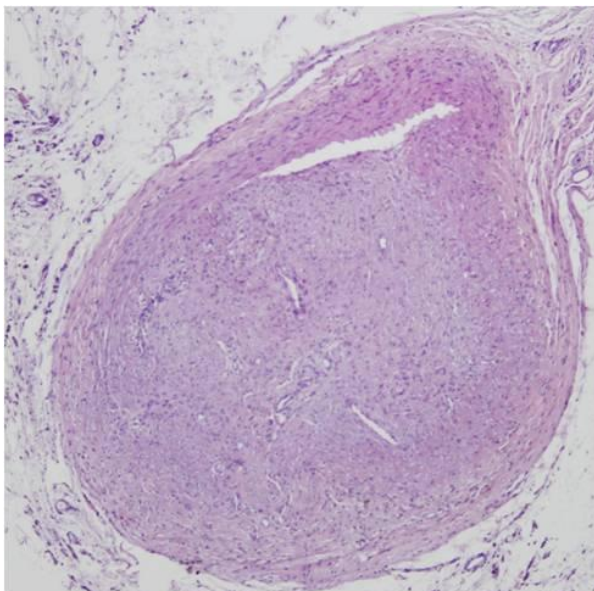


Figura 25: Imagen histológica de trombosis, correspondiente al animal B₄.

	Cambios mínimos	Hiperplasia parcheada	Hiperplasia concéntrica	Trombosis	Calcificación
A1	X				
A2	X				
A3		X			
A4		X			
A5	X				
A6				X	
A7	X				
B1				X	
B2			X		X
B3				X	X
B4				X	
B5			X		X
B6				X	
B7			X		X
C1				X	
C2		X			
C3				X	
C4			X		X
C5			X		
C6		X			X
C7		X			

Tabla XX: Resultados histopatológicos de cada uno de los animales.

C.2. Resumen de hallazgos histopatológicos.

Ordenados los hallazgos histopatológicos de acuerdo al grupo al que los animales perteneciesen y al tipo de lesión predominante (Tabla XXI), se observó que la trombosis arterial ocurrió en 7 ocasiones (1 grupo-A, 4 en grupo-B y 2 en grupo-C), que la presencia de calcificaciones se mostró en 6 casos que correspondieron a los animales tratados con nanopartículas (4 en grupo-B y 2 en grupo-C), que una importante respuesta hiperplásica concéntrica estuvo igualmente presente en los animales tratados con nanopartículas (3 en grupo-B y 2 en grupo-C), que una escasa hiperplasia parcheada fue observada en 5 animales (2 en grupo-A y 3 en grupo-C), y que cambios mínimos intimaes se manifestaron en 4 animales del grupo control A.

	Cambios mínimos	Hiperplasia parcheada	Hiperplasia concéntrica	Trombosis	Calcificación
CARÓTIDA NO DAÑADA	0	0	0	0	0
GRUPO A	4	2	0	1	0
GRUPO B	0	0	3	4	4
GRUPO C	0	3	2	2	2

Tabla XXI: Resumen de los resultados histopatológicos de cada uno de los grupos.

D) PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.

D.1. Área de neoíntima.

Los resultados del parámetro área de neoíntima (NI) para cada uno de los individuos se encuentran especificados en la Tabla XXII.

El análisis morfométrico comparativo correspondiente al Área de Neoíntima (engrosamiento íntimal valorado a los 30 días de seguimiento), mostró un aumento significativo de la media de la carótida dañada en todos los grupos en comparación con la media del grupo control (carótida contralateral) (Tabla XXIII, Figura 26).

Comparando los grupos de carótidas dañadas, el análisis morfométrico correspondiente al Área de Neoíntima (engrosamiento íntimal valorado a los 30 días de seguimiento), mostró un aumento significativo en el grupo-B donde adquirió un valor medio de $485235.94 \mu\text{m}^2$ (IC 95%, 370252.10-600218.87) en comparación con el grupo-A (87341.08 ± 124271), $p = 0.004$. De forma análoga si se compara el grupo-C (241536.60 ± 181185), expuesto a nanopartículas, con el grupo-A (control), se observa un aumento significativo de la hiperplasia, $p = 0.025$. Además, si comparamos los dos grupos expuestos a nanopartículas, el grupo-B con el grupo-C, también se observa una diferencia significativa en cuanto al nivel de hiperplasia íntimal, con $p = 0.035$, y por tanto, la administración de atorvastatina pudo reducir el efecto hiperplásico en el grupo-C con respecto al grupo-B (Tabla XXIV, Figura 27).

ANIMAL	Carótida dañada NI (μm^2)	Carótida control NI (μm^2)
A1	28464,79	10764,98
A2	15915,94	14993,68
A3	52704,02	14353,24
A4	122261,67	11233,00
A5	12962,41	7977,91
A6	355748,18	15431,11
A7	23330,52	9090,90
B1	567463,43	20197,64
B2	332272,47	9091,37
B3	617233,56	17525,05
B4	545814,90	7100,94
B5	350165,52	8356,21
B6	599458,32	18658,71
B7	384243,36	18862,84
C1	465748,34	13855,74
C2	195459,70	14191,49
C3	382943,85	17755,56
C4	91615,05	9772,99
C5	436451,93	16137,67
C6	65002,80	17926,44
C7	53534,54	11910,35

Tabla XXII: Cifras de área de neointima (NI) en μm^2 .

GRUPO	Media	DE	IC 95%	p (Mann-Whitney)
Dañada Grupo A	87341.08	124271	-27590.04-202272.29	0.006
Control Grupo A	11977.83	2972.72	9228.52-14727.12	
Dañada Grupo B	485235.94	124327	370252.10-600218.87	0.002
Control Grupo B	14256.11	5762.99	8926.23-19585.99	
Dañada Grupo C	241536.60	182285	72950.89-410122-31	0.002
Control Grupo C	14507.18	3016.12	11717.73-17296.62	

Tabla XXIII: Comparación de cifras de área de neoíntima entre la carótida dañada y la control (contralateral) por grupos de animales.

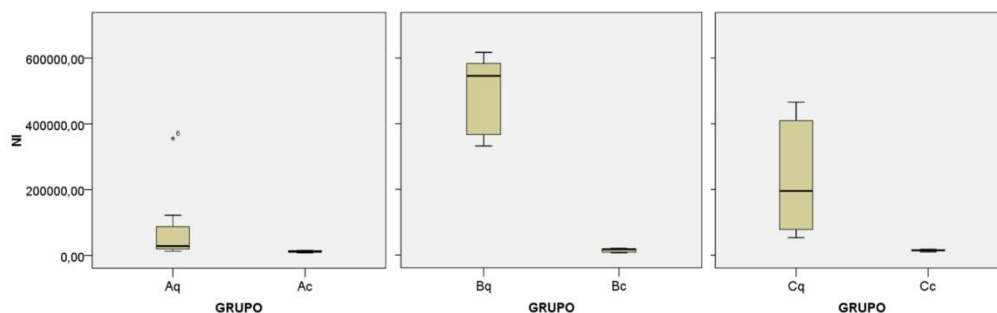


FIGURA 26: Comparación de cifras de área de neoíntima entre la carótida dañada (Aq, Bq, Cq) y la carótida control contralateral (Ac, Bc, Cc) en cada uno de los grupos de animales.

GRUPO	Media	DE	IC 95%	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney
A	87341.08	124271	-27590.04-202272.19	$p(A,B,C)$	$p B Vs C = 0.035$
B	485235.94	124327	370252.10-600218.87	0.003	$p B Vs A = 0.004$
C	241536.60	181185	72950.89-410122.31		$p C Vs A = 0.025$

Tabla XXIV: Comparación de cifras de área de neoíntima entre los diferentes grupos de carótidas operadas.

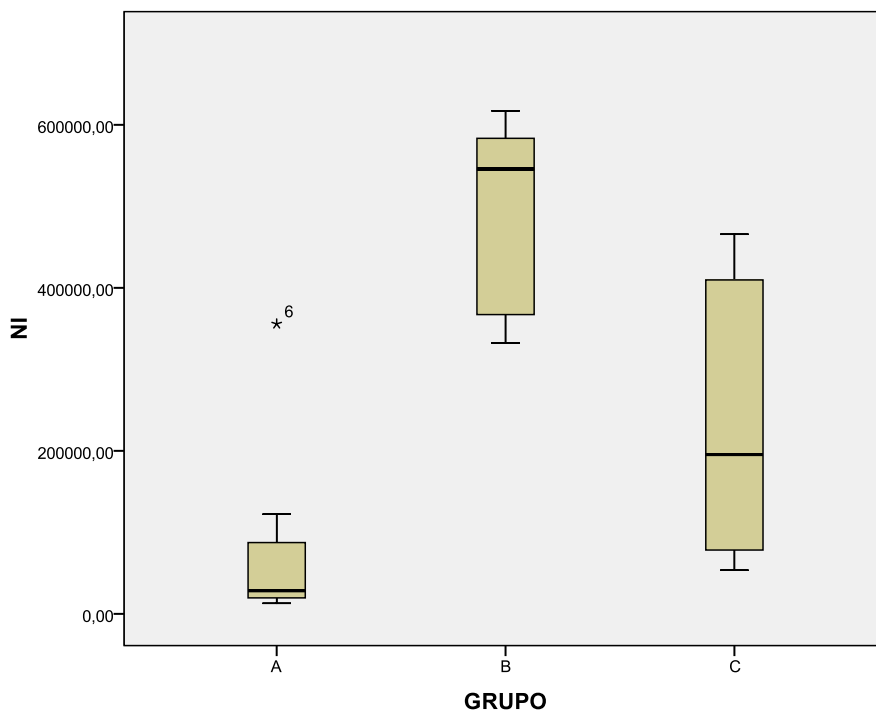


Figura 27: Diagrama de cajas de la distribución de los valores del área de neoíntima (NI) en μm^2 en cada uno de los grupos.

D.2. Área de capa media.

Los resultados del parámetro área de capa media (MA) para cada uno de los individuos se encuentran especificados en la Tabla XXV.

El análisis morfométrico comparativo correspondiente al área de capa media (valorado a los 30 días de seguimiento), no mostró diferencias significativas entre las carótidas dañadas y las carótidas control (carótida contralateral) de cada grupo del estudio (Tabla XXVI, Figura 28).

El área de capa media no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de carótidas dañadas, independientemente del tratamiento aplicado, lo que indica que el modelo experimental de daño intimal controlado con balón de angioplastia no altera esta estructura histológica de los vasos arteriales (Tabla XXVII, Figura 29).

ANIMAL	Carótida dañada MA (μm^2)	Carótida control MA (μm^2)
A1	181433,84	179502,69
A2	220036,69	254639,55
A3	193851,09	203656,78
A4	419931,27	395381,38
A5	133483,33	196663,09
A6	208990,72	147344,95
A7	277166,19	226653,96
B1	324365,77	294451,26
B2	181902,17	138664,59
B3	289621,79	314757,58
B4	263075,75	251834,91
B5	287246,28	156563,23
B6	256416,80	211435,11
B7	282626,01	322222,00
C1	223825,78	227550,11
C2	448383,12	305389,27
C3	298301,86	205172,29
C4	240612,34	283976,57
C5	252990,18	285660,00
C6	296208,93	299374,65
C7	388680,13	292600,11

Tabla XXV: Cifras de área de capa media en μm^2 .

GRUPO	Media	DE	IC 95%	p
Dañada Grupo A	233556.16	92854.32	147680.23-319432.09	t-Student
Control Grupo A	229120.34	80778.54	154412.65-303828.03	0.729
Dañada Grupo B	269322.08	44324.48	228328.77-310315.40	t-Student
Control Grupo B	241418.38	74706.75	172326.17-310510.60	0.082
Dañada Grupo C	307000.33	82759.96	230460.14-383540.53	Mann-Whitney
Control Grupo C	271389.00	38853.86	235455.17-307322.83	0.565

Tabla XXVI: Comparación de cifras de área de capa media entre la carótida dañada y la carótida control por grupos de animales.

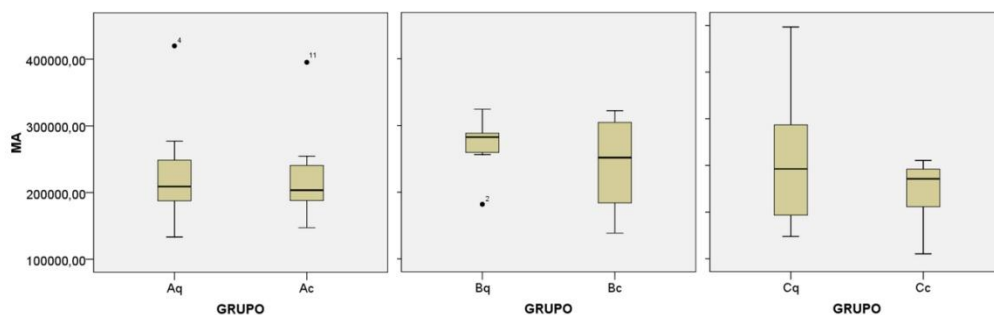


FIGURA 28: Comparación de cifras de área de capa media entre la carótida dañada (Aq, Bq, Cq) y la carótida control (Ac, Bc, Cc) en cada uno de los grupos de animales.

GRUPO	Media	DE	IC 95%	<i>p</i> (A,B,C)	<i>p</i> (B Vs C)	<i>p</i> (Vs A)
A	233556.16	92854.32	147680.23-319432.09	ANOVA	Tukey	Dunnett
B	269322.08	44314.49	228328.77-310315.40	0.225	0.632	B/A 0.594
C	307000.33	82759.96	230460.14-383540.53			C/A 0.154

Tabla XXVII: Comparación de cifras de área de capa media entre los diferentes grupos de carótidas operadas.

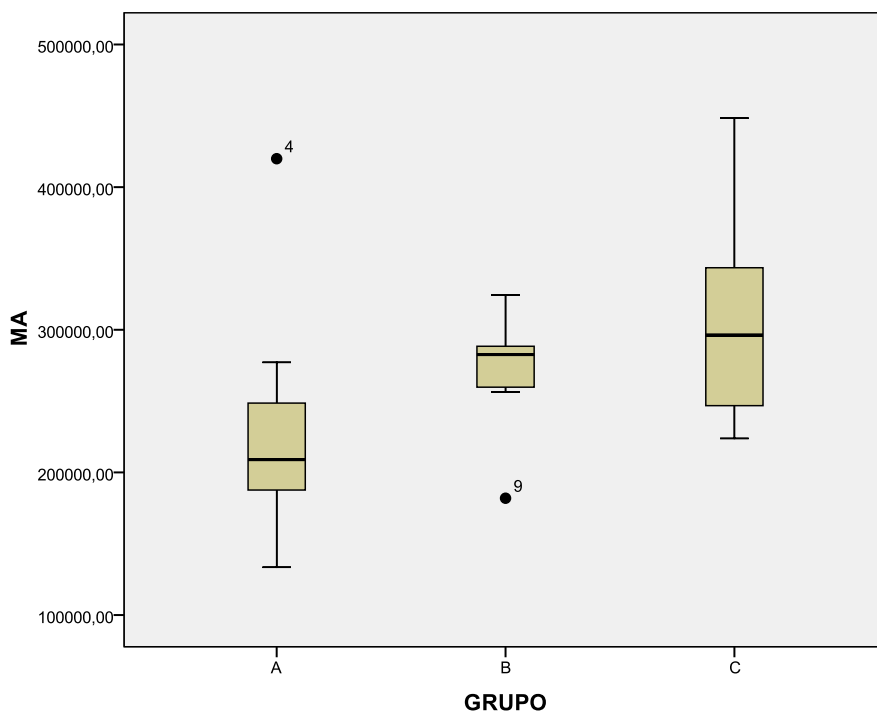


Figura 29: Diagrama de cajas de la distribución de los valores del área de capa media (MA) en μm^2 en cada uno de los grupos.

D.3. Ratio Intima/Media (IMR).

Los resultados del parámetro Ratio Intima/Media (IMR) para cada uno de los individuos se encuentran especificados en la Tabla XXVIII.

El análisis morfométrico comparativo correspondiente al Ratio de Intima/Media (valorado a los 30 días de seguimiento), mostró un aumento significativo la Ratio Intima/Media de la carótida dañada en todos los grupos en comparación con la media del grupo control (carótida contralateral) (Tabla XXIX, Figura 30).

De manera similar al Área Intimal, el análisis del Ratio Intima/ Media puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de carótidas dañadas B con respecto al grupo-A ($p= 0.004$) y con respecto al grupo-C ($p= 0.035$), lo que se explica por el mayor engrosamiento hiperplásico de la íntima en este grupo de animales, ya que la capa media permaneció estable en los tres grupos. Así, el ratio fue de 1.81 (IC 95%, 1.44-2.19) en el grupo-B, mientras no existen diferencias significativas entre el grupo-A (0.38 ± 0.59) y el grupo-C (0.89 ± 0.79), $p 0.064$ (Tabla XXX, Figura 31).

ANIMAL	Carótida dañada IMR	Carótida control IMR
A1	0,16	0,06
A2	0,07	0,06
A3	0,27	0,07
A4	0,29	0,03
A5	0,10	0,04
A6	1,70	0,10
A7	0,08	0,04
B1	1,75	0,07
B2	1,83	0,07
B3	2,13	0,06
B4	2,07	0,03
B5	1,22	0,05
B6	2,34	0,09
B7	1,36	0,06
C1	2,08	0,06
C2	0,44	0,05
C3	1,28	0,09
C4	0,38	0,03
C5	1,73	0,06
C6	0,22	0,06
C7	0,14	0,04

Tabla XXVIII: Cifras de Ratio de Intima/Media.

GRUPO	Media	DE	IC 95%	Mann-Whitney <i>p</i>
Dañada Grupo A	0.382	0.589	-0.162-0.927	0.006
Control Grupo A	0.058	0.025	0.034-0.081	
Dañada Grupo B	1.814	0.410	1.435-2.193	0.002
Control Grupo B	0.060	0.018	0.043-0.077	
Dañada Grupo C	0.895	0.791	0.164-1.626	0.002
Control Grupo C	0.055	0.017	0.039-0.071	

Tabla XXIX: Comparación de cifras de Ratio de Intima/Media entre la carótida dañada y la carótida control por grupos de animales.

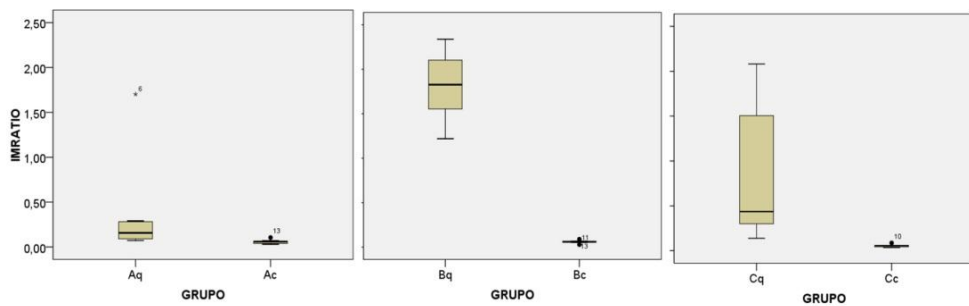


Figura 30: Comparación de cifras de Ratio de Intima/Media entre la carótida dañada (Aq, Bq, Cq) y la carótida control (Ac, Bc, Cc) en cada uno de los grupos de animales.

GRUPO	Media	DE	IC 95%	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney
A	0.38	0.59	-0.16-0.93	$p(A,B,C)$ 0.005	p B Vs C: 0.035
B	1.81	0.41	1.44-2.19		p B Vs A: 0.004
C	0.89	0.79	0.16-1.62		p C Vs A: 0.064

Tabla XXX: Comparación de cifras de Ratios Intima/Media entre los diferentes grupos de carótidas dañadas.

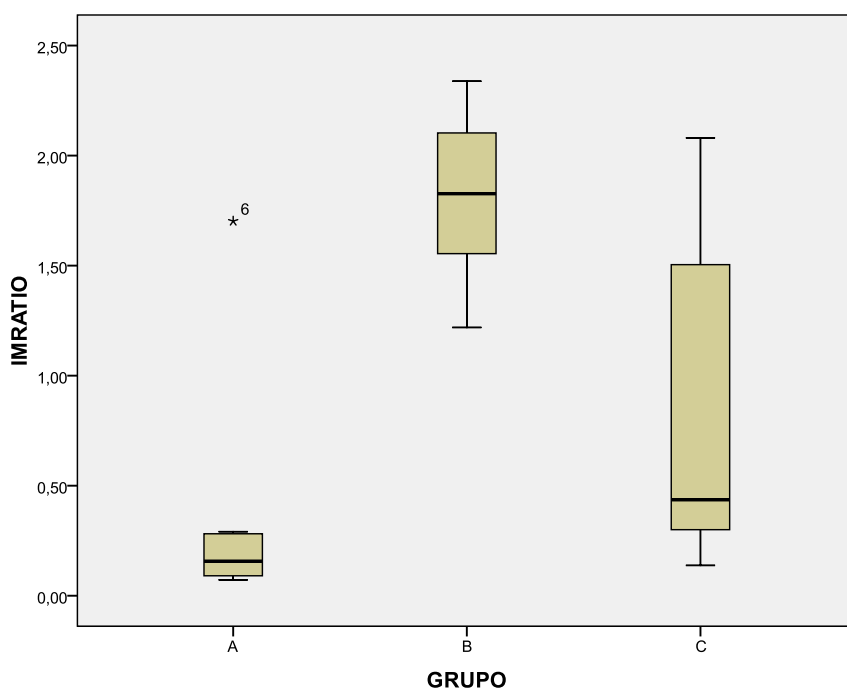


Figura 31: Diagrama de cajas de la distribución de los valores de Ratio de íntima/media (IMR) en cada uno de los grupos.

D.4. Ratio de Estrechamiento de la luz (ELR)

Los resultados del parámetro Ratio de Estrechamiento de la luz (ELR) para cada uno de los individuos se encuentra especificada en la Tabla XXXI.

El análisis morfométrico comparativo correspondiente al Ratio de Estrechamiento de la luz (valorado a los 30 días de seguimiento), mostró diferencias significativas entre las carótidas dañadas y las carótidas control (carótida contralateral) de todos los grupos ($p = 0.002$): del grupo A dañado (0.281 ± 0.326) con respecto al grupo A control (0.035 ± 0.004), del grupo B dañado (0.926 ± 0.096) con respecto a su control (0.039 ± 0.017), y entre el grupo C dañado (0.605 ± 0.359) y el grupo C control (0.045 ± 0.019) (Tabla XXXII, Figura 32).

Dado que la mayor respuesta hiperplásica intimal se mostró en el grupo-B, el Ratio de Estrechamiento de la Luz fue significativamente mayor en el grupo B (0.926 , IC 95% $0.837-1.014$), que en el grupo-A (0.282 ± 0.327) ($p=0.011$). No se pudieron encontrar, no obstante, diferencias significativas entre los grupos B/C y los grupos C/A (Tabla XXXIII, Figura 33).

ANIMAL	Carótida dañada ELR	Carótida control ELR
A1	0,11	0,03
A2	0,15	0,03
A3	0,21	0,04
A4	0,32	0,03
A5	0,09	0,04
A6	1,00	0,04
A7	0,10	0,03
B1	1,00	0,04
B2	0,78	0,02
B3	1,00	0,04
B4	1,00	0,02
B5	0,87	0,02
B6	1,00	0,07
B7	0,83	0,05
C1	1,00	0,03
C2	0,53	0,07
C3	1,00	0,05
C4	0,61	0,03
C5	0,80	0,06
C6	0,13	0,05
C7	0,17	0,02

Tabla XXXI: Cifras de Ratio de Estrechamiento de la luz (ELR).

GRUPO	Media	DE	IC 95%	Mann-Whitney <i>p</i>
Dañada Grupo A	0.281	0.326	-0.020-0.584	0.002
Control Grupo A	0.035	0.004	0.031-0.039	
Dañada Grupo B	0.926	0.096	0.837-1.014	0.002
Control Grupo B	0.039	0.017	0.023-0.055	
Dañada Grupo C	0.605	0.359	0.273-937	0.002
Control Grupo C	0.045	0.019	0.027-0.063	

Tabla XXXII: Comparación de cifras de Ratio de Estrechamiento de la luz entre la carótida dañada y la control por grupos de animales.

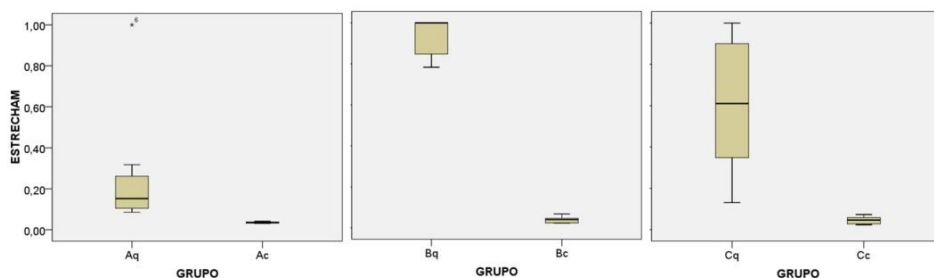


Figura 32: Comparación de cifras de Ratio de Estrechamiento de la luz (ELR) entre la carótida dañada (Aq, Bq, Cq) y la control contralateral (Ac, Bc, Cc) en cada uno de los grupos de animales.

GRUPO	Media	DE	IC 95%	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney
A	0.282	0.327	-0.021-0.583	$p(A,B,C)$ 0.015	$p B Vs C$: 0.073
B	0.926	0.096	0.837-1.014		$p B Vs A$: 0.011
C	0.605	0.359	0.274-0.937		$p C Vs A$: 0.083

Tabla XXXIII: Comparación de Ratio de Estrechamiento de la luz (ELR) entre los diferentes grupos de carótidas operadas.

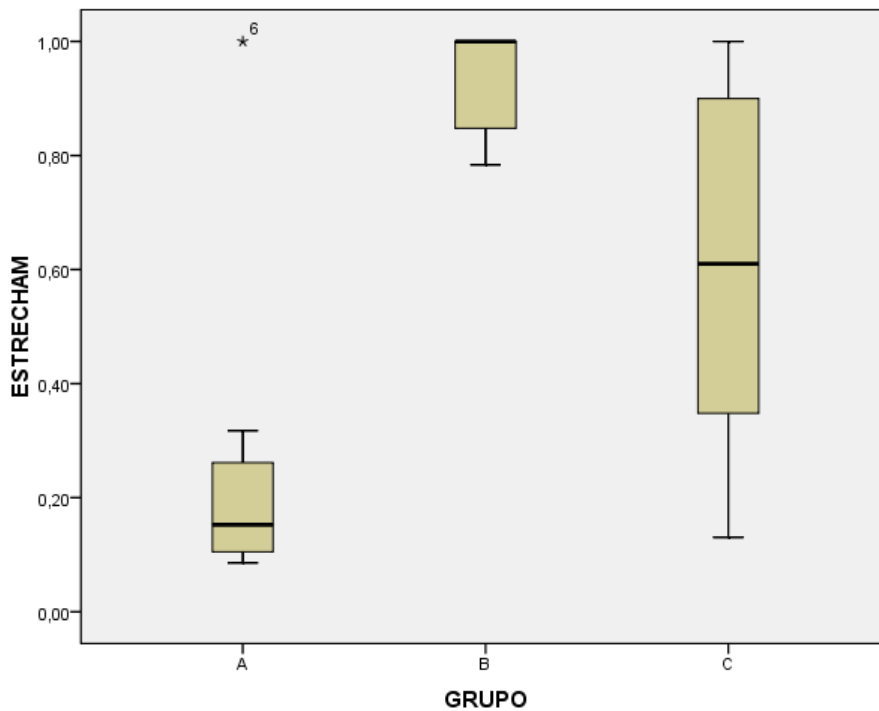


Figura 33: Diagrama de cajas de la distribución de los valores de estrechamiento de la luz (ESTRECHAM) en cada uno de los grupos.

E) Calcificación.

Analizando la presencia de calcificaciones en las muestras histológicas, se observó que éstas tan sólo estuvieron presentes en los grupos tratados con nanopartículas, siendo la tasa de aproximadamente del 57% en el grupo-B (4 casos de 7) (Figuras 34 y 35), y del 28.5% en el grupo C (2 casos de 7), (Figura 36), aunque el tamaño muestral es pequeño las diferencias fueron estadísticamente significativas. El grupo-A (control), por el contrario, no mostró ningún tipo de calcificación a pesar de sufrir el mismo daño intimal (Tabla XXIV).

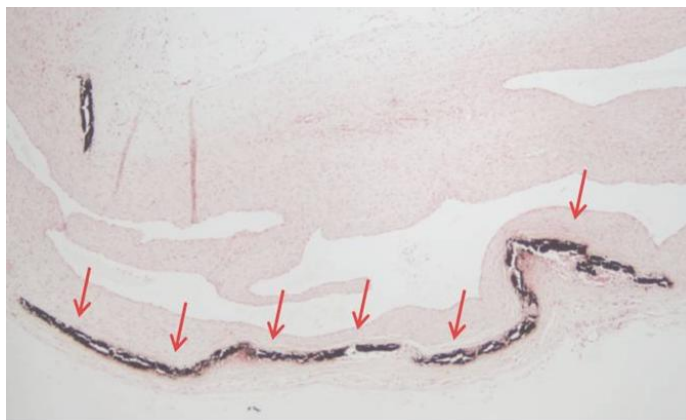


Figura 34: Imagen histológica de calcificación en la transición íntima/media, correspondiente a un individuo con hiperplasia intimal concéntrica B₅.



Figura 35: Imagen histológica de foco de calcificación, correspondiente a un individuo con trombosis arterial (B₃).

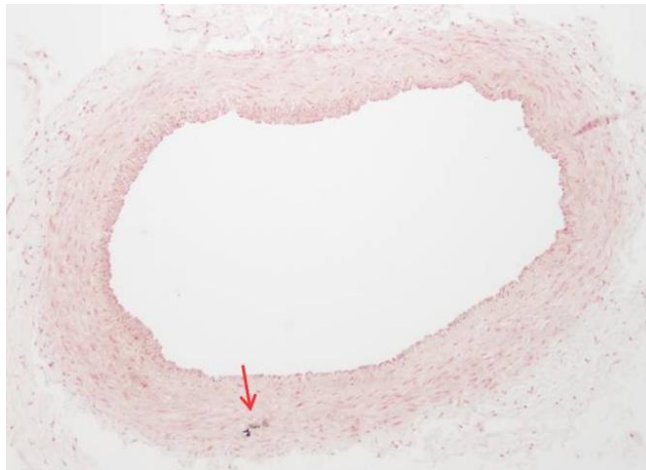


Figura 36: Imagen histológica de foco de calcificación, correspondiente a un individuo con hiperplasia parcheada (C₆).

TABLA DE CONTINGENCIA CALCIFICACION/GRUPO

		GRUPO			Total
		A	B	C	
CALCIFICACION	NO	7	3	5	15
	SI	0	4	2	6
Total		7	7	7	21

Razón de Verosimilitud $p=0.027$

Tabla XXXIV: Tabla de contingencia que enfrenta las variables cualitativas, pertenencia a un grupo (variable independiente) y calcificación arterial sí o no (variable dependiente).

Si los datos se agrupan, de modo que comparamos los animales tratados con nanopartículas (grupos-B y C) frente a los animales del grupo control (grupo-A), observamos que las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p= 0.050$). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que las nanopartículas pueden contribuir al desarrollo de calcificaciones patológicas dentro de los vasos arteriales (Tabla XXXV).

TABLA DE CONTINGENCIA CASO-CONTROL/CALCIFICACIÓN

		CASO-CONTROL		Total
		CASO	CONTROL	
CALCIFICACION	NO	8	7	15
	SI	6	0	6
Total		14	7	21

Test de Fisher $p=0.050$

Tabla XXXV: Tabla de contingencia que enfrenta las variables cualitativas, pertenencia a un grupo: CASO/CONTROL (variable independiente) y calcificación arterial sí o no (variable dependiente).

Si comparamos el Grupo-B y el Grupo-C, ambos expuestos a nanopartículas, y contruímos del mismo modo un tabla de contingencia, no se obtienen diferencias significativas, $p=0.592$ (Tabla XXXVI).

TABLA DE CONTINGENCIA GRUPO B-C/CALCIFICACIÓN

		GRUPO		Total
		B	C	
CALCIFICACION	NO	3	5	8
	SI	4	2	6
Total		7	7	14

Test de Fisher $p=0.592$

Tabla XXXVI: Tabla de contingencia que enfrenta las variables cualitativas, pertenencia a un grupo: B ó C (variable independiente) y calcificación arterial sí o no (variable dependiente).

VI. DISCUSIÓN

A) DISCUSIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.

A.1. JUSTIFICACIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

Numerosas especies animales han sido utilizadas como modelo de aterosclerosis (el cerdo, el primate, los ratones...). El conejo presenta una susceptibilidad especial para desarrollar lesiones ateroscleróticas. Además, su reducido coste, fácil manejo y mantenimiento en cautividad, hacen de él un candidato ideal para ser utilizado en modelos experimentales de lesión arterial ¹²².

A diferencia de otras especies como la rata, las carótidas del conejo pueden presentar estenosis significativas macroscópicamente similares a las que se desarrollan en el ser humano. El daño intimal con balón de angioplastia causa una lesión histopatológica comparable a la de la angioplastia en humanos, con disección medial y fractura de la placa ^{140, 141}. De hecho, en el modelo histopatológico del conejo, podemos encontrar macrófagos espumosos (*foam cells*) y aumento de la matriz extracelular.

En nuestro caso además, el tamaño de los vasos carotídeos contribuyó a nuestra decisión de incluirlo como animal de experimentación en este estudio, ya que su grosor permite técnicamente la realización de la intervención expuesta sin riesgo a inducir una oclusión iatrogénica.

A.2. JUSTIFICACIÓN DEL MODELO DEL DAÑO INTIMAL.

A.2.1. Modelos animales de placa aterosclerosa.

El objetivo de prevenir las complicaciones de la enfermedad cardiovascular, particularmente la calcinosis, nos llevó a interesarnos por modelos experimentales que desarrollasen de la forma más exacta y fiable posible los mecanismos que se suceden en la formación de una placa complicada en el humano.

En este sentido, los modelos de *cultivo celular* son muy útiles para aclarar interrogantes sobre los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, pero carecen de los componentes biológicos necesarios para responder a cuestiones más elaboradas sobre los eventos que se suceden y dan como resultado una lesión aterosclerótica sintomática^{122, 140}.

El estudio de la vulnerabilidad de la placa de ateroma y su proceso de rotura requiere de la elaboración de modelos experimentales complejos. Por otra parte, los modelos tradicionales de inducción de placa aterosclerótica se centran en el estudio de los componentes de la placa, el tamaño de la lesión, la reducción de la luz arterial, estructura de la placa, los componentes celulares inflamatorios, la proliferación de células musculares lisas, los acúmulos lipídicos..., todo ello desde un punto de vista meramente descriptivo. Para una mejor predicción del riesgo de rotura de placa, se idearon nuevos parámetros que se correlacionaron con un riesgo elevado de rotura, tales como el ratio núcleo lipídico/cápsula fibrosa de la placa, aumento de la apoptosis de células musculares lisas, detección de la presencia de ciertas enzimas o la acumulación de macrófagos y células T.

Incluso se señalaron índices de vulnerabilidad morfométricos como la ratio de placa ocupada por lípidos ^{126, 140}.

Un paso más allá, metodológicamente, lo representa la creación de modelos que intentan reproducir *la rotura espontánea* de la placa de ateroma o bien en los cuales se puede inducir esa rotura de forma artificial. Los modelos de rotura espontánea de placa logrados hasta ahora son muy escasos, se trata de experimentos complejos, con animales de difícil adquisición y manejo, y además, los tiempos de experimentación son muy largos, encareciendo el coste y complicando aún más la investigación ^{142, 143}. Evidentemente estos modelos pese a su gran utilidad no son prácticos ni fácilmente reproducibles.

La inducción artificial de rotura de placa o trombosis en modelos animales tiene el inconveniente de ignorar los mecanismos fisiopatológicos reales que provocan la rotura de placa, ya que no son totalmente conocidos. Sin embargo, se trata de modelos más simples, útiles y reproducibles.

El primer estudio que logró reproducir la complicación de la placa aterosclerosa fue desarrollado por Constantinides ¹⁴⁴, mediante la inyección intraperitoneal de veneno de víbora Russell, que actúa como procoagulante y toxina endotelial, seguido de inyección parenteral de histamina, con efecto vasopresor en conejos. Como resultado se obtuvo rotura de placa y trombosis. Otro modelo consiste en la implantación de un catéter con balón en aorta torácica de conejos alimentados con dietas intermitentes ricas en colesterol. El balón es inflado después de que la lesión aterosclerótica se forme alrededor de éste, ocasionando ruptura de lesión y trombosis ¹⁴⁵. Abela e cols. ¹³¹ desarrollaron un modelo en conejos con diversas dietas ricas en colesterol y sometidos posteriormente a la realización de daño intimal mecánico, simulando un modelo de placa vulnerable para ruptura y

trombosis, siendo capaz de ser usado para probar agentes farmacológicos que puedan reducir el desarrollo de placas ateroscleróticas vulnerables o cantidad de trombos formados. Tanto en el estudio de Rekhter como en el de Abela se utilizó como inductor de la rotura de placa/trombosis el veneno de víbora Russel más la histamina, otra forma de inducir la rotura de placa consiste en inyectar eritrocitos autólogos del animal en la placa de ateroma producida en conejos ¹²⁶.

Otra alternativa más sencilla es desarrollar un modelo de aterosclerosis acelerada en conejos sometidos a dieta hipercolesterolémica y en los que se induce un daño intimal con balón de angioplastia. Estos modelos se utilizaron en principio como modelos de *reestenosis*, pero consideramos justificada su utilización como herramienta de estudio del inicio y desarrollo de la placa de ateroma ^{140, 141}, ya que la presión de inflado del balón puede ser asumida como una medida de estrés arterial, que ocasiona una disfunción endotelial, primer paso para el inicio de la placa aterosclerosa, como se ha comentado en la introducción. Posteriormente, el objetivo es analizar la repercusión de determinada exposición a sustancias o terapias sobre la evolución de la lesión intimal producida.

Por supuesto, estos modelos presentan la limitación de no controlar otros factores que en el organismo humano se han mostrado como facilitadores de la evolución y complicación de placa de ateroma: la coagulabilidad sanguínea, la interacción sangre/pared arterial, la vasoconstricción arterial y la descarga simpática entre otros. Pese a ser modelos de gran utilidad práctica, el ateroma humano, típicamente formado por décadas, puede tener aspectos no parecidos al obtenido en tiempo relativamente corto en experimentos con conejos ¹²⁸.

A.2.2. Modelos animales de calcificación arterial.

En la literatura existen diferentes modelos animales para el estudio de la calcificación arterial. Gadeau et al. desarrollaron un modelo en conejos Fauve de Bourgogne. Para ello realizaron un daño mecánico arterial en la aorta del conejo mediante un balón de angioplastia de 3F, inflado en 3 ocasiones hasta 1.2-1.3 atm. Los conejos fueron sacrificados en diferentes intervalos, entre los 2 y los 30 días después de la intervención¹⁴⁶. Hallaron focos de calcificación arterial desde estadios iniciales de la lesión, y de hecho parece demostrada la presencia de proteínas relacionadas con la formación ósea desde etapas muy iniciales de progresión de la aterosclerosis, como la estría grasa⁸².

En nuestro modelo experimental pretendemos simular las fases iniciales de la enfermedad aterosclerótica, y estudiar el desarrollo de la formación de calcificaciones en la pared arterial, por lo que basándonos en la bibliografía usamos un balón de angioplastia, que mimetiza uno de los mecanismos reconocidos de inicio de la lesión: el factor mecánico, produciendo un daño intimal y activación del endotelio¹³². Para un estudio que pretendiera mimetizar la generación inicial de la estría grasa serían necesarias dietas enriquecidas con 0.25% de colesterol durante una duración de 4 semanas^{146, 147}. Por este motivo, éste es el tipo de dieta que recibieron los animales en nuestro trabajo.

A.3. JUSTIFICACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE ATORVASTATINA.

A.3.1. Efecto de la Atorvastatina sobre la hiperplasia intimal.

La hiperplasia intimal se debe a la migración, proliferación y remodelación de la matriz extracelular producida por las células musculares lisas vasculares. Las estatinas son inhibidores de la 3-Hidroxy-3-metilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), lo que produce una disminución del *Mevalonato*, precursor del colesterol. Mediante ese mecanismo de acción reducen el nivel plasmático de colesterol en pacientes con hipercolesterolemia, produciendo un efecto beneficioso en la enfermedad aterosclerótica. Pero el Mevalonato no solo es necesario para la producción de colesterol, sino también para la de otros isoprenoides. La inhibición de la prenilación de proteínas, en concreto de las metaloproteasas (MMPs), parece ser la clave para la afectación de la función de las células musculares lisas vasculares¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, y por consiguiente, su posible efecto en la inhibición de la proliferación y migración de estas células. Este mecanismo de acción justificaría la menor hiperplasia intimal en el Grupo-C.

A.3.2. Efecto de la Atorvastatina sobre la calcificación.

Existe controversia sobre el efecto de las estatinas sobre la calcificación de las estructuras vasculares, tanto placas ateroscleróticas como válvulas cardíacas. Algunos estudios de imagen realizada mediante tomografía computerizada multicorte, no detectan una disminución de la calcificación visible sobre las arterias coronarias tras el tratamiento con estatinas¹⁵¹⁻¹⁵⁴; sin embargo, otros defienden que la terapia intensiva con hipolipemiantes disminuye la calcificación tanto de las válvulas cardíacas, como de las arterias coronarias¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Aunque la tasa de calcificación arterial, en nuestro estudio, fue discretamente menor en el grupo-C (28.5%) que en el grupo-B (57%), el pequeño tamaño muestral no permite extraer conclusiones definitivas sobre el posible efecto protector de la atorvastatina frente a la acción calcificante de las nanopartículas, con lo que la controversia, en este sentido, continúa abierta.

El mecanismo de acción mediante el cual ejercen esta supuesta capacidad protectora anticalcificante no está claro. En un modelo animal en el cerdo, la disminución del colesterol en la dieta por sí misma, fue capaz de disminuir la carga de calcificación tanto de la capa intimal como de la media ¹⁵⁸, sugiriendo que la disminución del colesterol circulante producida por los fármacos hipolipemiantes podría ser la responsable directa. En este sentido, Rajamannan et al., demostraron mediante modelos animales, que la hipercolesterolemia crónica produce mineralización de la válvula aórtica, y que dicha aposición patológica de calcio es inhibida por la Atorvastatina ^{110, 116, 159}. Otros estudios han identificado otros niveles de actuación de la atorvastatina: proliferación celular, transformación al fenotipo osteoblasto-like, proteína relacionada con el receptor de LDL 5 (Lrp5) y la óxido nítrico sintasa (NOS). El debate permanece, ya que las conclusiones no son definitivas y existen opiniones basadas igualmente en modelos experimentales totalmente opuestas ¹¹⁸.

Los efectos pleiotrópicos de las estatinas podrían estar relacionados con otras dos posibles vías de actuación. Por un lado, la disminución de la respuesta inflamatoria ligada al fenómeno de la aterosclerosis (inhibición del interferon γ , disminución de la respuesta de los linfocitos T, el incremento de la producción de óxido nítrico (NO) y disminución la adhesión leucocitaria) ⁷⁹. Por otro, parece que las estatinas producen una inhibición de la formación y reabsorción de hueso por los osteoclastos, a la vez que

promueven la formación de nuevo tejido óseo, en este sentido supondrían una herramienta terapéutica muy útil para luchar contra el fenómeno de la *calcificación paradójica* ⁷⁹.

Por tanto, consideramos fundada la teoría de que la Atorvastatina puede ser una sustancia beneficiosa para el tratamiento de la calcificación arterial.

A.4. JUSTIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA Y MORFOMETRÍA.

A.4.1. Tinciones.

La tinción con Hematoxilina-Eosina (H/E) es el método más ampliamente utilizado como tinción inicial de los tejidos para su estudio histopatológico. Nos permite diferenciar el núcleo y citoplasma de las células que componen el tejido, así como estudiar la estructura del mismo, su integridad y la existencia de alguna irregularidad. En nuestro caso, con esta tinción evaluamos las muestras para determinar su calidad, la integridad de los cortes y la presencia de alteraciones sobre la estructura normal del tejido vascular, tales como: hiperplasia intimal, alteraciones de las láminas elásticas, presencia de células inflamatorias, etc...¹⁶⁰.

Posteriormente, la tinción con la técnica Elástica de Van Gieson nos permitió diferenciar de una forma más clara las fibras elásticas de la lámina elástica interna y la lámina elástica externa de la pared vascular. Esto resulta muy útil a la hora de realizar el análisis morfométrico, ya que permite una mayor exactitud en las medidas, lo que hace de esta tinción la más utilizada para este tipo de estudios ¹⁶¹⁻¹⁶⁵.

Finalmente, la técnica de tinción Von Kossa nos permitió detectar depósitos de calcio. El procedimiento es bien conocido desde el siglo XIX, aunque ha sido modificado para conseguir imágenes mejores y más específicas ¹⁶⁶. Actualmente, suele ser utilizado en el campo de la investigación de la desmineralización ósea, pero también se emplea para la detección de mineralización ectópica en otro tipo de tejidos.

A.4.2. Morfometría.

El objetivo de estas técnicas es valorar los cambios morfológicos producidos en la pared arterial (luz, íntima, media y adventicia) y traducirlos de forma numérica para poder ser comparados estadísticamente. Diversos parámetros morfométricos han sido utilizados para valorar la lesión arterial producida por diferentes métodos o fármacos. De los publicados en la literatura, nos han parecido más interesante valorar el método de medición de áreas, el porcentaje de estenosis de la luz arterial mediante el parámetro “Ratio de Estrechamiento de la Luz (ELR)” ^{164, 167}, y la ratio del área íntima con respecto las áreas de las diferentes capas arteriales. Este último parámetro, además, añade un factor de corrección que tiene en cuenta las dimensiones totales de vaso tratado. En este sentido, el parámetro más ampliamente utilizado y aceptado es el “Ratio de Área Íntima/Media (IMR)

¹⁶⁷⁻¹⁷¹

B) DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

B.1. RESULTADOS ANALÍTICOS.

B.1.1. Niveles de glucosa y triglicéridos.

El análisis bioquímico de los animales intervenidos puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas entre los datos basales y finales, previos a su sacrificio, tampoco existen diferencias significativas en los niveles analíticos de estos parámetros entre los diferentes grupos de tratamiento. Todo esto subraya la homogeneidad de la muestra. La comprobación de la homogeneidad de la muestra resulta imprescindible para la obtención de conclusiones válidas, y para asegurar que no existe ningún tipo de sesgo o cambio de circunstancias ambientales que pueda alterar los resultados.

B.1.2. Niveles de colesterol plasmáticos.

No existieron diferencias significativas en los niveles de colesterol basal y final entre los diferentes grupos de animales. Este dato es muy importante en nuestro trabajo, ya que la presencia de niveles de colesterol más elevados en alguno de los grupos supondría la inclusión de un factor de confusión que podría causar un sesgo en la relación entre las variables dependiente (hiperplasia o calcificación) e independiente (pertenencia a un grupo). Esto se debe a que la elevación de los niveles de colesterol sistémicos y de lipoproteínas de baja densidad, han demostrado por sí mismos ser causa de mayor reacción intimal¹⁷²⁻¹⁷⁴ y posiblemente de la aparición de calcificaciones vasculares^{110, 159, 175}.

En nuestro modelo experimental, una dieta suplementada con 0.25% de colesterol es suficiente para reproducir modelos de estría grasa en el conejo, pero no supone una elevación de los niveles de colesterol sistémicos en el animal que puedan por sí mismos influir en los resultados¹⁴⁷.

Por otra parte, dado que los niveles de colesterol basales y finales en el grupo tratado con atorvastatina fueron similares (sin diferencias estadísticamente significativas), se puede interpretar que el efecto protector de la atorvastatina sobre el desarrollo de la hiperplasia intimal se debe más bien a sus efectos antiinflamatorios pleiotrópicos que a la propia disminución inducida de los niveles de colesterol plasmáticos^{148, 150, 175}.

B.1.3. Interleucina 6.

La IL-6 es una glucoproteína segregada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Se trata de una citocina con actividad pro-inflamatoria. En nuestro estudio, se observó una diferencia significativa entre los niveles basales y finales de todos los animales (tratados y controles), lo que puede interpretarse simplemente como una respuesta inflamatoria sistémica a la intervención realizada.

B.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS MORFOLÓGICOS.

El análisis histopatológico de las muestras de arteria carótida común recolectadas indica una mayor tendencia a desarrollar grados más severos de hiperplasia intimal en aquellos animales que han sido expuestos al preparado con nanopartículas. Dicha tendencia es más clara en el Grupo-B, donde todos los individuos presentaron los grados más altos de hiperplasia: hiperplasia concéntrica o trombosis. Contrariamente, los animales del Grupo-A (control) presentaron rangos de hiperplasia más moderados, hiperplasia parcheada o cambios mínimos en su mayoría. El Grupo-C, presentó grados de hiperplasia intermedios, posiblemente debido a la acción “protectora” contra la hiperplasia intimal del tratamiento con Atorvastatina. Las carótidas no dañadas, no presentaron cambios histopatológicos reseñables.

Sin embargo, la comparación morfológica por sí sola no nos permite sacar conclusiones, dado que dicha clasificación está expuesta a la subjetividad del investigador. Por esta razón se procedió al estudio cuantitativo morfométrico de las muestras.

De forma análoga se intuye una tendencia a la presentación de calcificaciones únicamente en los grupos expuestos a nanopartículas (B y C), mientras que el grupo control A no presenta ningún caso de calcificación. Dicha tendencia es posteriormente analizada estadísticamente.

B.3. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS.

Nuestro estudio mostró diferencias estadísticamente significativas entre diversos parámetros morfométricos de los distintos grupos. Es importante indicar que se utilizó como control de cada animal la arteria carótida contralateral no intervenida (carótida izquierda). Este material fue necesario para evaluar el posible efecto sistémico en arterias sanas de la administración endovenosa de una solución con nanopartículas calcificantes, demostrando su inocuidad sobre paredes arteriales no dañadas. Además, para reforzar el análisis de resultados se utilizó un grupo control quirúrgico, sometido a un daño intimal similar al grupo tratado, pero al que se le perfundió una solución con idéntico volumen de suero fisiológico limpio. El empleo de este placebo quirúrgico fue esencial en el diseño experimental por la necesidad de excluir los resultados falsamente positivos¹⁷⁶.

B.3.1. Área de Neoíntima.

El Área de Neoíntima mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo-B, tratado con nanopartículas calcificantes, y los grupos A y C. Dado que el daño intimal inducido experimentalmente fue similar entre los tres grupos y los niveles de colesterol permanecieron estables, estos hallazgos sugieren que la respuesta hiperplásica se encuentra intensificada por la exposición a las nanopartículas calcificantes. Esta respuesta parece revertida en parte por la administración de atorvastatina, que mediante su efecto pleiotrópico inhibe la exacerbación intimal, haciéndola significativamente menor que la del grupo no tratado con Atorvastatina (Grupo-B).

No obstante, no pueden sacarse conclusiones útiles basándonos únicamente en este parámetro, ya que el análisis del área de neoíntima de forma aislada no tiene en cuenta el factor corrector del tamaño de la arteria tratada¹⁶⁷⁻¹⁷¹.

B.3.2. Área de capa media.

Nuestro estudio mostró que el Área de capa media, independientemente del tratamiento aplicado, no se modificó entre los diferentes grupos. Este dato sugiere que el modelo experimental de daño intimal controlado con balón de angioplastia no altera esta estructura histológica de los vasos arteriales. La respuesta a corto plazo parece limitada exclusivamente a la neoíntima.

B.3.3. Ratio de área de íntima/media.

En la medida que la capa media no sufrió alteraciones significativas, este ratio mostró alteraciones dependientes del engrosamiento intimal, siendo, por tanto, superior cuanto mayor hiperplasia intimal se promoviera. Así, este valor se multiplicó en el grupo-B (1.81) con respecto al grupo control A (0.38) y también se duplicó con respecto al grupo-C tratado con atorvastatina (0.89). Dado que todos los grupos fueron sometidos a idéntica intervención para estimular la activación del endotelio y se expusieron a la misma dosis de colesterol en la dieta, el único factor diferencial que puede justificar la exacerbación de la respuesta al daño es el tratamiento con nanopartículas calcificantes, si bien dicho efecto parece ser neutralizado en parte por la acción terapéutica de las estatinas. Queda por esclarecer cual es el mecanismo fisiopatológico responsable. La teoría más aceptada

actualmente defiende una activación de la propia inmunidad del individuo inducida por ciertos compuestos presentados por las nanopartículas que potenciaría la respuesta inmunológica celular y la mediada por quimiotácticos^{10, 24, 28, 29}. Además, se puede observar, pese a la tendencia a la aceleración del daño arterial observada en el grupo B, que el grado de respuesta varía según el individuo, lo que podría corroborar una interacción entre el estímulo contaminante y la capacidad inmunológica de cada animal¹⁰.

Sin embargo, este efecto potenciador de la respuesta intimal por parte de las nanopartículas calcificantes fue contrarrestado, como hemos señalado, con el tratamiento posterior con atorvastatina. La mayoría de los estudios sostienen que la atorvastatina tiene un efecto estabilizador de la evolución de la aterosclerosis actuando a dos niveles: disminuyendo las cifras de colesterol plasmático y LDL, y frenando la reacción inflamatoria, fundamentalmente mediante la actuación sobre la migración y proliferación de células musculares lisas^{175, 177}. Si tenemos en cuenta que los niveles de colesterol no fueron diferentes entre los distintos grupos, el efecto de la atorvastatina podría deberse a su acción moduladora de la inflamación. Este hallazgo corrobora la teoría defendida por numerosos autores sobre los efectos vasculares directos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa^{148, 150}.

B.3.4. Ratio de Estrechamiento de la luz (ELR).

Ratio de Estrechamiento de la luz (ELR) fue significativamente mayor en el grupo-B (0.926) con respecto al control A (0.282), presentando en el grupo-C un valor intermedio (0.605). Este hallazgo puede ser explicado como resultado de una cierta estabilización de la placa producida por la

Atorvastatina^{178, 179}, aunque las diferencias entre los pares B/C y los grupos C/A no llegan a ser significativas, posiblemente por lo reducido de la muestra.

B.4. CALCIFICACIÓN.

Analizando la presencia de calcificaciones en las muestras histológicas, se observó que éstas tan sólo estuvieron presentes en los grupos tratados con nanopartículas calcificantes, siendo la tasa del 57% en el grupo-B (4 casos de 7) y del 28.5% en el grupo-C (2 casos de 7). El grupo control A, por el contrario, no mostró ningún tipo de calcificación a pesar de sufrir el mismo daño intimal. La diferencia entre los grupos fue estadísticamente significativa (Razón de Verosimilitud $p=0.027$).

Si los datos se agrupan, de modo que comparamos los animales tratados con nanopartículas (grupos-B y C) frente a los animales del grupo control (grupo-A), observamos que las diferencias fueron también significativas ($p= 0.050$). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que las nanopartículas pueden contribuir al desarrollo de calcificaciones patológicas dentro de los vasos arteriales. En esta ocasión, sin embargo, la exposición terapéutica a atorvastatina (a diferencia de la hiperplasia intimal) no parece que proteja completamente de la formación de nidos de calcio, si bien la respuesta se encuentra disminuida (28.5% vs 57%), tal vez por ese efecto pleiotrópico inhibitorio de la inflamación inducido por las estatinas.

C) RESÚMEN DE LA DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

El presente estudio confirma y cuantifica la capacidad de la exposición a nanopartículas calcificantes de acelerar la aterosclerosis en un modelo animal de daño intimal en el conejo. Aunque existen estudios que evidencian la relación causal de otros patógenos infecciosos en el desarrollo de aterosclerosis ^{10, 180} nuestro estudio es el primero que analiza la implicación de un agente exógeno en la génesis de calcificaciones arteriales.

De acuerdo con nuestros resultados, la exposición a nanopartículas calcificantes parece acelerar el proceso de hiperplasia intimal iniciado por el estímulo del traumatismo arterial inducido mediante la angioplastia.

El mecanismo de acción que desencadena este efecto no está claro. Dada la demostrada relación de las nanopartículas con la inducción de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias como la artritis ⁶⁵, el mecanismo que proponemos es la exacerbación del proceso inflamatorio arterial.

Además se demuestra que la Atorvastatina tiene la capacidad de prevenir el proceso acelerado de aterosclerosis anteriormente descrito. El efecto “estabilizador de la placa” ¹⁵⁰ y “antiinflamatorio” de este medicamento sería el responsable de dicha acción ¹⁴⁸.

Por otro lado, el presente estudio evidencia la relación causal entre las nanopartículas calcificantes y la aparición de calcificaciones arteriales.

Las calcificaciones producidas en el organismo suelen estar compuestas de la llamada “*Apatita Biológica*”, dado que se componen no solo de hidroxiapatita, cuya fórmula es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sino que también contiene otros iones, sobre todo carbonato, pero se hayan trazas de HPO_4^{-2} , Cl^- , and F^- y en menor medida Mg^{-2} , Na^- y Fe^{-261} . Existe una relación muy

estrecha entre la aparición de calcificaciones patológicas y la inflamación, prueba de ello es que se han detectado en procesos inflamatorio/inmunológicos reactivos del organismo como tras la implantación de lentes oculares y de prótesis mamarias^{181, 182}. Se han presentado así mismo calcificaciones en implantes cardiovasculares, como válvulas cardíacas, asistencias ventriculares u homoinjertos aórticos⁶¹. Además, se ha relacionado la calcificación de estructuras vasculares con la decalcificación a nivel óseo (*calcificación paradójica*)^{76, 80}, todo ello mediado a nivel molecular por células inflamatorias que adquieren funciones de las células generadoras y remodeladoras del hueso, mediante la secreción de citoquinas que están presentes en el proceso de la aterosclerosis^{76, 80, 183}.

La formación del cristal de hidroxiapatita al parecer comienza con un núcleo o *nidi* a partir del cual, en presencia de los componentes en solución en las concentraciones adecuadas, y en ausencia de inhibidores, la aposición continúa⁶¹. La capacidad de las nanopartículas de construir una coraza de calcificada en condiciones fisiológicas de pH y concentración de minerales similar a la hallada en el organismo⁶¹, sugieren a estos agentes como posibles desencadenantes de las calcificaciones patológicas vasculares. Además su ubicuidad en el humano y su perfil infeccioso-contagioso, pese a no ser patógenos de características habituales, condicionan la sospecha de que pudieran tratarse del nexo de unión entre los procesos de infección, inflamación-respuesta inmunológica y calcificación-empeoramiento del pronóstico de la aterosclerosis. De modo análogo a lo que ocurre en el riñón, las nanopartículas se comportarían como *nidi* de apatita *transportables* a través del torrente sanguíneo hacia los focos de inflamación aterosclerosa⁵⁹.

La inicialmente llamada *nanobacteria* es una estructura microscópica con capacidad calcificante, en forma de microorganismo de pared celular análogo a bacterias, de tamaño mucho menor a lo generalmente aceptado para el límite inferior para la estos microorganismos (200 a 300 nm de diámetro). Por este motivo, y porque no cumplen las habituales premisas para ser considerados seres vivos han sido recientemente rebautizadas como “nanopartículas calcificantes” (calcifying nanoparticles)⁶⁵.

Pese a esta dificultad en su clasificación, las nanopartículas se relacionan con diversas enfermedades en el humano. Según los Postulados de Koch, para demostrar la causalidad de una enfermedad por un agente infeccioso se deben cumplir los siguientes requisitos:

1. El agente patógeno debe ser identificado en el tejido enfermo.
2. El agente no debe aparecer en otra enfermedad de manera fortuita o saprófita.
3. El agente debe ser aislado en un cultivo puro a partir de las lesiones de la enfermedad.
4. El agente inoculado en un animal de experimentación debe reproducir la enfermedad.

Las nanopartículas se han aislado a partir de tejidos patológicos humanos en las siguientes enfermedades: riñón poliquístico¹⁸⁴, cáncer de ovario¹⁸⁵ y cuerpos de psammoma⁶⁹, litiasis biliar¹⁸⁶ y renal^{187, 188}, litiasis testicular⁷⁰, enfermedad periodontal^{189 71}. En el sistema cardiovascular, se han aislado nanopartículas a partir de válvulas cardíacas calcificadas^{63, 72-75, 138}, así como en paredes de aneurismas calcificados, placas arteriales carotídeas, aórticas y femorales^{63, 66}.

El aislamiento de nanopartículas en las placas calcificadas de individuos con aterosclerosis, supone el punto de partida para su correlación con la patogénesis de la enfermedad, si bien para cumplir el segundo postulado de Koch, no deberían ser identificadas en aquellos especímenes de placas de ateroma no calcificadas⁶⁶. Este aspecto no ha sido analizado en el presente trabajo, en cuanto que se utilizaron cultivos procedentes de muestras humanas con calcificación severa, lo que representa una línea de investigación para futuros estudios.

La reproducción de la enfermedad mediante inoculación en un modelo animal se consiguió en un primer momento mediante inyección directa en el órgano a nivel de la vesícula biliar y el riñón^{187, 190}. En nuestro caso, la infusión sistémica de un preparado que contenía nanopartículas calcificantes produjo la reproducción de lesiones vasculares caracterizadas por hiperplasia intimal y contenido en microcalcificaciones. No obstante, no todos los animales expuestos reprodujeron la enfermedad. Esta variabilidad puede ser explicada por varias causas. En primer lugar, desconocemos la concentración de nanopartículas por volumen administrado, dado que éstas no fueron cuantificadas y se extrajeron de cultivos diferentes¹³⁷. Esta falta de uniformidad en la calidad de las colonias puede justificar el que hubiese preparados con niveles de nanopartículas deficientes que pudieran inducir una menor respuesta inflamatoria. Por otra parte, la inoculación sistémica del preparado, a diferencia de la inoculación “intraórgano”, permite que factores endógenos del animal, como la propia respuesta inmunológica actúe de manera diferente de unos individuos a otros, condicionando la exposición del tejido lesionado al patógeno. Finalmente, otros factores genéticos, ambientales y físico-químicos pueden estar involucrados en la capacidad para producir acúmulos de apatita biológica de unos animales a otros.

Otro aspecto de controversia es el tiempo transcurrido desde la inoculación del preparado de nanopartículas calcificantes hasta el sacrificio del animal. Aunque la mayoría de los trabajos de experimentación animal consideran suficientes 28 días para valorar el grado de hiperplasia intimal tras una lesión en la pared arterial^{167-169, 191}, un mayor tiempo de latencia o la necesidad de exposiciones repetidas a estos agentes pueden repercutir en la patogenia de la calcificación arterial¹⁰. Es decir, creemos que cuanto mayor tiempo de evolución transcurra entre la exposición a las nanopartículas y la recolección de las muestras, mayor será la intensidad de las lesiones observadas, ya que el metabolismo lento de estas nanopartículas dificulta el proceso de regeneración.

Existe una ardua discusión sobre si las nanopartículas son simples conglomerados de hidroxapatita sin vida o si se comportan como un verdadero agente infeccioso. El no cumplimiento de todos los postulados de Koch, además de la no demostración de DNA propio hacen dudar de su carácter como microorganismos. No obstante, para algunos autores, la reacción con anticuerpos monoclonales y su crecimiento más óptimo a 37^o⁶⁶, sus efectos citotóxicos¹⁹², su sensibilidad a ciertos citostáticos⁵⁵, inclinan la balanza hacia la segunda opción⁵⁴.

D) LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

A pesar del escaso número de animales vivos analizados, nuestro estudio presenta un mayor tamaño muestral y amplía las conclusiones con respecto a investigaciones similares publicadas con anterioridad ¹³⁷, demostrando el potencial de la exposición a nanopartículas para acelerar el proceso de aterosclerosis y sugiriendo su relación con la calcificación arterial.

El diseño controlado con placebo, y la interpretación ciega de los resultados por parte del patólogo garantizan la objetividad de las conclusiones. No obstante, hubiera sido deseable ampliar el tamaño para aumentar la potencia del estudio.

Pese a que la suplementación con colesterol en la dieta de los conejos fue baja (0.25%) y uniforme en todos los animales, no podemos determinar si las nanopartículas pueden inducir el efecto potenciador en ausencia de colesterol. Los mecanismos celulares y moleculares por los que las nanopartículas producen el efecto potenciador de la hiperplasia e inductor de calcificaciones no está definido. Asimismo, el mecanismo de acción que produce el efecto protector de la Atorvastatina sobre la hiperplasia intimal, puede ser sospechado, pero no probado por nuestro estudio. La dosis óptima y la duración del tratamiento pueden no ser suficientes.

Para afirmar definitivamente la relación causa-efecto entre la presencia de nanopartículas y la calcificación arterial sería necesario ampliar los estudios en humanos. Sería importante definir cómo se comporta la calcificación arterial en ausencia, presencia y según el título de anticuerpos o cantidad de nanopartículas presentes en el organismo. En éste sentido y referido a la calcificación de válvulas cardíacas, Ertas et al. concluyen en su

estudio que los títulos de anticuerpos contra nanopartículas son mayores en aquellos individuos que presentan calcificación de la válvula aórtica con respecto a los controles, y que existe una relación significativa entre los títulos de anticuerpos y el grado de calcificación valvular ¹⁹³. Estudios recientes correlacionan asimismo el título de anticuerpos Anti-nanopartículas calcificantes con el *score* de calcio coronario, y lo presentan como factor de riesgo independiente para la aparición de calcificación arterial coronaria ¹⁹⁴.

Finalmente, debemos recordar que el modelo de aterosclerosis en conejo no es idéntico a los que realmente se produce en la enfermedad humana, y que todas las extrapolaciones que se hagan deben ser tomadas con moderación y confirmadas mediante estudios clínicos.

E. FUTUROS ESTUDIOS.

1. Análisis y cultivo de placas de ateroma calcificadas y *no calcificadas* para demostrar la presencia o ausencia de nanopartículas.
2. Estudio del fenómeno de calcificación paradójica en humanos como explicación biológica molecular de la calcinosis arterial.
3. Estudios con mayor tamaño muestral y tiempo de latencia entre la inoculación/extracción de las muestras, intentando demostrar la presencia de nanopartículas en las microcalcificaciones arteriales inducidas (4º postulado de Koch).

VII. CONCLUSIONES

1. La administración parenteral de una solución de nanopartículas calcificantes, en un modelo experimental de daño intimal en el conejo, produce una estimulación del daño parietal que se traduce en un aumento significativo de hiperplasia intimal y la presencia de microcalcificaciones.
2. La presencia de microcalcificaciones arteriales tan sólo se detectaron en aquellos animales expuestos a nanopartículas, lo que sugiere una relación de causalidad dado el diseño experimental con grupo control y la homogeneidad analítica de la muestra.
3. El tratamiento postoperatorio con atorvastatina, mediante su efecto pleiotrópico, inhibe la exacerbación intimal inducida por nanopartículas.
4. A diferencia de la hiperplasia intimal, el tratamiento con atorvastatina no protege completamente de la formación de microcalcificaciones cuando los animales fueron expuestos a nanopartículas.
5. La administración endovenosa de una solución con nanopartículas calcificantes demostró su inocuidad sobre paredes arteriales sanas.
6. Dado que el área de capa media, independientemente del tratamiento aplicado, no se modificó entre los diferentes grupos,

este dato sugiere que el modelo experimental no altera esta estructura histológica en los vasos arteriales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present: the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Archiv*. 2006;449(1):96-103.
2. Strasses H. Atherosclerosis y cardiopatía coronaria: la contribución de la Epidemiología. *Crónica de la OMS*. 1972;26(1):7-12.
3. Rokitansky K. A Manual of Pathological Anatomy. Vol 4. London: Sydenham Society; 1852. p. 271-273.
4. Woolf N. Thrombosis and Atherosclerosis. *Br Med Bull*. 1978;34(2):137-142.
5. Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus Formation on Atherosclerotic Plaques: Pathogenesis and Clinical Consequences. *Ann Intern Med*. 2001;134(3):224-238.
6. Virchow R. Phlogose und thrombose im gefasssystem. In: Virchow R. Ed. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Berlin: Meidinger Sohn and Co; 1856. p. 458-463.
7. Le Grand B, Vié B, Fauré P, Degryse A-D, Mouillard P, John GW. Increased resistance to ischaemic injury in the isolated perfused atherosclerotic heart of the cholesterol-fed rabbit. *Cardiovasc Res*. 1995;30(5):689-696.
8. Anitschkow N CS. Über experimentelle cholesterinämie und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentralbl Allg Pathol Anat* 1913;24:1.
9. Buzzi A. ¿Etiología de la arterioesclerosis o aterosclerosis? *Revista argentina de cirugía cardiovascular*. 2004;Vol II:Nº3.

10. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, Carlquist JF. Infection With *Chlamydia pneumoniae* Accelerates the Development of Atherosclerosis and Treatment With Azithromycin Prevents It in a Rabbit Model. *Circulation*. 1998;97(7):633-636.
11. Prasad A, Zhu J, Halcox JPJ, Waclawiw MA, Epstein SE, Quyyumi AA. Predisposition to Atherosclerosis by Infections. *Circulation*. 2002;106(2):184-190.
12. Makris GC, Makris MC, Wilmot VC, Geroulakos G, Falagas ME. The Role of Infection in Carotid Plaque Pathogenesis and Stability: The Clinical Evidence. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8(6):861-872.
13. Powell J. Vascular Biology. In: Hallet JW, Earnshaw JJ, Reekers JA, eds. *Comprehensive Vascular and endovascular surgery*. Toronto: Mosby; 2004: p. 9-15.
14. Wixon CL. Hemodynamics. In: : Hallet JW, Earnshaw JJ, Reekers JA, eds. *Comprehensive Vascular and endovascular surgery*. Toronto: Mosby; 2004: p. 33-43.
15. Xu Q. Atherosclerosis. In: R. Fitridge MT, ed. *Mecanismos de la enfermedad vascular. Texto para cirujanos vasculares*. Barcelona: Ars Medica; 2009: p. 81-96.
16. Chobanian AV, Lichtenstein AH, Nilakhe V, Haudenschild CC. Influence of hypertension on aortic atherosclerosis in the Watanabe rabbit. *Hypertension*. 1989;14:203-209.
17. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1370-1380.
18. Fogelstrand P, Mellander S, Mattsson E. Increased Vascular Injury Reduces the Degree of Intimal Hyperplasia following Angioplasty in Rabbits. *J Vasc Res*. 48(4):307-315.

19. Epstein SE, Zhou YF, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation*. 1999;100:20-28.
20. Shattuck BE. Lecture- Cardiovascular medicine at the turn of the millennium: Triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med*. 1997;337:1360-1369.
21. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med*. 1978;148:335-340.
22. Fabricant CG, Hajjar DP, Minnick CR, Fabricant J. Herpesvirus infection enhances cholesterol and cholesteryl ester accumulation in cultured arterial smooth muscle cells. *J Am J Pathol*. 1981;105:176-184.
23. Hajjar DP, Fabricant GC, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. Herpesvirus infection alters aortic cholesterol metabolism and accumulation. *J Am J Pathol*. 1986;122:62-70.
24. Gurfinkel EP. Infección y aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:383-392.
25. Grayston JT, Kuo CC, Wang S, Altman J. A new *Chlamydia psittacii* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med*. 1986;315:161-168.
26. Chiu B, Viira E, Tucker W, Fong IW. *Chlamydia Pneumoniae*, Cytomegalovirus, and Herpes Simplex Virus in Atherosclerosis of the Carotid Artery. *Circulation*. 1997;96(7):2144-2148.
27. Anestad G, Scheel O, Hungnes O. Chronic infection and coronary artery disease. *Lancet*. 1997;350:1028.
28. Epstein SE, Speir E, Zhou YF, Guetta E, Leon M, Finkel T. The role of infection in restenosis and atherosclerosis: focus on cytomegalovirus. *Lancet*. 1996;348:S13-S16.

29. Speir E, Modali R, Huang ES. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. 1994;265:391-394.
30. Kereiakes DJ. Adjunctive Pharmacotherapy before Percutaneous Coronary Intervention in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: The Role of Modulating Inflammation. *Circulation*. 2003;108(16 suppl 1):III-22-III-27.
31. Inoue T, Kato T, Uchida T, Sakuma M, Nakajima A, Shibasaki M, et al. Local Release of C-Reactive Protein From Vulnerable Plaque or Coronary Arterial Wall Injured by Stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(2):239-245.
32. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994. 1994;94:2493-2503.
33. Sidawy AN, Mitchell ME. Basic considerations of the arterial wall in health and disease. In: Rutherford RB, ed. *Rutherford Vascular Surgery*. Vol 1. Philadelphia: Saunders Company; 2000. p. 60-73.
34. Ross R. Atherosclerosis. An Inflammatory Disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126.
35. Salomon RN, Hughes CC, Schoen FJ. Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis: Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:791-798.
36. Zarins CK, Glagov S. Artery wall pathology in atherosclerosis. In: Rutherford RB, ed. *Rutherford Vascular Surgery*. Vol 1. Philadelphia: Saunders Company; 2000. p. 313-333.
37. Bomberger RA, Zarins CK, Glagov S. Subcritical arterial stenosis enhances distal atherosclerosis. *J Surg Res*. 1981;30(3):205-212.

38. Malinow MR. Experimental models of atherosclerosis regression. *Atherosclerosis*. 1983;48(2):105-118.
39. Cozzi PJ, Lyon RT, Davis HR. Aortic wall metabolism in relation to susceptibility and resistance to experimental atherosclerosis. *J Vasc Surg*. 1988;7:706.
40. Hatsukami TS, Ferguson MS, Beach KW, Gordon D, Detmer P, Burns D, et al. Carotid plaque morphology and clinical events *Stroke*. 1997;28:95-100.
41. Jonhson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, and Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1994;144:952-961.
42. Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, and Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in humen atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1992;141:1427-1433.
43. Husain T, Abott CR, Scott JA, Gough MJ Macrophage accumulation within the cap of carotid atherosclerotic plaques is associated with the onset of cerebral ischemic events. *J Vasc Surg*. 1999;30:269-276.
44. Alvarez B, Ruiz C, Chacon P, Alvarez J, Matas M. High sensitivity C reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for instable carotid plaque. *J Vasc Surg* 2003;38:1018-1024.
45. Carr S, Farb A, Pearce WH, Virmini R, Yao JST. Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*. 1996;23:755-766.
46. Feeley TM, Leen EJ, Colgan MP, Moore GJ, Hourihane D, Shanik GD. Histologic characteristics of carotid artery plaque. *J Vasc Surg*. 1991;13: 719-724.
47. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000;31:774-781.

48. O'Brien KD, McDonald TO, Chait AA, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cells adhesion molecule-1 in human atherosclerotic and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*. 1996;93:672-682.
49. Bassiouny HS, Davies H, Masawa N, Gewertz BL, Glagov S, Zarins CK. Critical carotid stenoses: morphologic and chemical similarity between symptomatic and asymptomatic plaques. *J Vasc Surg*. 1989;9:202-212.
50. Loftus IM, Naylor AR, Bell PRF, Thompson MM. Plasma MMP-9 a marker of carotid plaque instability. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001;21:12-21.
51. Kajander E. Culture and detection method for sterile-filterable autonomously replicating biological particles. *US patent*. 1992;No 5 135(851):pp 1-16.
52. Kajander EO, Kuronen I, Akerman KK, Pelttari A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood: the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth, 1997. *Proc. SPIE* 3111, 420.
53. Kajander EO, Pelttari A, Ciftcioglu N. Fine Nanobacteria from blood: the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. In: RB H, ed. *Conference 3111: Instrumentes, methods, and missions for the investigation of extraterrestrial microorganisms* San Diego: *Proc SPIE*; 1997:420-428.
54. Kutikhin AG BE, Yuzhalin AE. The role of calcifying nanoparticles in biology and medicine. *Intern J Nanomed*. 2012;7:339-350.
55. Kajander EO, Çiftçioglu N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(14):8274-8279.

56. Cisar JO, Xu D-Q, Thompson J, Swaim W, Hu L, Kopecko DJ. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(21):11511-11515.
57. McKay DS GE, Thomas-Keprta KL, Vali H, et al. Meteorite Yields Evidence of Primitive Life on Early Mars. *Science*. 1996;273:924-930.
58. Kajander EO, Çiftçioğlu N, Aho K, Garcia-Cuerpo E. Characteristics of nanobacteria and their possible role in stone formation. *Urol Res*. 2003;31(2):47-54.
59. Çiftçioğlu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int*. 1999;56(5):1893-1898.
60. Çiftçioğlu N MD, Mathew G, Kajander O. Nanobacteria: fact or Fiction? Characteristics, detection, and medical importance of novel self-replicating, calcifying nanoparticles. *J Invest Med*. 2006;54:385-394.
61. Çiftçioğlu N, McKay DS. Pathological Calcification and Replicating Calcifying-Nanoparticles: General Approach and Correlation. *Pediatr Res*. 67(5):490-499.
62. Çiftçioğlu N, Akerman K, Hiltunen E, Laukkanen J, Kajander EO. A New Potential Threat in Antigen and Antibody Products: Nanobacteria. In: Brown F BB, Dogherty P, Mecalanos J, Norrby E, ed. *Vaccines 97: Molecular approaches to the control of infectious diseases*: Cold Spring Harbour Lab. Press; 1997:93-103.
63. Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, et al. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *AJP - Heart*. 2004;287(3):H1115-H1124.

64. Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, Swaim W, Hu L. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Procc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:11511-11515.
65. Kajander EO. Nanobacteria – propagating calcifying nanoparticles. *Lett Appl Microbiology*. 2006;42(6):549-552.
66. Puskás LG, Tiszlavicz L, Rázga Z, Torday LL, Krenács T, Papp JG. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques. *Acta Biol Hung*. 2005;56(3):233-245.
67. Akerman KK, Kuikka JK, Çiftçioglu N, Parkkinen J, Bergstrom KA, Kuronen I, Kajander EO. Radiolabeling and in vivo distribution of nanobacteria in rabbit. *PROC. SPIE 3111*. 1997;436.
68. Çiftçioglu N, Kajander EO. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. *Pathophysiology*. 1998;4:259-270.
69. Pasquinelli G, Papadopulos F, Nigro M. Nanobacteria and Psammoma Bodies: Ultrastructural Observations in a Case of Pathological Placental Calcification. *Ultrastruct Pathol*. 2010;34(6):344-350.
70. Zhang QH, Lu GS, Shen XC, Zhou ZS, Fang Q, Zhang X, et al. Nanobacteria May Be Linked to Testicular Microlithiasis in Infertility. *J Androl*. 2010;31(2):121-125.
71. Zhang SM, Tian F, Jiang XQ, Li J, Xu C, Guo XK, Zhang FQ. Evidence for Calcifying Nanoparticles in Gingival Crevicular Fluid and Dental Calculus in Periodontitis. *J Periodontol*. 2009;80(9):1462-1470.
72. Piper C DJ, Kleesiek K, Körfer R, Horstkotte D. Nanobacteria to promote degenerative aortic valve stenosis? *J Heart Valve Dis*. 2006;15:499-501.

73. Jelic TM, Malas AM, Groves SS, Jin B, Mellen PF, Osborne G, et al. Nanobacteria-caused Mitral Valve Calciphylaxis in a Man with Diabetic Renal Failure. *South Med J*. 2004;97(2):194-198.
74. Jelic TM, Chang HH, Roque R, Malas AM, Warren SG, Sommer AP. Nanobacteria-Associated calcific Aortic Valve Stenosis. *J Heart Valve Dis*. 2007;16:101-105.
75. Bratos-Perez MA, Sanchez PL, Garcia de Cruz S, Villacorta E, Palacios IF, Fernandez-Fernandez JM, et al. Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification. *Eur Heart J*. 2008;29(3):371-376.
76. Persy V, D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends Mol Med*. 2009;15(9):405-416.
77. Demer LL, Tintut Y. Vascular Calcification. *Circulation*. 2008;117(22):2938-2948.
78. New SE, Aikawa E. Cardiovascular calcification. An inflammatory disease. *Circ J*. 2011;75:1305-1313.
79. Wallin R, Wajih N, Greenwood T, Sane D. Arterial calcification: A review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev*. 2001;21(4):274-301.
80. London GM. Soft Bone - Hard Arteries: A Link?. *Kidney Blood Press Res*. 2011;34:203-208.
81. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1731-1740.
82. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular Calcification. *Circ Res*. 2006;99(10):1044-1059.

83. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(7):1161-1170.
84. Cheng GC, Loree HM, Kamm RD, Fishbein MC, Lee RT. Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation. *Circulation.* 1993;87(4):1179-1187.
85. Cohen A, Tzourio C, Bertrand B, Chauvel C, Bousser MG, Amarenco P. Aortic Plaque Morphology and Vascular Events : A Follow-up Study in Patients With Ischemic Stroke. *Circulation.* 1997;96(11):3838-3841.
86. O'Rourke RA, Brundage BH, Froelicher VF, Greenland P, Grundy SM, Hachamovitch R, et al. American College of Cardiology/American Heart Association expert consensus document on electron-beam computed tomography for the diagnosis and prognosis of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(1):326-340.
87. Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. *Pathophysiology.* 2004;11:95-101.
88. New SE, Aikawa E. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ Res.* 2011;108(11):1381-1391.
89. Kadoglou NPE, Gerasimidis T, Golemati S, Kapelouzou A, Karayannacos PE, Liapis CD. The relationship between serum levels of vascular calcification inhibitors and carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg.* 2008;47(1):55-62.
90. Vik A, Mathiesen EB, Noto AT, Sveinbjornsson B, Brox J, Hansen JB. Serum osteoprotegerin is inversely associated with carotid plaque echogenicity in humans. *Atherosclerosis.* 2007;191(1):128-134.

91. Quercioli A, Montecucco F, Bertolotto M, Ottonello L, Pende A, Mach F, Dallegri F. Coronary artery calcification and cardiovascular risk: the role of RANKL/OPG signalling. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(7):645-654.
92. Ziegler S, Kudlacek S, Luger A, Minar E. Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease. *Atherosclerosis*. 2005;182(1):175-180.
93. Ueland T, Yndestad A, Øie E, Florholmen G, Halvorsen B, Frøland SS, et al. Dysregulated Osteoprotegerin/RANK Ligand/RANK Axis in Clinical and Experimental Heart Failure. *Circulation*. 2005;111(19):2461-2468.
94. Sandberg WJ, Yndestad A, Øie E, Smith C, Ueland T, Ovchinnikova O, et al. Enhanced T-Cell Expression of RANK Ligand in Acute Coronary Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(4):857-863.
95. Crisafulli A, Micari A, Altvilla D, Saporito F, Sardella A, Passaniti M. Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with ST elevation acute myocardial infarction. *Clin Sci*. 2005;109:389-395.
96. Nybo M, Rasmussen LM. The capability of plasma osteoprotegerin as a predictor of cardiovascular disease: a systematic literature review. *Eur J Endocrinol*. 2008;159(5):603-608.
97. Straface G, Biscetti F, Pitocco D, Bertoletti G, Misuraca M, Vincenzoni C, et al. Assessment of the Genetic Effects of Polymorphisms in the Osteoprotegerin Gene, TNFRSF11B, on Serum Osteoprotegerin Levels and Carotid Plaque Vulnerability. *Stroke*. 2011;42(11):3022-3028.
98. Ernst E. Chelation Therapy for Peripheral Arterial Occlusive Disease: A Systematic Review. *Circulation*. 1997;96(3):1031-1033.
99. Ernst E. Chelation therapy for coronary artery disease: An overview of all clinical investigations. *Am Heart J*. 2000;140:4-5.

100. Adams A, Pepping J. Vitamin K in the treatment and prevention of osteoporosis and arterial calcification. *Am J Health-Syst Pharm* 2005;62:1574-1581.
101. Price PA FS, Williamson MK. Bisphosphonates Alendronate and Ibandronate Inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:817-824.
102. Calister TQ, Raqqi P, Cooil B, Lippolis NJ, Russo DJ. Effect of HMG-CoA reductasa inhibitors on coronary artery disease as assessed by electron-beam computed tomography. *N Engl J Med*. 1998;339:1972-1978.
103. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*. 2001;5(4):378-387.
104. Bellosto S, Fed N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med*. 2000;32(3):164-176.
105. Oda S, Nagahama R, Nakano K, Matoba T, Kubo M, Sunagawa K, et al. Nanoparticle-mediated endothelial cell-selective delivery of pitavastatin induces functional collateral arteries (therapeutic arteriogenesis) in a rabbit model of chronic hind limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2010;52(2):412-420.
106. Davignon J. Beneficial Cardiovascular Pleiotropic Effects of Statins. *Circulation*. 2004;109(23 suppl 1):III-39-III-43.
107. Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ. Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2001;49(2):281-287.
108. Takayama T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Fujii M, Isono T, Horie M. Contribution of vascular NAD(P)H oxidase to endothelial dysfunction in heart failure and the therapeutic effects of HMG-CoA reductase inhibitor. *Circ J*. 2004;68(11):1067-1075.

109. Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, et al. HMG-CoA reductase inhibitor by Atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *JACC*. 1998;32:2057-2064.
110. Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, Stone NJ, Springett M, Ignatiev KI, et al. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart*. 2005;91(6):806-810.
111. Nawawi H, Osman NS, Yosoff K, Khalid AK. Reduction in Serum Levels of Adhesion Molecules, Interleukin-6 and C-reactive Protein Following Short-term Low-dose Atorvastatin Treatment in Patients with Non-familial Hypercholesterolemia. *Horm Metab Res*. 2003;35:479-485.
112. Baetta R, Donetti E, Comparato C, Calore M, Rossi A, Teruzzi C, et al. Proapoptotic effect of Atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells. *Pharmacol Res*. 1997;36:115-121.
113. Erl W. Statin-induced vascular smooth cell apoptosis: a possible role in the prevention of restenosis? *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5:135-144.
114. Zhou G, Ge S, Liu D, Xu G, Zhang R, Yin Q, et al. Atorvastatin reduces plaque vulnerability in an atherosclerotic rabbit model by altering the 5-Lipoxygenase pathway. *Cardiology*. 2010;115:221-228.
115. Asahi M, Huang Z, Thomas S, Yoshimura S, Sumii T, Mori T, et al. Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:722-729.
116. Rajamannan NM, Subramaniam M, Caira F, Stock SR, Spelsberg TC. Atorvastatin Inhibits Hypercholesterolemia-Induced Calcification in the Aortic Valves via the Lrp5 Receptor Pathway. *Circulation*. 2005;112(9 suppl):I-229-I-234.

117. Liebe V BM, Borggreffe M, Kaden JJ. Statin therapy of calcific aortic stenosis: hype or hope? *Eur Heart J.* 2006;27:773-778.
118. Koniari IC, Tsamis K, Apostolakis E. Simvastatin inhibits aortic valve calcification in hypercholesterolemic rabbits. *Interact CardioVasc Thorac Surg.*11(3):301-302.
119. Kadoglou NPE, Gerasimidis T, Moumtzouoglou A, Kapelouzou A, Sailer N, Fotiadis G, et al. Intensive Lipid-lowering Therapy Ameliorates Novel Calcification Markers and GSM Score in Patients with Carotid Stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008;35(6):661-668.
120. Kadoglou NPE, Gerasimidis T, Kapelouzou A, Moumtzouoglou A, Avgerinos ED, Kakisis JD, et al. Beneficial Changes of Serum Calcification Markers and Contralateral Carotid Plaques Echogenicity after Combined Carotid Artery Stenting Plus Intensive Lipid-lowering Therapy in Patients with Bilateral Carotid Stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;39(3):258-265.
121. Gil A RM, Aguilera M. Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2007;22(2):169-177.
122. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim.* 2004;38(3):246-256.
123. Bocan TM, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf, Brown EQ, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis.* 1993;102:9-22.
124. Harkness J, Wagner JE. *Biología y clínica de conejos y roedores.* Zaragoza. Editorial Acribia 1980. p. 23-45.
125. Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol.*15(6):318-330.

126. Ni M, Chen WQ, Zhang Y. Animal models and potential mechanisms of plaque destabilisation and disruption. *Heart*. 2009;95(17):1393-1398.
127. Ignatowski A. Influence of animal food on the organism of rabbits. *St Petersburg Izvest Imp Voyenno-Med Akad*. 1908;16: 154–176.
128. Dornas WC OT, Augusto L. Atherosclerosis experimental en conejos. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(2):272-278.
129. Holm P, Andersen HL, Arrøe G, Stender S. Gender Gap in Aortic Cholesterol Accumulation in Cholesterol-Clamped Rabbits : Role of the Endothelium and Mononuclear-Endothelial Cell Interaction. *Circulation*. 1998;98(24):2731-2737.
130. Madhumathi B VM, Gopumadhavan S, Rafiq M, Mitra S. Induction and evaluation of atherosclerosis in New Zealand white rabbits. *Indian J Exp Biol*. 2006;44:203-208.
131. Abela GS, Picon PD, Friedl SE, Gebara OC, Miyamoto A, Federman M, et al. Triggering of Plaque Disruption and Arterial Thrombosis in an Atherosclerotic Rabbit Model. *Circulation*. 1995;91:776-784.
132. Phinikaridou A, Hallock KJ, Qiao Y, Hamilton JA. A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis. *J Lipid Res*. 2009;50(5):787-797.
133. Lauson R. The comparative anatomy of circularoty system. In: Marvalee H Wake, ed. *Hyman's comparative vertebrate anatomy*. EEUU; 1992. p. 544.
134. Ding YH, Dai D, Layton KF, Lewis DA, Danielson MA, Kadirvel R, Cloft HJ, Kallmes DF. Vascular Anatomic Variation in Rabbits. *J Vasc Interv Radiol*. 2006;17(6):1031-1035.

135. Kolodgie FD, Katocs AS, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, et al. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1454–1464.
136. Spagnoli LG, Orlandi A, Mauriello A, Santeusano G, de Angelis C, Lucreziotti R, Ramacci MT. Aging and atherosclerosis in the rabbit: 1. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 1991;89(1):11-24.
137. Schwartz MA, Lieske JC, Kumar V, Farell-Baril G, Miller V. Human-derived nanoparticles and vascular response to injury in rabbit carotid arteries: Proof of principle. *Int J Nanomedicine* 2008;3:243–248.
138. Hu YR, Zhao Y, Sun YW, Lü WD, Liu ZL, Li JM, et al. Detection of nanobacteria-like material from calcified cardiac valves with rheumatic heart disease. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(5):286-292.
139. Piper C DJ, Kleesiek K, Körfer R, Horstkotte D. Nanobacteria to promote degenerative aortic valve stenosis?. *J Heart Valve Dis*. 2006;15(4):499-501.
140. Rekhter MD. How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis? *Cardiovas Res*. 2002;54(1):36-41.
141. Bocan T. Animal models of atherosclerosis an interpretation of drug intervention studies. *Curr Pharm des*. 1998;4:39-41.
142. Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Von-Linden J, Rapacz J. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolmia bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *Am J Pathol* 1991.139:139–147.
143. Rosenfeld MA, Polinsky P, Virmani R, et al. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2587–2592.

144. Constatinides P, Chackrabarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. *Arch Pathol.* 1961;72:197-208.
145. Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Work CW, Kim JS, Gordon D, et al. Animal Model That Mimics Atherosclerotic Plaque Rupture. *Circ Res.* 1998;83(7):705-713.
146. Gadeau AP, Chaulet H, Daret DI, Kockx M, Daniel-Lamazière JM, Desgranges C. Time Course of Osteopontin, Osteocalcin, and Osteonectin Accumulation and Calcification After Acute Vessel Wall Injury. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(1):79-86.
147. Yanni AE, Yatzidis HA, Kavantzas N, Agapitos E, Perrea D, Karayannacos PE. Nutrition. Dietary L-aspartate and L-glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbit. *Metab Cardiovasc Dis.* 2003;13:80–86
148. Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickinson T, Thompson MM, London NJM. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J Vasc Surg.* 2002;36(1):150-157.
149. Corpataux JM, Naik J, Porter KE, London NJM. A Comparison of Six Statins on the Development of Intimal Hyperplasia in a Human Vein Culture Model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29(2):177-181.
150. Bellosta S, Bernini F, Ferri N, Quarato P, Canavesi M, Arnaboldi L, et al. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis.* 1998;137, Supplement 1:S101-S109.
151. Burgstahler C, Reimann A, Beck T, Kuettner A, Baumann D, Heuschmid M, et al. Influence of a Lipid-Lowering Therapy on Calcified and Noncalcified Coronary Plaques Monitored by Multislice Detector Computed Tomography: Results of the New Age II Pilot Study. *Invest Radiol.* 2007;42(3):189-195.

152. Houslay ES, Cowell SJ, Prescott RJ, Reid J, Burton J, Northridge DB, et al. Progressive coronary calcification despite intensive lipid-lowering treatment: a randomised controlled trial. *Heart*. 2006;92(9):1207-1212.
153. McCullough PA, Chinnaiyan KM. Annual Progression of Coronary Calcification in Trials of Preventive Therapies: A Systematic Review. *Arch Intern Med*. 2009;169(22):2064-2070.
154. Gilmanov D, Bevilacqua S, Mazzone A, Glauber M. Do statins slow the process of calcification of aortic tissue valves? *Interact CardioVasc Thorac Surg*.2010;11(3):297-301.
155. Shavelle DM, Takasu J, Budoff MJ, Mao S, Zhao XQ, O'Brien KD. HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium. *Lancet*. 2002;359:1125-1126.
156. Achenbach S, Ropers D, Pohle K, Leber A, Thilo C, Knez A, et al. Influence of Lipid-Lowering Therapy on the Progression of Coronary Artery Calcification. *Circulation*. 2002;106(9):1077-1082.
157. Callister TQ, Raggi P, Cooil B, Lippolis NJ, Russo DJ. Effect of HMG-CoA Reductase Inhibitors on Coronary Artery Disease as Assessed by Electron-Beam Computed Tomography. *N Engl J Med*. 1998;339(27):1972-1978.
158. Davoud AS, Jarmolych J, Augustyn JM, Fritz Ke, Singh Jk, Lee KT. Regression of advanced atherosclerosis in swine. *Arch Pathol Lab Med*. 1976;100:372-379.
159. Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Sebo TC, Niekrazz M, McConnell JP, et al. Atorvastatin Inhibits Hypercholesterolemia-Induced Cellular Proliferation and Bone Matrix Production in the Rabbit Aortic Valve. *Circulation*. 2002;105(22):2660-2665.
160. M. H. Ross LJR. *Histología: Texto y Atlas Color*. 2ª Ed. Tlalpan, Mexico D.F.: Ed. Panamericana; 1992.

161. Gussenhoven EJ, Essed CE, Lancèe CT, Mastik F, Frietman P, van Egmond FC, et al. Arterial wall characteristics determined by intravascular ultrasound imaging: An in vitro study. *J Am Coll Cardiol.* 1989;14(4):947-952.
162. Lillie RD FH. *Connective tissue fibers and membranes.* In: *Histopathologic Technique and Practical Histochemistry.* London: Mc-Graw-Hill; 1976.
163. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Cipolla GD, King SB. Endovascular Low-Dose Irradiation Inhibits Neointima Formation After Coronary Artery Balloon Injury in Swine : A Possible Role for Radiation Therapy in Restenosis Prevention. *Circulation.* 1995;91(5):1533-1539.
164. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19(2):267-274.
165. de Korte CL, van der Steen AFW, Céspedes EI, Pasterkamp G. Intravascular Ultrasound Elastography in Human Arteries: Initial Experience In Vitro. *Ultrasound Medicine Biol.* 1998;24(3):401-408.
166. Rungby Jr, Kassem M, Eriksen E, Danscher G. The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background. *Histochem J.* 1993;25(6):446-451.
167. Feldman LJ, Aguirre L, Zioli M, Bridou JP, Nevo N, Michel J-B, Steg PG. Interleukin-10 Inhibits Intimal Hyperplasia After Angioplasty or Stent Implantation in Hypercholesterolemic Rabbits. *Circulation.* 2000;101(8):908-916.
168. Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, Yang Z, Chen M, Hesselbacher S, et al. Rosiglitazone Reduces the Accelerated Neointima Formation After Arterial Injury in a Mouse Injury Model of Type 2 Diabetes. *Circulation.* 2003;108(16):1994-1999.

169. Alessi A, Franca Neto O, Brofman P, Prim C, Noronha L, Silva R, et al. Use of rosiglitazone before and after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: Assessment of neointimal formation. *Thromb J.* 2008;6(1):12.
170. Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, et al. Local Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Reendothelialization and Attenuates Intimal Hyperplasia in Balloon-Injured Rat Carotid Artery. *Circulation.* 1995;91(11):2793-2801.
171. Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW. Estradiol Accelerates Functional Endothelial Recovery After Arterial Injury. *Circulation.* 1997;95(7):1768-1772.
172. Colyvas N, Rapp JH, Phillips NR, Stoney R, Perez S, Kane JP, Havel RJ. Relation of plasma lipid and apoprotein levels to progressive intimal hyperplasia after arterial endarterectomy. *Circulation.* 1992;85(4):1286-1292.
173. Klyachkin ML, Davies MG, Svendsen E, Kim JH, Massey MF, Barber L, et al. Hypercholesterolemia and Experimental Vein Grafts: Accelerated Development of Intimal Hyperplasia and an Increase in Abnormal Vasomotor Function. *J Surg Res.* 1993;54(5):451-468.
174. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: An overview. *Clin Cardiol.* 1991;14(S1):1-16.
175. Aydin U, Ugurlucan M, Gungor F, Ziyade S, Inan B, Banach M, Kalko Y, Yasar T. Effects of Atorvastatin on Vascular Intimal Hyperplasia: An Experimental Rodent Model. *Angiology.* 2009;60(3):370-377.
176. Heras M, Chesebro JH, Webster MW, Mruk JS, Grill DE, Penny WJ, et al. Hirudin, heparin, and placebo during deep arterial injury in the pig. The in vivo role of thrombin in platelet-mediated thrombosis. *Circulation.* 1990;82(4):1476-1484.

177. Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego Mn, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(7):2057-2064.
178. Gaddam V, Li DY, Mehta JL. Anti-thrombotic Effects of Atorvastatin- An Effect Unrelated to Lipid Lowering. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2002;7(4):247-253.
179. Bocan T. Animal models of atherosclerosis an interpretation of drug intervention studies. *Curr Pharm des*. 1998;4:45-46.
180. Hsich E, Zhou YF, Paigen B, Johnson TM, Burnett MS, Epstein SE. Cytomegalovirus infection increases development of atherosclerosis in Apolipoprotein-E knockout mice. *Atherosclerosis*. 2001;156(1):23-28.
181. Rezaei-Kanavi M JM, Mirbabaei-Ghafghazi F. Intraocular lens calcification; a clinicopathologic report. *J Ophthalmic Vis Res* 2009;4:122–124.
182. Peters W, Smith D, Lugowski S, Pritzker K, Holmyard D. Calcification properties of saline-filled breast implants. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:356–363.
183. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo J-L, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis Associates With Inflammation in Early-Stage Atherosclerosis Evaluated by Molecular Imaging In Vivo. *Circulation*. 2007;116(24):2841-2850.
184. Kajander EO, Ciftcioglu N, Miller-Hjelle MA, Hjelle JT. Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10(3):445-452.
185. Roland Sedivy WB. Nanobacteria promote crystallization of psammoma bodies in ovarian cancer. *APMIS*. 2003;111:951-954.

186. Wen Y LY, Yang Z, Wei H et al. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118:421-424.
187. Shiekh F, Khullar M, Singh S. Lithogenesis: induction of renal calcifications by nanobacteria. *Urol Res*. 2006;34(1):53-57.
188. Khullar M, Sharma SK, Singh SK, Bajwa P, Sheikh FA, Relan V, Sharma M. Morphological and immunological characteristics of nanobacteria from human renal stones of a north Indian population. *Urol Res*. 2004;32(3):190-195.
189. Turgut D. Is there any relation of nanobacteria with periodontal diseases? *Med Hypotheses*. 2008;70(1):36-39.
190. Wan L SW, et al An animal domdel of blak pigment gallstones caused by nanobacteria. *Digestive Dis Sci*. 2006;51:1126-1132.
191. Carter AJ, Farb A, Gould KE, Taylor AJ, Virmani R. The Degree of Neointimal Formation after Stent Placement in Atherosclerotic Rabbit Iliac Arteries is Dependent on the Underlying Plaque. *Cardiovasc Pathol*. 1999;8(2):73-80.
192. Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, Jones ML, et al. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2000;57(6):2360-2374.
193. Ertas FS HT, Ozdol C, Akan O, Tulunay C, Kocum T, Uysal S, Dncer I, Sahin M, Atmaca Y, Cifcioglu N, Ahop K, Kajander EO, Erol C. Association between nanobacteria and aortic valve calcification. *Eur Heart J*. 2006;27:745.
194. Tulunay Kaya C, Sinan Ertas F, Hasan T, Candemir B, Ozdol C, Arikan Akan O, et al. Anticalcifying nanoparticle antibody titer is an independent risk factor for coronary artery calcification. *Coron Artery Dis*. 2011;22(6):394-400.