

TRABAJOS ORIGINALES

PRODUCCION EXPERIMENTAL DE ATEROESCLEROSIS LOCALIZADA EN LA RATA *

por los doctores

M. R. MALINOW, D. HOJMAN y A. A. PELLEGRINO

La ateromatosis es un trastorno de la íntima arterial, que ocurre en focos delimitados y cuyo mecanismo de producción es desconocido. La enorme importancia clínica de esta afección ha motivado que innumerables investigadores traten de revelar su patogenia, con el objeto de prevenir las irreparables lesiones parenquimatosas que suceden a las lesiones arteriales de órganos tan importantes como el corazón, cerebro, riñón, etc. La producción experimental de arteriosclerosis se ha realizado desde comienzos de este siglo en el conejo^{1, 2}, animal hervíboro, mediante la administración de grandes cantidades de colesterol. Posteriormente, fué posible reproducir también ese proceso en animales omnívoros, especialmente en el pollo, estudiado en forma exhaustiva por Katz y col.³, en el perro⁴, asociando la administración de colesterol a la inhibición tiroidea, y en el mono⁵, mediante dietas pobres en piridoxina. La rata de laboratorio es también un animal omnívoro, de fácil manejo, con un corto ciclo vital y que por su manuableidad constituye un animal ideal para estos estudios. Sin embargo, la administración de colesterol, procedimiento que da resultados positivos en las especies arriba mencionadas, es consistentemente negativa en la rata⁶, a pesar que otros la asocian a la inhibición tiroidea⁷.

Con el objeto de determinar si tal refractoriedad era debida a particularidades de la pared arterial que hicieran imposible la formación de las lesiones características, hemos desarrollado un método en la rata, con el cual hemos estudiado la posibilidad de producir

* Pabellón de Cardiología "Luis H. Inchauspe", Policlínico Ramos Mejía, Bs. Aires. Jefe: Prof. Blas Moia. El Departamento de Investigaciones es parcialmente subvencionado por la Asociación Cooperadora pro Investigación Científica en el Pabellón de Cardiología Inchauspe. Los Laboratorios Squibb y la "Fundación Talleres Avón para el estudio de la arteriosclerosis", contribuyen en los estudios sobre arteriosclerosis.

Presentado ante el 4º Congreso Inter-americano de Cardiología. Buenos Aires, 1-7 de septiembre, 1952.

localmente lesiones que se asemejaran *morfológicamente* a las lesiones ateromatosas, espontáneas o provocadas, de otras especies animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

El método es semejante al ya descrito anteriormente⁸, por lo que sólo se recordará en forma breve. Se utilizaron ratas blancas * de aproximadamente 3 meses de edad, cepa Williams, destetadas a los 25 días y mantenidas con una dieta de leche y pan, suplementada por verduras frescas, carne y vitaminas complementarias. Anestesia intraperitoneal con Embutal ** sódico, 6 mg/100 g de peso. Incisión transversal suprapúbica con técnica simple pero no aséptica, que llega hasta la parte media de la arcada crural. Visualización del paquete femoral por disección roma. Dilaceración de la fascia perivascular con ayuda de dos pinzas curvas de punta aguda. Denudación de la arteria femoral en una extensión de 10 mm por debajo de la circunfleja ilíaca superficial. Se pasan por debajo de la arteria femoral tres hebras de lino fino. Se anuda la inferior para congestionar la arteria y brindar un punto de apoyo al traccionarla. Se colocan dos gotas de novocaína al 1 % localmente, para favorecer la distensión. Se introduce mediante una aguja de 0.4 mm de diámetro las soluciones que se detallan más abajo. Se anuda entonces el lazo superior mientras se introduce el líquido, con lo cual la arteria queda distendida. Se anuda entonces el cabo intermedio, colocado cerca del inferior pero por encima del sitio de punción, para evitar el reflujo del líquido inyectado.

Los líquidos inyectados han sido suspensiones coloidales de colesterol con las siguientes concentraciones: 1) 0.07 %; 2) 5 %; 3) 15 %; 4) 25 %; y suspensiones coloidales de colesterol diluidas por partes iguales con sangre oxalatada recién extraída de otra rata por punción cardíaca, a las siguientes concentraciones: 1) 5 % y 2) 25 %. El procedimiento para preparar las suspensiones de colesterol es el siguiente: Se preparan las siguientes soluciones: A) ácido láurico al 1 % en solución N. 0.10 de OH.Na; B) solución Buffer de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K} / \text{PO}_4\text{HK}_2$; $\text{pH} = 7.4$; C) colesterol al 6 % en éter sulfúrico. Para una concentración final deseada de colesterol se diluye la cantidad necesaria de C en A y luego se agrega B (A y B se emplean por partes iguales). Se mezcla en homogeneizador durante 3 minutos. Se calienta a baño-maría a 60-70°C y luego se extrae el éter sobrante por vacío. Las suspensiones se emplean frescas, no conservándose más de una semana.

Generalmente se inyectaban las mismas o distintas soluciones en ambas arterias femorales, de tal manera que un lado servía de control para el otro. Los animales fueron sacrificados escalonadamente desde pocos minutos después de la inyección hasta los 223 días, por traumatismo craneano. Los paquetes femorales fueron extraídos inmediatamente con el músculo subyacente y fijados en

*. Agradecemos al Dr. E. Savino del Instituto Bacteriológico Malbrán su gentileza de brindarnos los planteles originales y al Dr. J. M. Lascano González, del Policlínico Ramos Mejía su ayuda valiosa en el mantenimiento de los animales.

** Agradecemos a la casa Abbott habernos proporcionado generosamente el Embutal utilizado en los presentes experimentos.

formol al 10 %. Se practicó el estudio histológico por congelación de la zona de la ligadura y de la parte media del segmento comprendido entre las mismas, realizando por lo menos 4 cortes con cada una de las técnicas siguientes: Hematoxilina-eosina; método de Gallego para fibras elásticas; Sudán IV para grasas; método de Van Gieson para tejido conjuntivo y muscular; técnica de impregnación argénica para reticulina, colágena y macrófagos; polaroscopia para birrefringencia; Lieberman-Burchardt y Windaus, para el colesterol y sus ésteres; técnica de Kossa para el calcio; de McManus para glucoproteínas, previa digestión por ptialina; Lillie, Hempelmann y Hale, con digestión por hialuronidasa testicular para mucopolisacáridos (ver bibliografía en 8).

RESULTADOS

En las 107 ratas estudiadas, hemos practicado 1500 preparaciones histológicas y 6000 cortes de la arteria femoral. Hemos separado aquellas con soluciones muy diluídas de colesterol (0,07 ‰), porque la evolución arterial es semejante a la que ocurre con inyecciones de suero fisiológico⁹, es decir, se forma un tejido de proliferación endotelial con soporte elástico reticulínico, glucoproteico y mucopolisacárido, sin colesterol, que evoluciona hacia la fibrosis. Tampoco consignamos las soluciones muy concentradas (25 ‰) porque produjeron panarteritis necrotizante sin procesos reaccionales.

Las soluciones intermedias, entre 2,5 y 15 ‰, en suero fisiológico o en sangre, produjeron consistentemente el mismo cuadro evolutivo, para cuya descripción podemos separarlo esquemáticamente en tres períodos no siempre diferenciados entre sí y que se superponen insensiblemente:

1) *Período descamativo*. Las células endoteliales se disponen normalmente en una capa monoestratificada continua, que apoya directamente sobre la lámina elástica limitante interna, sin interposición de elementos fibrilares ni substancia amorfa. 30 a 50 minutos después de la ligadura, comienza la descamación de las células que hacen prociencia hacia la luz vascular. Dichas células son encontradas, sin embargo, sólo accidentalmente, pues la técnica de congelación no les brinda un soporte artificial, con lo que probablemente se pierden durante la coloración y el montaje de los cortes. Se caracterizan por mostrar un límite celular definido y un núcleo grande, con retículo cromático delicado o finamente granuloso, y de forma redondeada. Existen formas de transición con las células endoteliales aún adheridas a la elástica, que tienen límites poligo-

nales y núcleo aparentemente denso e hipercromático por ser visto de perfil. Tanto las células descamadas, como las que aún permanecen adheridas a las depresiones de la limitante elástica interna, se hacen tumefactas y aparecen en su citoplasma gotitas que se tiñen netamente con el Sudán IV. Gotitas similares pueden ser vistas sobre la limitante elástica desnuda. Si existe plasma en la luz, la técnica de McManus para glucoproteínas da una coloración suave y difusa. Las tinciones específicas para colesterol son negativas en este período, porque el material inyectado no permanece en los cortes efectuados por congelación. Los capilares periadventiciales se congestionan y comienzan a afluir polinucleares hacia la adven-

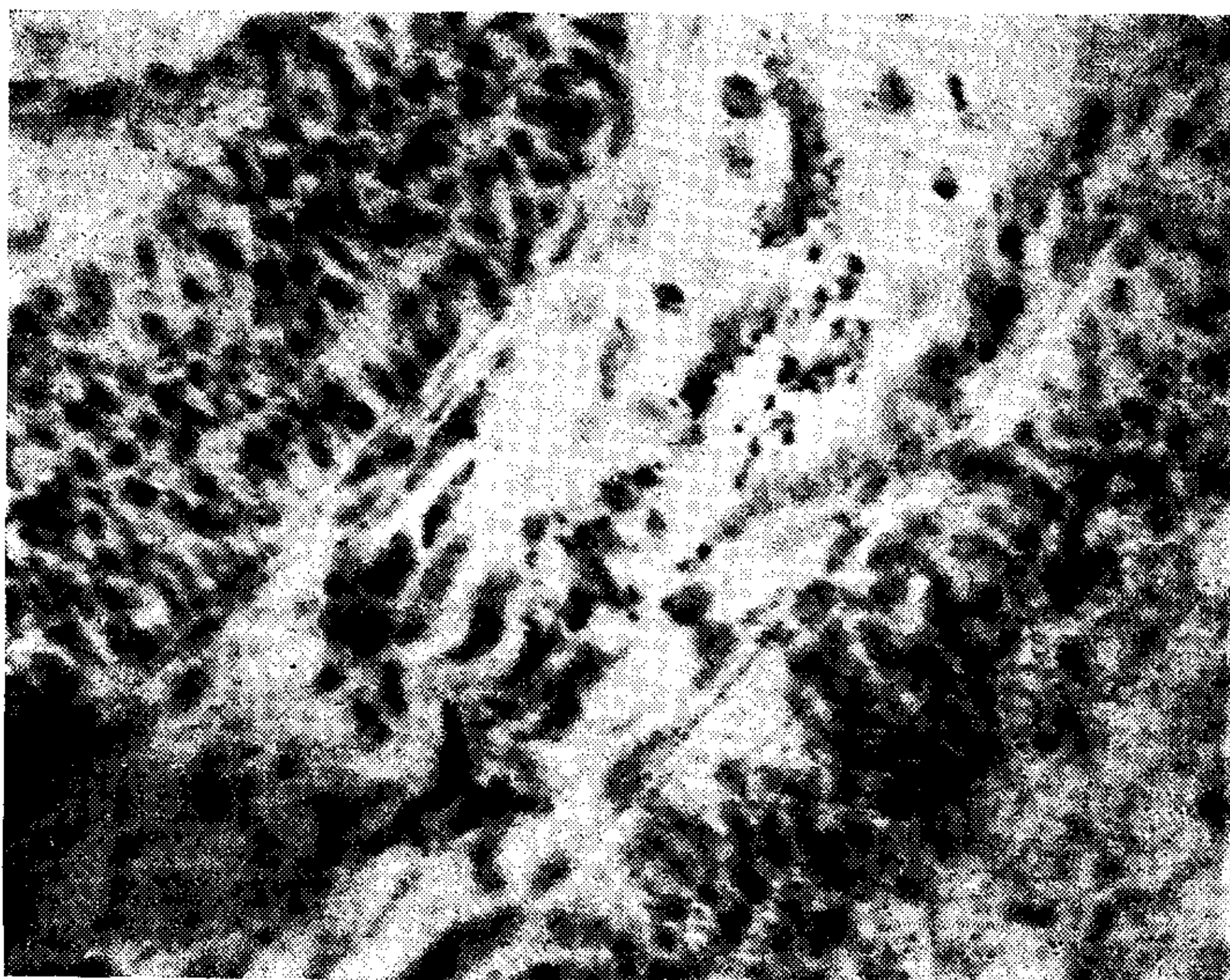


FIG. 1. — C1479, sangre y colesterol 5%, 4 días. Se constata la denudación de la limitante elástica interna. Las células endoteliales descamadas se cargan de lípidos y su citoplasma adquiere un aspecto espumoso. Sudán IV, 70 X.

ticia. Los cambios descritos no están relacionados con el colesterol introducido, dependiendo sólo de la ligadura arterial, pues aparecen igualmente en aquellos experimentos en que se ha inyectado suero fisiológico.

A las 18 horas, la descamación endotelial es prácticamente total. En algunos cortes se consigue demostrar la existencia de lípidos en la luz con las técnicas de Liebermann, Windaus y por birrefringencia. Los polinucleares atraviesan la túnica media y llegan a la

luz. A las glucoproteínas se agregan en el líquido intravascular mucopolisacáridos, resistentes a la digestión por hialuronidasa testicular. Se advierte la difusión o el transporte de colesterol libre hacia la capa media. A los tres días las células descamadas toman un típico aspecto espumoso y dan las reacciones del colesterol esterificado y libre, apareciendo una moderada metacromasia en la luz y en la capa media. El aflujo leucocitario aumenta hasta los 4 días y disminuye luego progresivamente. A los seis días es evidente la multiplicación de las células endoteliales descamadas, sorprendiéndose algunas figuras de mitosis.



FIG. 2. — C493. suero salino. 5 días. Las células endoteliales descamadas se multiplican activamente, pudiéndose observar una mitosis. Hematoxilina-eosina, 1150 X.

Periodo proliferativo. En este momento el contenido de la luz está constituido por células endoteliales descamadas, muchas con aspecto espumoso y algunas en mitosis, por hematíes y por leucocitos polinucleares. Comienza a dibujarse en el intersticio una red incompleta de reticulina y continúan presentes glucoproteínas y mucopolisacáridos, relativamente resistentes a la hialuronidasa testicular. La metacromasia es ahora marcada en la luz y más suave en el intersticio de la media.

A los 9 días la proliferación ha disminuído la luz a la mitad y

sus células comienzan a ordenarse concéntricamente. A los 12 días la luz es sólo un cuarto de la primitiva y en algunas arterias aparecen excepcionalmente, entre las fibras reticulínicas ahora densas, fibras colágenas, las que generalmente aparecen sólo a los dos meses del proceso. A los 16 días ya no quedan hematíes intactos en la luz y a los 23 días desaparece todo vestigio de colesterol libre o esterificado en la arteria, después de una paulatina reducción en los días precedentes.

Período de fibrosis. De una manera insensible comienza este período caracterizado por la evolución de los elementos endoteliales

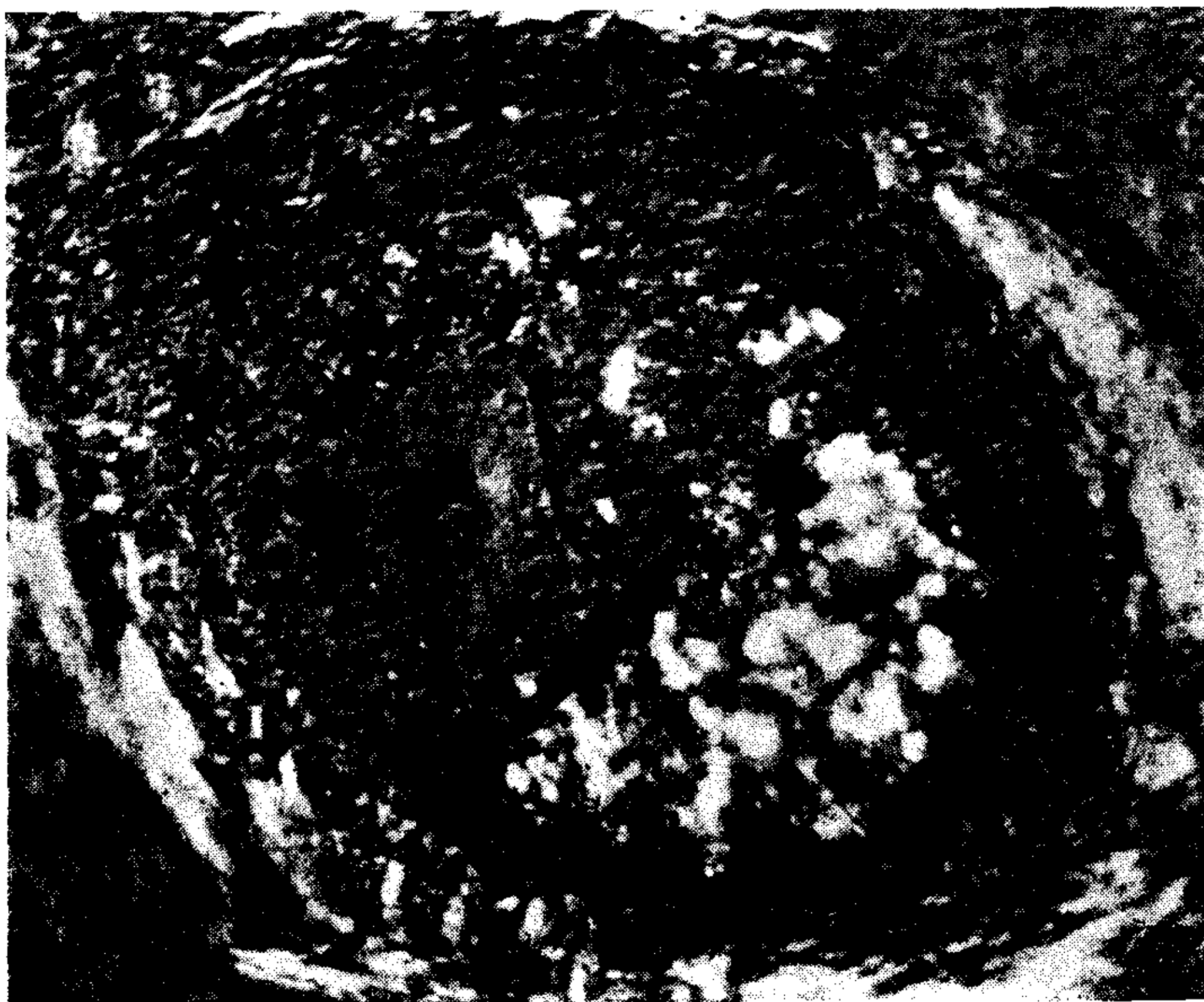


FIG. 3. — C1442. Sangre y colesterol 23‰, 12 días. La birrefringencia en fresco comprueba abundante cantidad de ésteres de colesterol. Puede observarse la aparición de dicha substancia en la capa media. Montage en fresco, 30X.

proliferados hacia la imagen fibroblástica-fibroclítica, y por la aparición o el aumento de la substancia colágena. Ambos procesos se organizan alrededor del cauce residual, dando por resultado la aparición de una estructura compleja compuesta por los siguientes elementos: 2-3 capas de células alargadas de tipo fibroclítico, de las cuales la más interna adopta función y morfología endoteliforme, densificación entre las mismas de la trama reticulínica y colágena, impregnada de abundante substancia intersticial con glucoproteínas



FIG. 4. — C.1395, sangre y colesterol 5‰, 16 días. La proliferación endotelial reduce marcadamente la luz vascular. Sus células componentes tienen aspecto espumoso. Hematoxilina-eosina. 45 X.

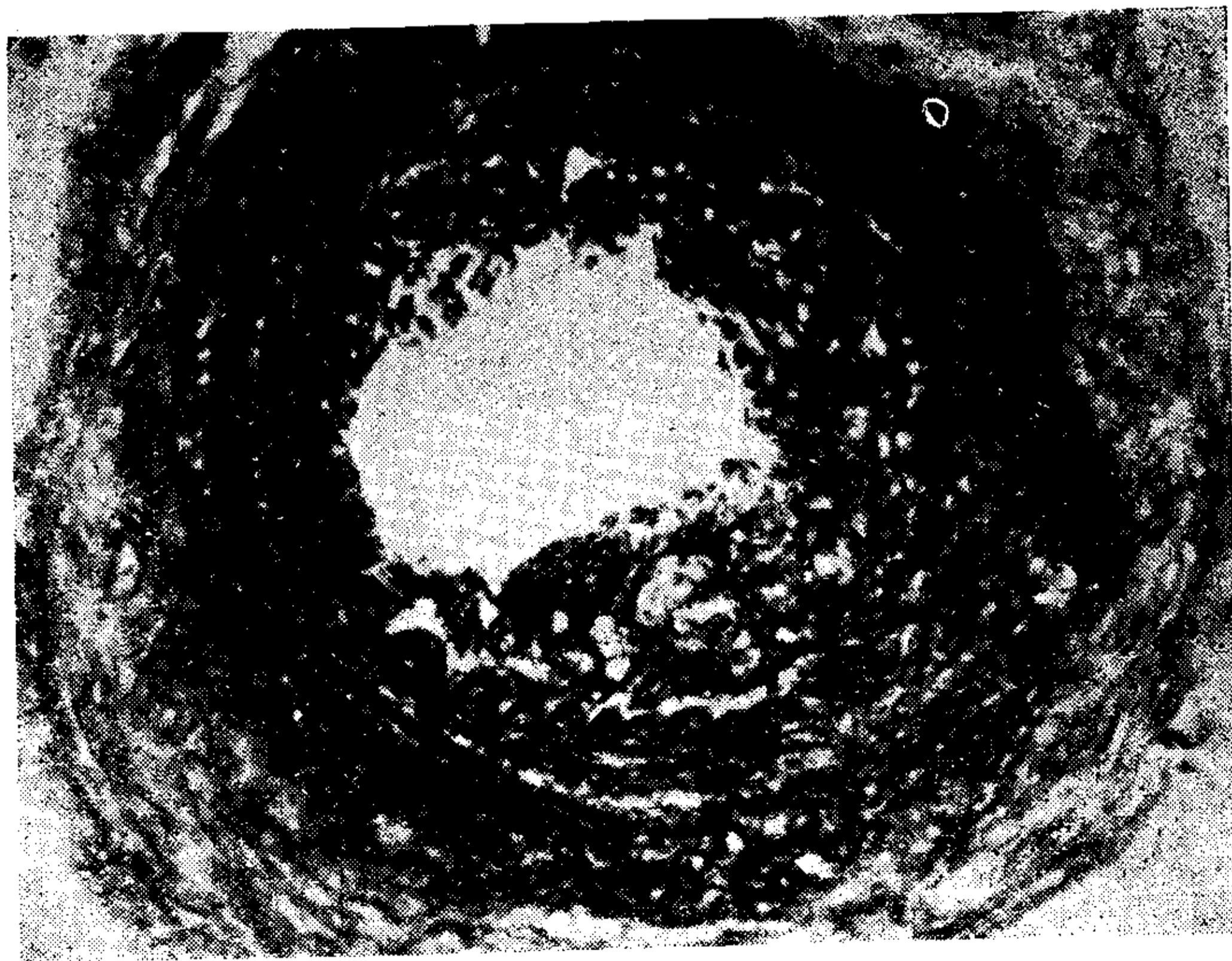


FIG. 5. — C11395, sangre y colesterol 5‰, 16 días. El soporte reticulínico de los elementos proliferados endoteliales es fuerte y denso. Técnica para reticulina y colágena de del Río Horteiga. 45 X.

y mucopolisacáridos. En estas arterias de la serie de colesterol, no pudimos apreciar elastogénesis.

Después de los 60 días, la atrofia de la muscular y la fibrosis intersticial, revelan la participación de la capa media en los procesos involutivos. En la adventicia, los capilares tienden a aumentar de diámetro, llegando, en algunos casos, a constituir aparentemente una suplencia funcional adecuada.

DISCUSIÓN

A pesar de la facilidad con que se ha provocado ateromatosis en especies hervíboras y omnívoras, en la rata no ha sido posible



FIG. 6. — C1404, sangre y colesterol 23 %. 21 días. Hacia el fin de la tercera semana desaparecen los últimos vestigios del colesterol inyectado en la cámara arterial. Birrefringencia en fresco. 45 X.

hasta ahora demostrar lesiones ateromatosas generalizadas, salvo en comunicaciones aisladas^{10, 11}. Algunas comunicaciones de la literaturas¹² se refieren a simples lipidosis de la íntima y de la media. Anteriormente⁸ hemos consignado que segmentos arteriales aislados de la circulación sistémica de la rata, permanecen sin embargo en conexión metabólica con el resto del animal, ya que sus células no degeneran, sino que se reproducen y porque, además, colorantes inyectados en la aorta o en la vena cava inferior aparecen rápida-

mente en el segmento ligado. En el presente trabajo demostramos que la pared arterial de la rata es capaz de reaccionar formando lesiones que semejan *morfológicamente* a las de aterosclerosis encontradas en otras especies, puesto que en ambas condiciones se encuentra proliferación de las células endoteliales, algunas con aspecto espumoso, conteniendo colesterol y sus ésteres, y rodeadas por un substractum glucoproteico y mucopolisacárido, en el cual aparecen fibrillas de reticulina y colágenas. El colesterol desaparece luego por destrucción local o eliminación por transporte, evolucionando posteriormente estas lesiones hacia la fibrosis, en forma semejante a los segmentos arteriales aislados en ratas en los que se ha inyectado suero fisiológico sin colesterol⁹. A pesar de que nuestro preparado puede no estar en relación con el problema de la génesis de la arteriosclerosis, por las condiciones sumamente artificiales en que nos hemos colocado, demuestra sin embargo la posibilidad de que en las arterias de la rata aparezcan lesiones que morfológicamente semejan la ateromatosis de otras especies, con lo que se abre el camino a la especulación y a la investigación de los motivos que impiden normalmente la aparición espontánea o provocada de ateromatosis generalizada en la rata, problema que puede estar relacionado con los mecanismos que hacen desaparecer rápidamente el colesterol introducido en segmentos arteriales ligados.

RESUMEN

La inyección de suspensiones coloidales de colesterol en segmentos arteriales aislados de ratas, provoca lesiones que morfológicamente se asemejan a las lesiones espontáneas o provocadas de aterosclerosis de otras especies animales. Se recuerda que, a pesar de la existencia de estas lesiones localizadas, producidas en forma muy artificial, subsiste el problema de investigar las causas que impiden normalmente la aparición espontánea o provocada de aterosclerosis generalizada en la rata.

Agradecemos al Prof. Blas Moia su valiosa cooperación durante las presentes investigaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. Ignatowski, A. — Bern. d. Mil. Mediz. Akad. 1908. 16. 174. En Cowdry, E. V. Arteriosclerosis, a survey of the problem. MacMillan Co., N. Y. 1933, pág. 271.
2. Anitschkow, N. y Chalutow, S. — Zentralbl. f. Allg. Path. u. path. Anath. 1913, 24, 1, en Cowdry, loc. cit.

3. Katz, L. N. — *Circ.* 1952, 5, 101.
4. Steiner, A. y Kendall, F. E. — *Arch. Path.* 1946, 42, 433.
5. Rinehart, J. F. y Greenberg, L. D. — *Am. J. Path.* 1949, 25, 481.
6. Treadwell, C. R. y Eckstein, H. C. — *J. Biol. Chem.* 1941, 140, 35.
7. Horlick, L. y Havel, L. — *J. Lab. and Clin. Med.* 1948, 33, 1029.
8. Malinow, M. R., Hojman, D. y Pellegrino, A. A. — *Rev. Arg. Cardiol.* 1952, 19, 1.
9. Malinow, M. R., Hojman, D. y Pellegrino, A. A. — Observaciones no publicadas.
10. Löwenthal K. — *Frankf. Z. f. Path.* 1926, 34, 145.
11. Resultados obtenidos en el laboratorio de Cannon, Chicago, U.S.A., comunicados personalmente por L. N. Katz.
12. Bragdon, J. H. y Boyle, E. — *Am. J. Path.* 1952, 28, 527 (P).

R E S U M E

L'injection des suspensions colloïdales de colésterol dans des segments artériels isolés appartenant à des rats, provoca des lésions qui morphologiquement ressemblent aux lésions spontanées ou provoquées d'athermatose dans d'autres espèces animales. On souligne que malgré l'existence de ces lésions localisées, produites de façon très artificielle, il subsiste le problème d'investiguer les causes qui empêchent normalement l'apparition spontanée ou provoquée d'athermatose généralisée, dans le rat.

S U M M A R Y

The injection of suspensions of cholesterol into doubly ligated arteries, produce lesions in the rat which morphologically resemble those found in other species. In spite of these lesions, the causes that inhibit spontaneous or experimental arteriosclerosis in the rat, are still an unknown problem.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Injection kolloidaler Suspensionen von Cholesteral in isolierte Arterien-segmente bei Ratten, ruft Schädigungen hervor die morphologisch der Schädigungen spontaner oder provoziertes Atheromatosis anderer Tierarten gleichen. Man betont, das trotz dem Bestehen dieser in so künstlicher Form hervorgerufenen örtlichen Schädigungen das Problem aufrecht bleibt, die Gründe zu untersuchen, die das Auftreten spontaner oder künstliche, generalisierten Atheromatose bei der Rathe verkindern.