

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

CBS



INHIBICION DE LA AGREGACION PLAQUETARIA POR POLIAMINAS
EN CONEJOS NUEVA ZELANDA CON HIPERCOLESTEROLEMIA
INDUCIDA



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

P R E S E N T A

M. EN C. NORMA ANGELICA CORONA DE LA PEÑA

Matricula 96359245

AGOSTO DEL 2000

225706

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACyT Y ADemás CUENTA CON APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO NUM. PFP-200-93. NORMA CORONA DE LA PEÑA RECIBIÓ UNA BECA OTORGADA POR EL CONACyT DURANTE LA REALIZACIÓN DE SU TRABAJO DOCTORAL

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

NORMA ANGELICA CORONA DE LA PEÑA

3 de agosto del 2000

Comité Tutorial:

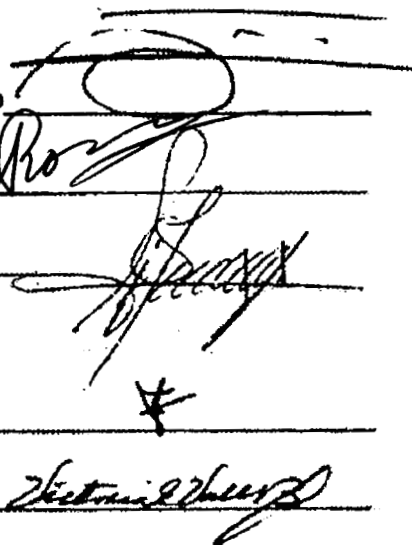
Tutor: Dr. José Domingo Méndez Francisco

Asesor: Dr. Rubén Román Ramos

Asesor: Dr. Jorge A. Sosa-Melgarejo

Sinodal: Dr Marco Antonio Juárez Oropeza

Sinodal: Dra. Victoria Valles Sánchez



The image shows five handwritten signatures corresponding to the names listed on the left. The signatures are written in black ink on a white background. The first signature is for Dr. José Domingo Méndez Francisco, the second for Dr. Rubén Román Ramos, the third for Dr. Jorge A. Sosa-Melgarejo, the fourth for Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza, and the fifth for Dra. Victoria Valles Sánchez.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES METABOLICAS DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS; Y SE CONTO CON APOYO DEL FOFOI (PROYECTO 220/FP098).

A mis padres

A mi esposo Pedro

Agradezco al Dr. José Domingo Méndez porque su decidido apoyo y dirección me han ayudado a ser cada día mejor, en mi trabajo y, también como persona.

Agradezco al Dr. Jorge A. Sosa-Melgarejo por todas sus enseñanzas. Su apoyo y su amistad han sido para mi muy importantes.

Agradezco al Dr. Rubén Román Ramos por su apoyo y valiosas aportaciones a este trabajo.

Agradezco al Dr. Pablo Rivera, Jefe del Laboratorio Central, y a los Químicos Guadalupe Montiel y Manuel Moreno del Laboratorio de Coagulación Especial, del Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI por su ayuda para la realización de los análisis clínicos relacionados con este estudio.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS

| | |
|------------------|---|
| 1,2-DAG | 1,2-Diacilglicerol |
| a | Adventicia |
| ACAT | Acil coenzima A colesterol aciltransferasa |
| ADP | Adenosin-5-difosfato |
| AMPc | Adenosin-5-monofosfato cíclico |
| Apo | Apoproteína |
| CETP | Proteína transportadora de ésteres de colesterol |
| EDRF | Factor relajante derivado de endotelio |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| HF | Hipercolesterolemia familiar |
| HMG-CoA red | Hidroximetilglutaril coenzima A reductasa |
| i | Intima |
| IC ₅₀ | Concentración necesaria para alcanzar la mitad del efecto |
| IDL | Lipoproteína de densidad intermedia |
| IL1 | Interleucina 1 |
| i.p. | Intraperitoneal |
| i.v. | Intravenoso |
| LCAT | Lecitin colesterol aciltransferasa |

| | |
|-------------------|---|
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| LDL _{ox} | Lipoproteína de baja densidad oxidada |
| Lp (a) | Lipoproteína a |
| m | Media |
| mRNA | Acido ribonucleico mensajero |
| NZ | Conejo Nueva Zelanda |
| PA-I | Inhibidor del activador de plasminógeno |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PGI ₂ | Prostaglandina I ₂ |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PPP | Plasma pobre en plaquetas |
| PRP | Plasma rico en plaquetas |
| TAG | Triacilgliceroles |
| TGF | Factor de crecimiento transformante |
| WHHL | Conejo hipercolesterolémico Watanabe |
| VLDL | Lipoproteína de muy baja densidad |

INDICE

| | |
|----------|----|
| RESUMEN | 12 |
| ABSTRACT | 14 |

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION | 16 |
| El ateroma | 16 |
| Teoría de formación de ateromas por daño endotelial | 19 |
| Absorción y excreción de colesterol | 25 |
| Metabolismo y función de las lipoproteínas | 26 |
| Metabolismo de LDL | 30 |
| Metabolismo de HDL | 33 |
| Proteína transportadora de ésteres de colesterol | 37 |
| Papel de la agregación plaquetaria en la aterosclerosis | 38 |
| Inducción de aterosclerosis en animales por dietas hiperlipidémicas | 45 |
| Inducción de aterosclerosis por manipulación genética | 50 |
| Papel del metabolismo de la L-arginina en la aterosclerosis experimental en el conejo | 50 |
| Características y funciones de las poliaminas | 54 |

| | |
|----------------------------|----|
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 64 |
|----------------------------|----|

| | |
|--|----|
| OBJETIVOS | 66 |
| <hr/> | |
| METODOLOGIA | 68 |
| Modelo de conejo hipercolesterolémico | 68 |
| Toma de muestras | 69 |
| Aislamiento de aortas | 70 |
| Preparación de alimento enriquecido con 1% de colesterol | 70 |
| Preparación de alimento enriquecido con 10% de colesterol | 70 |
| Determinación de triacilgliceroles | 71 |
| Determinación de colesterol total | 72 |
| Determinación de colesterol-HDL | 73 |
| Determinación de colesterol-LDL | 74 |
| Determinación de glucosa | 74 |
| Determinación de proteína | 75 |
| Determinación de actividad de arginasa y contenido de arginina | 75 |
| Agregación plaquetaria | 76 |
| Análisis de muestras por microscopía óptica | 77 |
| Tinción de Hematoxilina/Eosina | 77 |
| Tinción tricrómica de Masson | 78 |
| Tinción de Verhoeff-Van Giesen | 79 |
| Detección de grasa subendotelial | 79 |

| | |
|--|-----|
| Análisis estadístico | 80 |
| <hr/> | |
| RESULTADOS | 81 |
| Cambios en los niveles plasmáticos de lípidos y glucosa en los conejos alimentados con dietas ricas en colesterol | 81 |
| Actividad de arginasa en conejos hipercolesterolémicos | 84 |
| Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria | 86 |
| Evaluación de las lesiones ateroscleróticas | 95 |
| <hr/> | |
| DISCUSION | 100 |
| Cambios en los niveles séricos de lípidos en conejos alimentados con colesterol | 100 |
| Actividad de arginasa y contenido de arginina en conejos hipercolesterolémicos | 103 |
| Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria en conejos hipercolesterolémicos | 103 |
| Lesiones ateroscleróticas en conejos hipercolesterolémicos | 114 |
| CONCLUSIONES | 124 |
| PERSPECTIVAS | 125 |
| REFERENCIAS | 127 |
| PUBLICACION GENERADA EN ESTE TRABAJO | 142 |

RESUMEN

La aterosclerosis es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El modelo más utilizado para el estudio de la aterogénesis y el efecto de diversas sustancias sobre el desarrollo de ateromas es el conejo Nueva Zelanda alimentado con una dieta rica en colesterol. En este trabajo se estudió el desarrollo de placas ateroscleróticas en conejos Nueva Zelanda alimentados con dietas ricas en colesterol. Se evaluó el contenido sérico de lípidos y glucosa en conejos sanos y conejos alimentados con dietas estándar adicionadas con 1 y 10% de colesterol. Se hicieron estudios histológicos de las aortas de dichos animales para evaluar la presencia de lesiones ateroscleróticas. En los animales alimentados con la dieta enriquecida con 10% de colesterol, el colesterol sérico total aumentó significativamente de 26.3 ± 8.1 mg/dl a 1485.0 ± 26.8 mg/dl ($p < 0.05$). El colesterol asociado a LDL también se incrementó, de 15.9 ± 5.9 a 1383.8 ± 58.9 ($p < 0.5$); y los TAG de 88.3 ± 35.6 a 411.0 ± 154.5 . Después de 10 semanas se encontraron algunas lesiones ateroscleróticas en las aortas de los conejos alimentados con la dieta que contenía 10% de colesterol sin que se observara un deterioro en el estado de salud general de los animales.

En este trabajo utilizamos el modelo de conejo hipercolesterolémico para evaluar el efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria, función que está estrechamente relacionada con la formación de placas ateroscleróticas. Las poliaminas

son moléculas alifáticas que tienen diversas propiedades citoprotectoras, inmunorreguladoras y antioxidantes, además de que son capaces de inhibir la agregación plaquetaria en el humano y la rata. El efecto antiagregante de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina se estudió en plaquetas de conejos normales y conejos hipercolesterolémicos (alimentados con la dieta que contenía 10% de colesterol durante 10 semanas). Para los ensayos de agregación plaquetaria se utilizó plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido de los dos grupos de conejos utilizando 2.5 μ moles/ml de ADP o 2 μ g/ml de colágena como agentes agregantes. Se observó 75% de inhibición utilizando 10 μ M de poliaminas en los conejos control. La espermina inhibió la agregación plaquetaria en 54% en los conejos hipercolesterolémicos utilizando ADP como agente agregante. El orden de efectividad fue espermina > espermidina > putrescina. Además se midió la actividad de arginasa y la concentración de L-arginina en PRP. Ninguno de estos parámetros se vio alterado por la hipercolesterolemia en los conejos alimentados con 10% de colesterol. Estos resultados demuestran que las poliaminas tienen una acción antagonista sobre la agregación plaquetaria, lo que sugiere un papel regulador de estas moléculas sobre la agregación plaquetaria tanto en condiciones normales como en condiciones de hiperlipidemia.

ABSTRACT

Atherosclerosis is one of the main causes of death worldwide. One of the most commonly used animal model for the study of atherogenesis and the effect of several substances on plaque formation is the New Zealand rabbit fed with a cholesterol enriched diet. In this study the formation of atherosclerotic plaques was studied in New Zealand rabbits fed with 1% and 10% cholesterol. Serum lipids and glucose were evaluated and the presence of atherosclerotic lesions was studied histologically. In rabbits fed with 10% cholesterol, serum total cholesterol increased from 26.3 ± 8.1 mg/dl to 1485.0 ± 26.8 mg/dl ($p < 0.05$). LDL-cholesterol also increased from 15.9 ± 5.9 to 1383.8 ± 58.9 ($p < 0.5$); and triglycerides from 88.3 ± 35.6 to 411.0 ± 154.5 . After 10 weeks some lesions were found in the aorta of cholesterol-fed rabbits.

In this work we used the hypercholesterolemic rabbit to evaluate the effect of L-arginine and polyamines on platelet aggregation, which is closely associated to plaque formation. Polyamines are aliphatic molecules that present diverse citoprotective, immunoregulatory and antioxidant activities in addition to their antagonist effect on platelet aggregation in rat and human. The antiaggregating effect of polyamines putrescine, spermidine and spermine was studied in platelets obtained from normal and hypercholesterolemic rabbits (fed with 10% cholesterol). Platelet rich plasma was used for the platelet aggregation assay in the presence of $2.5 \mu\text{moles/ml}$ of ADP or $2 \mu\text{g/ml}$ collagen as aggregating agents. A 75% inhibition was observed with $10 \mu\text{M}$ polyamines in control rabbits. Spermine

inhibited platelet aggregation by 54% in hypercholesterolemic rabbits using ADP as agonist. The order of effectiveness was spermine > spermidine > putrescine. In addition, arginase activity and L-arginine content was evaluated in PRP. These parameters were not altered by hypercholesterolemia. Our results demonstrate that polyamines may have a role in the regulation of platelet aggregation both in normal conditions and in hypercholesterolemia.

INTRODUCCION

El ateroma

Un *ateroma* es una estructura que se forma de manera progresiva en la pared de las arterias, especialmente en la aorta, la arteria cerebral y la arteria ilíaca; especialmente en sitios de ramificación del árbol vascular. Se caracteriza por alteración de uno o más de los elementos estructurales, con acúmulo de lípidos, colágena, hialina y calcio, causando engrosamiento, dilatación, deformidad y pérdida de elasticidad de las arterias (Ross, 1993). Un ateroma se desarrolla en 3 etapas: la estría grasa, la placa fibrograsa y la placa fibrosa.

A la lesión aterosclerótica menos avanzada se le conoce como estría grasa. Una estría grasa a su vez se desarrolla en tres etapas. En la primera etapa puede encontrarse un reducido número de leucocitos por debajo de la capa endotelial de la íntima de la arteria. En la segunda etapa existen numerosos leucocitos subendoteliales formando una estructura ligeramente abultada hacia el lumen de la arteria. Y la tercera etapa se caracteriza por un importante engrosamiento de la capa íntima de la arteria, con numerosas capas de leucocitos localizados en la capa subendotelial (Colangelo y cols., 1998). Las estrías grasas pueden encontrarse incluso en niños entre 10 y 14 años (Stary, 1989; McGill, 1984) lo que denota la ubicuidad del proceso aterosclerótico.

En su etapa intermedia los ateromas se componen de numerosas capas de macrófagos y células de músculo liso, formando placas compuestas tanto de lípidos como colágena. A estas lesiones se les denomina placas fibrograsa.

Las lesiones avanzadas o placas fibrosas son generalmente lesiones oclusivas que aumentan de tamaño proyectándose hacia el lumen de la arteria llegando a obstruir el flujo sanguíneo. Están cubiertas por una densa capa de tejido conectivo con células de músculo liso embebidas, que generalmente se encuentran rodeando un centro de lípido y restos celulares (Figura 1). Las placas fibrosas contienen macrófagos derivados de monocitos, células de músculo liso y linfocitos T, muchos de los cuales están activados (Gown y cols., 1986). La mayoría de las muertes repentinas por infartos al miocardio se deben a rupturas o fisuras, particularmente en los márgenes de la capa fibrosa, donde existen más macrófagos, lo que provoca la hemorragia de la placa, trombosis y oclusión de la arteria (Davies y Thomas, 1984).

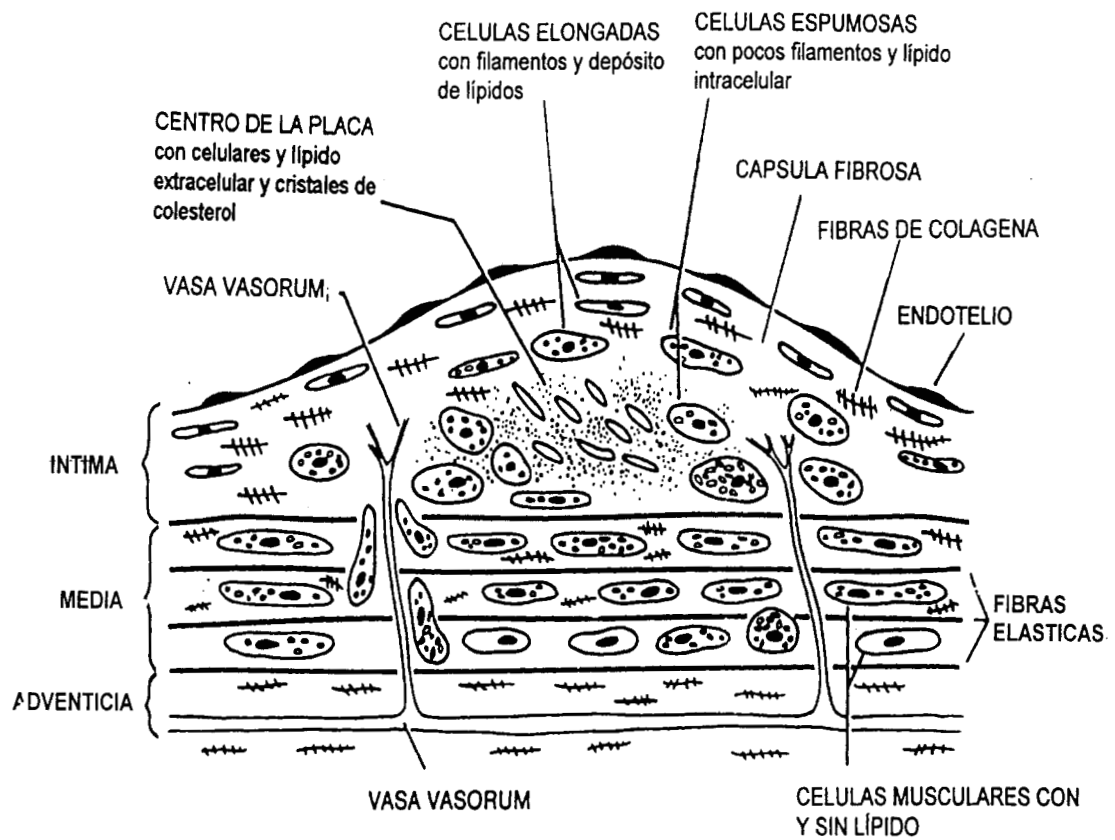


Figura 1. Esquema de un ateroma mostrando sus componentes estructurales (Buja y cols., 1983).

Teoría de formación de ateromas por daño endotelial

Ross (1993) desarrolló la teoría de daño endotelial para explicar el proceso aterogénico, basándose en hipótesis anteriores de daño arterial (French, 1966). De acuerdo a esta teoría, factores de riesgo como la hipercolesterolemia, la hipertensión y la diabetes inducen un daño que puede causar una disfunción de las células endoteliales, principalmente en sitios de ramificación del árbol vascular, generalmente donde existe un acúmulo previo de células de músculo liso en la capa íntima de la arteria.

A diferencia de lo que ocurre en respuesta a un daño causado por una herida, por ejemplo, la principal fuente de tejido conectivo en el proceso aterosclerótico es la célula de músculo liso, y la fuente de daño endotelial es crónica (hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, tabaquismo, obesidad, etc.) de manera que el crecimiento de la placa no es interrumpido o al menos debe ser episódica.

El daño endotelial altera la función de los vasos afectados ya que las células endoteliales cumplen importantes funciones en los vasos sanguíneos. El endotelio provee una superficie no trombogénica, es una barrera de permeabilidad que participa en el transporte activo de sustancias hacia la pared arterial y mantiene el tono vascular liberando pequeñas moléculas, como el óxido nítrico, prostaglandina (PGI₂) y endotelina, que modulan la

vasodilatación y vasoconstricción respectivamente. El endotelio forma y secreta moléculas moduladoras del crecimiento y citocinas, mantiene la colágena y proteoglicanos de la membrana basal sobre la que se encuentra y provee una superficie no adherente para leucocitos. El endotelio también puede modificar (oxidar) lipoproteínas mientras son transportadas a la pared arterial.

Los eventos de daño al endotelio no necesariamente provocan la desendotelización de la arteria. De hecho, se sabe que en las lesiones ateroscleróticas, las células endoteliales se encuentran intactas (Rosenfeld y cols., 1987). La disfunción puede manifestarse como un aumento del transporte de lipoproteínas hacia la arteria (Mora y cols., 1987) y la aparición de glicoproteínas de adhesión específicas en la superficie de las células endoteliales, lo que desencadena los eventos asociados a la formación de una placa aterosclerótica.

La lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox) es un componente importante del daño endotelial (Steinberg, 1991). Una vez formada por el endotelio, esta partícula puede dañar directamente a las células de la íntima y aumentar la adherencia y migración de monocitos y linfocitos T al espacio subendotelial. El endotelio forma moléculas adhesivas y glicoproteínas de superficie por el endotelio, así como varias clases de moléculas de adhesión endotelio-leucocitos en respuesta a LDLox. Estas moléculas están involucradas en la aterogénesis (Springer, 1990; Carlos y Harlan, 1990).

La formación de un ateroma en respuesta a daño endotelial se esquematiza en la Figura 2. El daño endotelial inducido por diversos factores de riesgo provoca un aumento en la adhesión de monocitos/macrófagos y linfocitos T a la capa endotelial de las arterias, en un proceso mediado entre otros factores por LDLox. (Figura 2A) Los monocitos y linfocitos T se adhieren y migran entre las células endoteliales bajo la influencia de moléculas reguladoras del crecimiento y quimioattractantes, liberadas tanto por las células endoteliales alteradas como por los leucocitos adheridos (Munro y Cotran, 1988), y posiblemente por las células de músculo liso. Los macrófagos y las células de músculo liso se convierten en células espumosas al acumular lípidos (Masuda y Ross, 1990) (Figura 2B). Una vez que los monocitos y los linfocitos entran a la íntima de la arteria, la LDLox del endotelio y otras sustancias asociadas con la aterogénesis pueden participar en la activación de los monocitos, convirtiéndolos en macrófagos (Ylä-Herttuala y cols., 1989). El transporte de LDLox por los macrófagos lleva a la formación de células espumosas (Ylä-Herttuala y cols., 1989) y puede alterar la expresión de muchas moléculas reguladoras del crecimiento, citocinas y sustancias de bajo peso molecular. La lesión formada se conoce como estría grasa y evoluciona a una lesión fibrosa al aumentar la entrada de células a la íntima y la proliferación celular (Figura 2C).

A medida que se acumulan linfocitos y células de músculo liso que migran desde la capa media de la arteria, estas células acumulan una gran cantidad de lípidos. Algunos macrófagos migran de regreso al torrente sanguíneo pasando entre las células endoteliales

y formando superficies trombogénicas a las que se adhieren plaquetas y sobre las que puede formarse un trombo (Figura 2D). El trombo secreta potentes moléculas reguladoras del crecimiento, que junto con las que son liberadas por los macrófagos y probablemente células de músculo liso, aumentan la proliferación de las células de músculo liso y su migración hacia la íntima, así como la proliferación de los macrófagos en la lesión. El trombo también puede formarse en lugares en los que el endotelio está retraído. Finalmente, la lesión se complica convirtiéndose en una placa fibrosa cuando las células de músculo liso pasan del fenotipo contráctil al fenotipo sintético y forman elementos fibrosos. Sin embargo, si el agente que causa el daño desaparece, o en presencia de agentes protectores, el proceso inflamatorio y fibroproliferativo puede detenerse o incluso revertirse (Figura 2E).

De acuerdo a Ross (1993), los principales procesos implicados en la formación de ateromas son: la proliferación de células de músculo liso, macrófagos y probablemente linfocitos, la formación por las células de músculo liso de una matriz de tejido conectivo compuesta de proteínas de fibra elástica, colágena y proteoglicanos, la acumulación de lípido en su mayoría colesterol libre y esterificado en la matriz extracelular y en las células de la lesión y la agregación plaquetaria, activada en sitios de daño endotelial. El aumento en la separación entre los elementos de la íntima y de la media, por la acumulación de material en la capa íntima puede causar el rompimiento de los contactos mioendoteliales (entre células endoteliales y células de músculo liso). La pérdida de

comunicación celular entre la capa íntima y la media altera la vasodilatación dependiente de endotelio (Sosa-Melgarejo y Berry, 1992), la regulación de la proliferación de células de músculo liso por factores de crecimiento secretados por el endotelio (Dicorletto y Bowen-Pope, 1983) y la regulación del metabolismo de lipoproteínas en células de músculo liso.

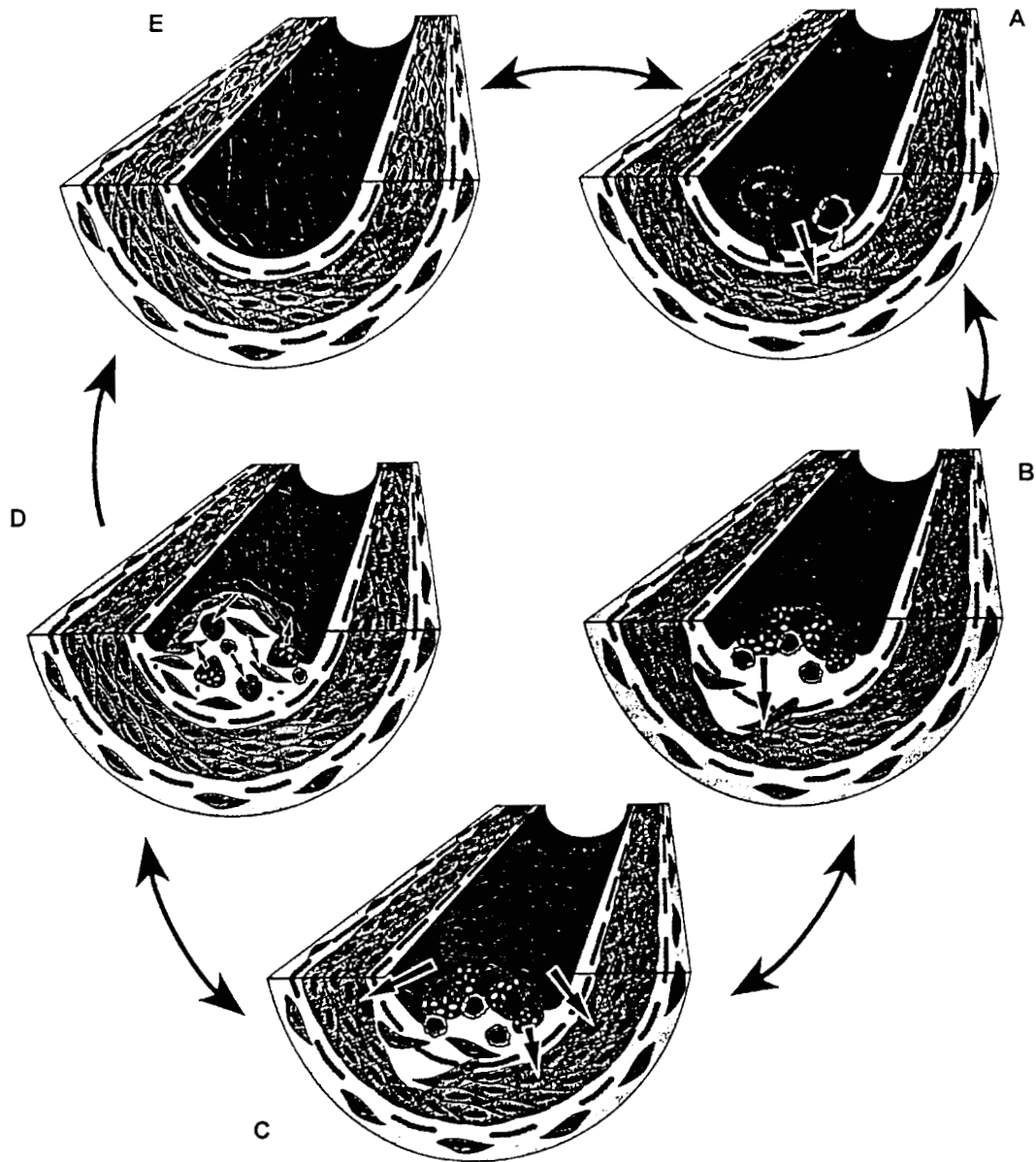


Figura 2. Teoría de daño endotelial. A) Adhesión de monocitos y linfocitos T a la pared de la arteria. B) Acumulación de lípidos por macrófagos y células de músculo liso. C) Migración de células de músculo liso a la capa íntima y activación de linfocitos. D) Formación de superficies trombogénicas en la superficie de la lesión. E) Reversión de la lesión por ausencia del agente causante del daño endotelial. (Ross, 1993).

Absorción y excreción de colesterol

El colesterol es un lípido esteroide que cumple diversas funciones en las células. Es el precursor de la síntesis de ácidos biliares y hormonas esteroideas y también forma parte de las membranas celulares.

La concentración plasmática en humanos se encuentra alrededor de 200 mg/dl, y se incrementa con la edad, aunque hay variaciones entre los individuos (Schulman y cols., 1990). En el plasma cerca de dos tercios del colesterol total se encuentra en forma esterificada, en su mayor parte con ácidos grasos insaturados de cadena larga. La esterificación del colesterol en el plasma está mediada por la enzima lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT) secretada en el hígado. LCAT está presente en el plasma humano y en el plasma de otros mamíferos.

La mayor parte del colesterol se origina por síntesis, mientras que sólo aproximadamente 0.3 g/día se obtiene de la dieta (Grundy, 1990), normalmente el 50% del colesterol que entra al intestino es absorbido y el resto es eliminado en las heces (Grundy, 1990). Todo el colesterol es producto del metabolismo animal, se encuentra en el músculo, hígado, cerebro y en la yema de huevo. El colesterol de la dieta es absorbido en el intestino en compañía de otros lípidos, incluyendo el colesterol sintetizado en el intestino, y es

incorporado en los quilomicrones y la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). El metabolismo de éstas y otras lipoproteínas será discutido más adelante.

Dentro del lumen intestinal, el colesterol es solubilizado en micelas mixtas que contienen ácidos grasos y monoacilglicérols, lecitina, lisolecitina y ácidos biliares, que actúan como detergentes para mantener al colesterol en solución. El colesterol puede entonces atravesar por difusión la membrana externa de las células de la mucosa intestinal. Cuando los lípidos polares son absorbidos separadamente, el colesterol precipita y no puede ser absorbido. Esto explica porqué solamente se absorbe cerca del 50% del colesterol en el lumen intestinal (Grundy, 1990). El colesterol es eliminado por dos vías principales: como ácidos biliares y en forma de esteroides neutros.

Metabolismo y función de las lipoproteínas

Como se mencionó anteriormente, el colesterol del plasma es transportado en partículas de lipoproteínas. Las lipoproteínas funcionan como vehículos de transporte de colesterol y TAG en el plasma. Son partículas globulares parecidas a micelas, consisten de un núcleo no polar compuesto de TAG y ésteres de colesterol, rodeado de una capa anfifílica de proteína (apolipoproteína o apoproteína), fosfolípido y colesterol (Voet y Voet, 1991).

Existen 4 tipos principales de lipoproteínas con características diferentes, cada una con una composición de apoproteínas característica (Tabla 1). La función de los quilomicrones es transportar los TAG y el colesterol de la dieta a los tejidos. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) transportan colesterol endógeno desde el hígado hacia otros tejidos. La función de la lipoproteína de alta densidad (HDL) es transportar colesterol de los tejidos hacia el hígado (Voet y Voet, 1991).

Tabla 1. Composición y funciones de los principales tipos de lipoproteínas

| Lipoproteína | Lípidos | Apoproteínas | Densidad (g/cm ⁻³) | Diámetro (Å) |
|--------------|---|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| Quilomicron | TAG y colesterol de la dieta | A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E | <0.95 | 800-5000 |
| VLDL | Esteres de colesterol, TAG endógenos y colesterol | B-100, C-I, C-II, C-III, E | 0.95-1.006 | 300-800 |
| IDL | Esteres de colesterol y TAG | B-100, C-III, E | 1.006-1.019 | 250-350 |
| LDL | Esteres de colesterol y TAG | B-100 | 1.019-1.063 | 180-280 |
| HDL | Esteres de colesterol y colesterol libre | A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E | 1.063-1.210 | 50-120 |

Tomada de Voet y Voet, 1990.

La densidad de las lipoproteínas está en relación inversa a su diámetro, ya que la capa externa es más densa que la capa interna. Las lipoproteínas sufren modificaciones constantes durante su permanencia en el torrente sanguíneo. En este proceso cambian

drásticamente sus propiedades, pero se conserva la Apo B-100 y mucho de su colesterol es esterificado por la LCAT que está asociada a la partícula de HDL. En estados patológicos como la aterosclerosis la composición de las lipoproteínas se puede ver afectada (Voet y Voet, 1991).

Los quilomicrones se comprimen y se les denomina entonces remanentes de quilomicrones, éstos permanecen en la circulación hasta ser transportados al hígado. Los quilomicrones tienen la función de llevar TAG principalmente al tejido adiposo y al músculo y el colesterol al hígado (Voet y Voet, 1991). Estos pasan del lumen intestinal a la linfa y posteriormente al torrente sanguíneo. Una vez en los capilares del tejido adiposo y del tejido muscular, estas lipoproteínas se adhieren a las células endoteliales, los TAG se hidrolizan por la lipoproteína lipasa (activada por Apo C-II) y el tejido toma los monoacilglicérols y ácidos grasos producidos en esta reacción.

En el hígado se sintetizan las partículas de VLDL como transportadores de lípidos, estas lipoproteínas son degradadas por la lipoproteína lipasa en la circulación, y se convierten en IDL y luego en LDL. El hígado capta HDL por medio de receptores específicos, siendo el único órgano capaz de disponer de grandes cantidades de colesterol (Voet y Voet, 1991).

El colesterol juega un papel importante en los eventos de interconversión entre lipoproteínas y parece ser esencial para el mantenimiento de la estabilidad de estas

partículas. El colesterol entra continuamente al plasma en las partículas de HDL naciente y de las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles secretadas por el hígado y el intestino. Aproximadamente 2-3 g de colesterol libre ingresan al plasma diariamente en hombres normales que absorben 100 g de grasa por día en su dieta (Gibbons, 1982).

Otra clase de lipoproteína que ha sido estudiada recientemente es la Lp (a) (lipoproteína a). La lipoproteína Lp (a) es una lipoproteína de densidad intermedia. Fue estudiada inicialmente por Berg (1963). La Lp (a) tiene una composición lipídica similar a la de la lipoproteína de baja densidad, y contiene también apo B-100, pero a diferencia de la LDL contiene una apolipoproteína altamente glicosilada, unida a Apo B-100 por medio de puentes disulfuro. Esta lipoproteína tiene una estructura muy similar a la del plasminógeno, lo que la hace trombogénica y aterogénica (Scanu, 1992). Niveles elevados de esta lipoproteína han sido asociados con el desarrollo de aterosclerosis (Dahlen y cols., 1976).

Metabolismo de LDL

La LDL transporta la mayor parte del colesterol presente en el plasma humano. Las partículas de LDL contienen un núcleo compuesto casi completamente por ésteres de colesterol, una superficie constituida por fosfolípidos y colesterol libre, y una sola molécula de Apo-B (Grundy, 1990). El tiempo de vida de la partícula de LDL en el

plasma parece ser determinado principalmente por la disponibilidad de receptores específicos para esta lipoproteína en los tejidos. El 75% de LDL del plasma es captado por el hígado, en un proceso mediado por receptor (Ginsberg, 1990) mientras que el 25% restante es captado por otros tejidos (Grundy, 1990). Un 60-70% del colesterol es captado por estos tejidos en un proceso mediado por receptor.

El receptor de LDL es una glicoproteína superficial con un peso molecular de 120 kDa (Grundy, 1990). La glicoproteína superficial se une específicamente a la molécula de Apo-B presente en las partículas de LDL. El receptor para LDL también tiene la capacidad de unirse a Apo-E, presente en la mayoría de las lipoproteínas, incluyendo quilomicrones, VLDL y algunas subclases de HDL. Cuando las partículas de LDL se unen a su receptor, el complejo receptor-ligando se moviliza hacia los lisosomas, donde se disocia de las partículas de LDL siendo reciclado hacia la superficie de la célula para ser utilizado nuevamente, entonces las partículas de LDL son digeridas en los lisosomas. El componente proteínico es catabolizado a aminoácidos, mientras que los ésteres de colesterol son hidrolizados para producir colesterol libre, que se utiliza en la formación de membranas, hormonas, o para la síntesis de ácidos biliares en las células hepáticas .

Si el receptor para LDL se encuentra saturado la entrada de LDL por la vía independiente de receptor se ve incrementada. La vía de transporte independiente de receptor involucra la unión de las partículas de LDL a un sitio diferente del receptor y el proceso de

pinocitosis (Coverse, 1992). Una vez dentro de la célula, la vesícula pinocítica que contiene LDL se funde con un lisosoma primario cuyas enzimas degradan completamente la proteína y los lípidos de la LDL a aminoácidos y colesterol libre, respectivamente.

El contenido de colesterol celular es cuidadosamente regulado por el receptor de LDL. Si el contenido de colesterol celular se encuentra reducido, las células responden produciendo más receptores para LDL e incrementando la biosíntesis de colesterol. En ausencia de colesterol, la LDL provee la mayor parte de colesterol libre para la reacción de la LCAT, y al mismo tiempo desempeña el papel de receptor de los ésteres de colesterol generados bajo estas condiciones (Esfahani y Swanwy, 1990). Por otro lado, cuando hay colesterol disponible, se reduce el número de receptores para LDL en la célula. En estas condiciones no hay biosíntesis de colesterol, ya que la síntesis de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA-red), enzima limitante en la vía de síntesis de colesterol se encuentra inhibida.

Cualquier exceso intracelular de colesterol libre es reesterificado por la acil CoA colesterol aciltransferasa (ACAT) para su almacenamiento como glóbulos citoplasmáticos de ésteres de colesterol. La acumulación de un exceso de ésteres de colesterol se previene por una disminución en los niveles de síntesis del receptor para LDL lo que lleva a una disminución en la acumulación de LDL por endocitosis y por disminución en la síntesis de colesterol.

En aterosclerosis, un daño endotelial provoca que se incremente la entrada de lípidos, sobrepasando la capacidad del proceso de transporte mediado por receptor. La célula de músculo liso ingiere este material extraño por fagocitosis no específica y, la digestión lisosomal de LDL da como resultado un residuo insoluble de colesterol que se acumula en forma de ésteres de colesterol. Un incremento en la concentración plasmática de LDL por supuesto acelera el proceso.

El nivel de LDL óptimo es la cantidad mínima de LDL suficiente para llevar colesterol a las células. Se cree que es de 25 mg/dl. Valores plasmáticos cercanos a este valor pueden encontrarse en varias especies, que normalmente no desarrollan aterosclerosis. Sin embargo, la concentración de LDL en humanos adultos es 7 veces mayor, y se incrementa con la edad. Aunque no se conoce la razón para esto, se sabe que los niveles de LDL son influenciados por la dieta y por factores ambientales.

Metabolismo de HDL

La HDL tiene la función de transportar colesterol de los tejidos hacia el hígado. La partícula de HDL se ensambla en el plasma a partir de componentes de la degradación de otras lipoproteínas y adquiere su colesterol tomándolo de las membranas celulares y esterificándolo por la (LCAT) activada por la proteína Apo A-I presente HDL. La HDL

también transfiere colesterol a la partícula de VLDL en un proceso mediado por la colesteroester transferasa.

Estudios epidemiológicos indican que un incremento en la concentración plasmática de HDL disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Las mujeres en edad reproductiva presentan niveles más altos de HDL y son menos propensas a enfermedades cardiovasculares. Se sabe también que el ejercicio, la disminución de peso y las hormonas femeninas aumentan la cantidad de HDL en el plasma. Por el contrario, el tabaquismo disminuye la concentración de HDL. Curiosamente, en poblaciones que no presentan aterosclerosis se presentan bajas concentraciones tanto de LDL como de HDL.

La partícula de HDL constituye la especie más pequeña de las lipoproteínas. Esta lipoproteína es transportada fácilmente al endotelio vascular, así que su concentración en los tejidos es mucho más cercana a la concentración intravascular en comparación con la concentración de las otras lipoproteínas (Coverse, 1992).

Las partículas de HDL derivan de lipoproteínas secretadas por células parenquimales del hígado, de partículas similares secretadas por células del intestino o de partículas pequeñas formadas durante el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles (quilomicrones y VLDL), durante la hidrólisis de su núcleo (Gibbons, 1982).

Se ha descrito que la HDL promueve la proliferación del endotelio y evita la oxidación de LDL (Coverse, 1992). Las partículas de HDL presente en los fluidos intersticiales tienen la capacidad de remover el colesterol de las superficies celulares, siendo entonces este colesterol esterificado por la LCAT, permitiendo la remoción de más colesterol de las células. De esta manera la HDL en conjunción con LCAT pueden actuar como vehículo para el transporte de colesterol de diversos tejidos hacia el hígado (Gibbons, 1982).

Se considera que la concentración de colesterol de los tejidos es inversamente proporcional a la concentración de HDL en el plasma, lo que indica que la HDL tiene la capacidad de aceptar colesterol de los tejidos en una proporción mayor a las otras lipoproteínas. Una vez fuera de la célula el colesterol debe ser reesterificado para que pueda ser transportado en cualquier cantidad en el núcleo de estas lipoproteínas. Por lo tanto, aunque la HDL no sea el aceptor inicial del colesterol que sale de la célula, en algún punto debe retornar hacia el hígado contenido en las lipoproteínas HDL ya que éstas son el sitio de acción de la LCAT.

La relación inversamente proporcional que existe entre los TAG presentes en VLDL y el colesterol en HDL y la relación positiva que existe entre la actividad de la lipoproteína lipasa y el colesterol en HDL reflejan la transferencia de colesterol libre hacia HDL durante la degradación de los TAG.

Una vez sintetizado, el colesterol es transferido al núcleo de HDL, por lo que se considera que LCAT permite a HDL aceptar más colesterol libre ya sea de las superficies celulares o de otra lipoproteína. En la partícula de HDL la relación lecitina:colesterol libre es grande. lo que podría ser una de las razones que favorecen el que HDL sea un sustrato eficiente para LCAT (Gibbons, 1982). Sin embargo, se cree que la secreción de LCAT en el plasma no depende de la concentración de HDL (Gibbons, 1982).

El sistema LCAT-HDL juega un papel importante en la regulación del contenido de colesterol en las lipoproteínas y en las membranas celulares. Conforme los TAG del núcleo de las lipoproteínas ricas en quilomicrones y VLDL son degradados por la acción de la lipasa, la LCAT actúa sobre el colesterol superficial y los fosfolípidos de la HDL para formar ésteres de colesterol. Estos ésteres son entonces transferidos de HDL al núcleo de quilomicrones y VLDL.

Se ha propuesto por lo tanto que el papel de LCAT es mantener un gradiente de concentración de colesterol libre, permitiendo así la liberación de colesterol libre hacia el plasma y la remoción del mismo por las lipoproteínas junto con HDL (Sfahani y Swaney, 1990).

Tanto las concentraciones de colesterol en HDL (que puede ser considerado como medida del enriquecimiento con ésteres de colesterol de HDL) y Apo-AI (que puede ser

considerado como índice del número de partículas de HDL) se han utilizado como medida del riesgo de aterosclerosis. Los datos existentes indican que un bajo nivel de colesterol en HDL parece estar asociado con otras anormalidades en las lipoproteínas, principalmente en VLDL, IDL y LDL, que pueden afectar las últimas etapas del transporte inverso de colesterol (de los tejidos hacia el hígado), llevando a una distribución de los ésteres de colesterol por HDL de regreso a los tejidos periféricos incluyendo a las paredes arteriales (Ginsberg, 1990).

Proteína transportadora de ésteres de colesterol

La transferencia de colesterol esterificado así como de TAG entre las lipoproteínas del plasma, es catalizada por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) (Ahnadi y cols., 1993) que interviene en el intercambio de colesterol esterificado y TAG entre HDL y VLDL. En esta reacción la CETP estimula la transferencia de colesterol esterificado a VLDL y de triacilgliceroles a HDL (Tall, 1993).

En el plasma humano, la mayor parte de CETP se encuentra asociada a las partículas de HDL. Se ha encontrado una mayor actividad de CETP en conejos en respuesta a una dieta alta en colesterol y grasa (Tall, 1993). El incremento en la actividad se asocia a un

incremento en la concentración de mRNA para CETP en el hígado y otros tejidos, así como debido a un aumento en el contenido de colesterol en la enzima.

El ejercicio está asociado con una concentración menor de CETP, debido a una actividad de insulina más eficiente. La concentración de CETP está relacionada inversamente con la efectividad de acción de la insulina (Tall, 1993). Durante el ayuno se detecta mayor actividad de CETP probablemente debido a la movilización de ácidos grasos de los tejidos periféricos resultando en la síntesis de lipoproteínas en el hígado. El incremento en la actividad de CETP puede ayudar a la movilización de colesterol del tejido adiposo para su utilización en la síntesis hepática de lipoproteínas (Tall, 1993). La actividad de CETP también se ve modificada por la acción de hormonas esteroideas. Se ha detectado una actividad menor conforme decrece el colesterol plasmático durante el embarazo. La actividad de CETP se incrementa en el tercer trimestre de embarazo lo que sugiere un efecto de las hormonas sexuales en la síntesis y expresión de CETP (Tall, 1993).

Papel de la agregación plaquetaria en la aterosclerosis

La función más importante de las plaquetas es su papel en la hemostasis, i.e. la adhesión a superficies de tejido dañado y cohesión de unas con otras. La hemostasis o agregación se lleva a cabo en una serie de eventos que ocurren rápidamente y que llevan a la formación

de una masa sin estructura (coágulo o trombo) en el sitio de daño vascular. Este fenómeno puede ser desencadenado por una variedad de sustancias incluyendo la colágena, adenosin difosfato (ADP), epinefrina, serotonina y ristocetina.

Las plaquetas se adhieren a estructuras conectivas subendoteliales, cuando éstas se exponen durante un trauma vascular. La adherencia a las microfibrillas de colágena desencadena una serie de eventos que causan la agregación entre las plaquetas circulantes y las adheridas a las microfibrillas con la formación de tromboxanos y la liberación de ADP, epinefrina y varios factores plaquetarios que juegan un papel importante en la agregación plaquetaria.

La agregación plaquetaria es un mecanismo de defensa que actúa en conjunto con la respuesta inflamatoria y de reparación, ayudando a proteger la integridad del sistema vascular. La agregación plaquetaria normalmente está latente, pero se activa segundos después de producido un daño tisular.

La secuencia de eventos en la formación de un coágulo se propuso originalmente como una cascada de eventos (Davie y Ratnoff, 1964), compuesta de dos vías, la vía intrínseca y la vía extrínseca. En la vía intrínseca, cuya función es medida por el tiempo de tromboplastina parcial activada, el factor XII es activado al inicio del proceso de agregación plaquetaria, posteriormente se activan de manera secuencial de los factores

XI, IX, X y la protrombina. En la vía extrínseca, cuya función es medida por el tiempo de protrombina se forma un complejo entre el factor tisular y el factor VII seguido de la activación de los factores VII y X y protrombina.

In vivo la clave de la iniciación es el factor tisular. La exposición de superficies de tejido que contienen este factor a las proteínas plasmáticas produce la unión del factor VII al factor tisular. El complejo formado tiene actividad de coagulación baja y temporal (Zur y cols., 1982). El complejo VII es activado. La proteasa que activa al factor VII no se conoce, pero ya avanzada la cascada de coagulación otras proteasas pueden activar al factor VII. El complejo formado por el factor tisular y la forma activada del factor VII (factor VIIa) activa a los factores IX y X (Rao y Rapoport, 1988). Tanto el factor Xa como el factor VIIa pueden catalizar la activación del factor VII, así que existe un mecanismo potencial que acelera la activación del factor VII. Se sabe que en presencia de superficies con cargas negativas, la trombina y el factor XIa hay un mecanismo adicional para aumentar la activación del factor XI. El factor IXa unido al factor Va activa la protrombina en las superficies membranales. La trombina rompe al fibrinógeno dando fibrina monomérica que se polimeriza para formar el coágulo propiamente dicho.

La cascada de coagulación ocurre en las superficies membranales. De hecho, sólo en las superficies membranales de células estimuladas el proceso de coagulación procede eficientemente.

Las proteínas involucradas en la agregación plaquetaria se han aislado, sus secuencias de aminoácidos han sido determinadas y su función biológica ha sido definida. Los genes involucrados se han clonado (Furie y Furie, 1988). La pregunta hoy en día no es cómo coagula la sangre, sino cómo se detiene la coagulación. Algunos de estos mecanismos regulatorios se han identificado. La antitrombina III es un inhibidor de proteasas plasmáticas que sirve como un regulador de proteasas, cualquiera de las enzimas de agregación plaquetaria que se alejan del coágulo forman rápidamente un complejo con la antitrombina III y son inactivadas. La formación de estos complejos es generalmente acelerada por heparina, localizada en la microvasculatura o en las superficies de las células endoteliales. Otro mecanismo de regulación involucra a la proteína C, que activada por la acción de la trombina. Cuando la trombina forma un complejo con el receptor trombomodulina de la membrana endotelial inhibe la coagulación por su acción sobre el fibrinógeno y su papel en la activación plaquetaria. La concentración de las formas activas de las proteínas y la de los complejos que forman, definen la velocidad del proceso. El balance entre las vías de coagulación y las vías de destrucción de coágulo (fibrinólisis) está controlado, pero el mecanismo del balance no se conoce.

El sistema tiene una serie de mecanismos de seguridad. Cada componente es inactivo y debe ser activado para participar en la formación del coágulo. La mayoría de estos componentes forman complejos en las superficies membranales adecuadas, localizadas en

regiones dañadas. El daño vascular provoca que las plaquetas circulantes migren a la pared del vaso. Su adherencia está mediada por el factor de von Willebrand, una proteína plasmática de adhesión que se une a la glicoproteína Ib en la membrana de la plaqueta. Después de la estimulación, las plaquetas adheridas se degranulan y rápidamente expresan los receptores para el factor VIII, el factor V y la P selectina (un receptor para leucocitos). Las plaquetas se agregan en una interacción mediada por fibrinógeno y el receptor de fibrinógeno (complejo glicoproteína IIb-IIIa) formando el coágulo. La coagulación es iniciada por el factor tisular presente en células no vasculares que entran en contacto con la sangre en respuesta a un daño.

Cuando la coagulación se activa, las vías de coagulación se propagan en las superficies de las células en presencia de los cofactores plasmáticos necesarios unidos a las células y las reacciones culminan en la formación del coágulo de fibrina. Los monocitos circulantes, así como los neutrófilos interactúan con las plaquetas adheridas y estimulan a las células endoteliales con la P selectina, iniciando una serie de eventos de unión que lleva a la interacción estable de los leucocitos y las plaquetas con el trombo. Los neutrófilos y monocitos participan en la reacción inflamatoria local y los monocitos son inducidos a expresar el factor tisular y contribuyen a la trombogénesis y los primeros pasos en la reparación de una herida.

En lesiones ateroscleróticas de monos, conejos y humanos, las arterias contienen sitios en donde el endotelio se encuentra retraído y los macrófagos cargados de lípidos se exponen, en estos sitios puede ocurrir la interacción con plaquetas, provocando la formación de un trombo. Ross (1993) explica que estos macrófagos expuestos, como en otras respuestas inflamatorias, constituyen un intento de las células por reducir los lípidos circulantes y llevarlos al pulmón, hígado, médula y nódulos linfáticos (Faggiotto y Ross, 1984).

En las lesiones ateroscleróticas, las disfunciones endoteliales incluyen la deficiente producción de moléculas antitrombóticas como el sulfato de heparan el óxido nítrico y la PG2. En condiciones normales el endotelio participa en el balance entre la coagulación y la fibrinólisis al formar plasminógeno y urocinasa. En las lesiones ateroscleróticas la formación del activador del inhibidor de plasminógeno (PA-I) puede desviar el balance hacia un estado protrombótico que es particularmente dañino en las etapas avanzadas de la enfermedad (Gordon y cols., 1990).

En 1987, apoproteína a, la parte activa de la lipoproteína Lp (a) fue clonada y secuenciada. En la secuencia de cDNA de apoproteína a se encontró 80% de homología con el plasminógeno (McLean y cols., 1987). Esta homología, y la posibilidad de que la Lp (a) inhiba competitivamente la conversión de plasminógeno en plasmina, es la base de la relación de la aterogénesis con la trombosis. La Lp (a) compite con el plasminógeno en

la superficie endotelial de los vasos sanguíneos. Lp (a) también promueve la proliferación de células de músculo liso (Grainge y cols., 1993).

Recientemente se ha observado que la inserción del gene de apo a en ratones transgénicos que normalmente no expresan esta proteína, causa una disminución de la expresión de plasmina, disminuye el factor de crecimiento transformante y aumenta la proliferación de las células de músculo liso en la pared vascular (Grainger y cols., 1994). Se ha sugerido que la acumulación de Lp (a) es específica en órganos que muestran susceptibilidad a isquemia como la aorta y las arterias coronarias y en arterias cerebrales, principalmente en las células endoteliales y las capas subendoteliales, pero no en la media y en la adventicia (Jaimeson y cols., 1995).

Un trombo formado en la superficie de una lesión aterosclerótica puede complicar a ésta de una de las siguientes formas: el trombo en sí puede ser obstructivo y comprometer el flujo sanguíneo, las plaquetas activadas secretan, además de los factores de coagulación, factores de crecimiento y quimioattractantes como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la interleucina I (ILI) y el factor transformante de crecimiento (TGF). Todos estos factores inducen la proliferación de células de músculo liso e inducen la formación de otros factores de crecimiento por las células endoteliales, favoreciendo el desarrollo de la lesión. Un trombo en la superficie de una lesión aterosclerótica puede

desprenderse súbitamente de la placa y viajar a vasos de menor calibre provocando diversos tipos de infarto.

Inducción de aterosclerosis en animales por dietas hiperlipidémicas

La hipercolesterolemia es uno de los factores de riesgo para la aterosclerosis. La hipercolesterolemia ha sido el factor más comúnmente utilizado para producir aterosclerosis en modelos experimentales, especialmente en conejos, animales en los que la suplementación de la dieta con un mínimo de 1% de colesterol induce la formación de placas ateroscleróticas después de 13 o 14 semanas (Enomoto y cols., 1978, Araujo y cols., 1995).

La hipercolesterolemia acelera el proceso de aterosclerosis al inducir una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en el tejido vascular. La hipercolesterolemia causada por dieta eleva los niveles plasmáticos de LDL (Tyroler, 1987, Watts y cols., 1994), lipoproteína que es oxidada por ciertos tipos celulares presentes en la pared arterial, incluyendo a las células endoteliales. La modificación oxidativa hace a las partículas de LDL altamente citotóxicas (Morel y cols., 1984), y la LDL en su forma oxidada es captada mucho más eficientemente por células musculares o leucocitos en la pared arterial, que se convierten en células espumosas, cargadas de lípidos.

La hipercolesterolemia puede afectar la relajación del músculo liso vascular de la arteria dependiente de endotelio, probablemente debido a la lisofosfatidilcolina contenida en la partícula de LDL oxidada (Kugiyama y cols., 1996). El grupo de Cooke y cols. (1991) sugirió que la pérdida de la funcionalidad vascular es causada por una reducción en la síntesis y/o aumento en la degradación del factor relajante derivado de endotelio (EDRF), el cuál corresponde a la molécula de óxido nítrico o a algún metabolito derivado de éste. Estos autores se apoyan en el hecho de que el óxido nítrico es capaz de inhibir eventos importantes en el proceso aterosclerótico como son la adherencia y agregación plaquetarias (Radomski y cols., 1987), la proliferación de células de músculo liso (Garg y Hassid, 1989), y las interacciones endotelio-leucocitos (Johnson y cols., 1990).

Existe un considerable número de trabajos en los que se induce hipercolesterolemia en animales con dietas hiperlipidémicas. La Tabla 2 muestra diferentes tipos de dietas utilizadas para varias especies así como su efecto sobre el tejido vascular y los niveles de colesterol plasmático. Algunas especies, como el conejo han sido utilizadas de manera rutinaria como modelo de aterogénesis.

Tabla 2. Respuesta de algunas especies de animales a dietas hipercolesterolémicas

| Especie | Dieta o tratamiento | Tiempo | Lesiones ateroscleróticas | Colesterol sérico (mg/dl) | Referencia |
|----------------------|---|---------------|--|---------------------------|-------------------------|
| Hamster | Animales tratados con 50 mg/Kg. de estreptozotocina. Alimento estándar suplementado con 3% de colesterol y 15% de mantequilla | 24 semanas | Placa en la aorta con elementos lipídicos y fibrosos, presencia de calcificación | 748 | Simonescu y cols., 1996 |
| Pichón | 0.5% colesterol | 52 semanas | No se encontraron lesiones | 515 | Reagan y cols., 1990 |
| Rata wistar | Alimento estándar enriquecido con 4% de colesterol y 1% de ácido cólico | 12 meses | Lesiones fácilmente detectables en la aorta | 1,150 | Joris y cols., 1983 |
| Conejo Nueva Zelanda | Dieta estándar suplementada con 1% de colesterol | 12 semanas | 42% de lesiones en la aorta | 796 | Rokita y cols., 1991 |
| Codorniz japonesa | Dieta semipurificada conteniendo mantequilla, médula de bovino o aceite de soja y 0.5 o 5 g colesterol/Kg. | 9 semanas | Varias placas en la aorta | 61.2 (mmol/dl) | Yuan y cols., 1997 |
| Ratón C57BL1/6 | Animales tratados con poloxamero P-470. Dieta estándar conteniendo 15% de grasa y 1.5% colesterol | 300 días | Lesiones en la aorta de alrededor de $180.33 \mu^2 \times 10^{-3}$ | 1,000 a 1,500 | Nishina y cols., 1993 |
| Murciélago mexicano | Dieta a base de insectos, alta en grasa | | No se encontraron lesiones ateroscleróticas | 215 | Widmaier y cols., 1996 |
| Mono de Malasia | Dieta suplementada con 1 mg de colesterol por caloría y 43% de grasa | 18 meses | Lesiones fibrograsas en la arteria iliaca y estrías grasas en las arterias femorales | 780 | López y cols., 1991 |
| Mono rhesus | Dieta estándar enriquecida con 2% de colesterol | 14 a 30 meses | Lesiones con células con acúmulos de lípidos | 1,000 | De Palma y cols., 1972 |
| Cerdo | Dieta estándar suplementada con 2% de colesterol y 20% de médula de bovino | 50 días | Lesiones poco evolucionadas en las arterias coronarias con fibrina y fibrinógeno infiltrado. | 250 | Fuster y cols., 1978 |

Tabla 3. Efecto de diversos tratamientos terapéuticos sobre la aterosclerosis en conejos

| Terapia | Efecto | Referencia |
|---|---|---------------------------|
| W1372, N- γ -fenilpropil-N-benziloxiacetamida | Previene la formación de placas | Kritchevsky y cols., 1969 |
| Metformina, fenformina | Reducen el contenido lipídico celular. La metformina previene el desarrollo de lesiones en aorta y coronaria | Marquie, 1979 |
| THD-341, N-(2,6-dimethylphenyl)- δ -8-dihidro abietamida | Previene la formación de lesiones ateroscleróticas y la acumulación de colesterol en suero e hígado | Enomoto y cols., 1978 |
| Diltiazem | Baja el contenido de colesterol, colesterol esterificado y calcio en la aorta | Sugano y cols., 1988 |
| L-arginina | Disminuye el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en aorta y mejora la relajación dependiente de endotelio | Cooke y cols., 1991 |
| Aceite de pescado y verapamil | Reducen las lesiones en la aorta | Zhu y cols., 1990 |

El conejo Nueva Zelanda ha sido utilizado para el estudio de la aterogénesis, así como para la evaluación del efecto de diversas sustancias sobre la formación de placas. La tabla 3 muestra los efectos de algunas terapias evaluadas en conejos.

Se ha descrito que los conejos Nueva Zelanda desarrollan lesiones parecidas a las encontradas en humanos en respuesta a una dieta rica en colesterol (Enomoto y cols., 1978; Kjeldsen y cols., 1969; Wissler y Vesselinovitch, 1968; Marquie y cols., 1979; Araujo y cols., 1995; Kato y cols., 1998; Tijburg y cols., 1997). Otros autores han reportado que dietas suplementadas con 0.5 a 1.5% de colesterol inducen una considerable hipercolesterolemia en el conejo, induciendo niveles séricos de colesterol de alrededor de 500 mg/dl (Colangelo y cols., 1998; Newman y Zilversmit, 1962). Se ha reportado también que los incrementos en los niveles de colesterol pueden detectarse después de 21 días de alimentación con 0.5% de colesterol y continúan aumentando hasta llegar a 21 veces el nivel original después de 84 días (Pfister y cols., 1996).

Generalmente se describe que estas dietas suplementadas con colesterol inducen la formación de lesiones que ocupan más de 60% del área de la superficie de la aorta después de 10 o 12 semanas (Kugiyama y cols., 1996, Riezebos y cols., 1994). Böger y cols. (1998), después de 12 semanas de alimentar a los conejos con 1% de colesterol, encontraron que los niveles de colesterol aumentan de 24 mg/dl a 796 mg/dl, y que se produce un 42% de lesión sobre la superficie de la aorta. Incluso se ha descrito que una

dieta suplementada con un mínimo de 0.15% de colesterol induce la formación de estrías grasas en el conejo Nueva Zelanda (Tijburg y cols., 1997).

Inducción de aterosclerosis por manipulación genética

La hipercolesterolemia puede ser el resultado de una alteración genética, como es el caso de los conejos de la cepa WHHL (Watanabe heritable hiperlipidemic rabbit), desarrollada por Watanabe (1980). Estos conejos, alimentados con una dieta estándar, presentan niveles séricos de colesterol por arriba de 500 mg/dl, debido principalmente a un defecto en el transportador de LDL. A diferencia de lo que se observa en el humano, desarrollan estrías grasas constituidas casi exclusivamente por células espumosas derivadas de leucocitos, estas lesiones cubren casi por completo la superficie endotelial de la aorta cuando los conejos tienen 8 meses de edad.

Papel del metabolismo de la L-arginina en la aterosclerosis experimental en conejo

La L-arginina es un aminoácido alifático considerado como semiesencial en mamíferos, ya que aún cuando es sintetizado en el organismo se requiere ingerirlo en la dieta para mantener niveles adecuados en el organismo (Heald, 1979). El hígado y el páncreas son tejidos que tienen un mayor requerimiento de este aminoácido.

La L-arginina puede degradarse por hidrólisis mediada por la arginasa, no sólo como parte del ciclo de la urea, sino también en tejidos extrahepáticos. De esta reacción se forma urea y ornitina. La ornitina es el precursor en la síntesis de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina.

La L-arginina puede degradarse también por desaminación oxidativa, proceso por el cual se produce un radical guanidínico y se hace posible su utilización en la síntesis de creatina y de otros productos de gran actividad biológica (Méndez, 1989). La L-arginina participa directamente en la formación de tejido conjuntivo al formarse a partir de ella prolina e hidroxiprolina, aminoácidos constituyentes de la colágena. La L-arginina es un aminoácido glucogénico, además de participar, como la L-glicina y la L-metionina, en la síntesis de creatina, compuesto clave para la síntesis de fosfocreatina en el músculo y el tejido nervioso (Figura 3).

Debido a que la L-arginina es el precursor en la síntesis endógena de óxido nítrico (Palmer y cols., 1987), este aminoácido ha sido utilizado en dosis farmacológicas para mejorar la vasodilatación dependiente de endotelio (Girerd y cols., 1990). La administración crónica de pequeñas dosis de L-arginina mejora la vasodilatación dependiente de endotelio y reduce las lesiones ateroscleróticas (Cooke y cols., 1991). La L-arginina reduce la

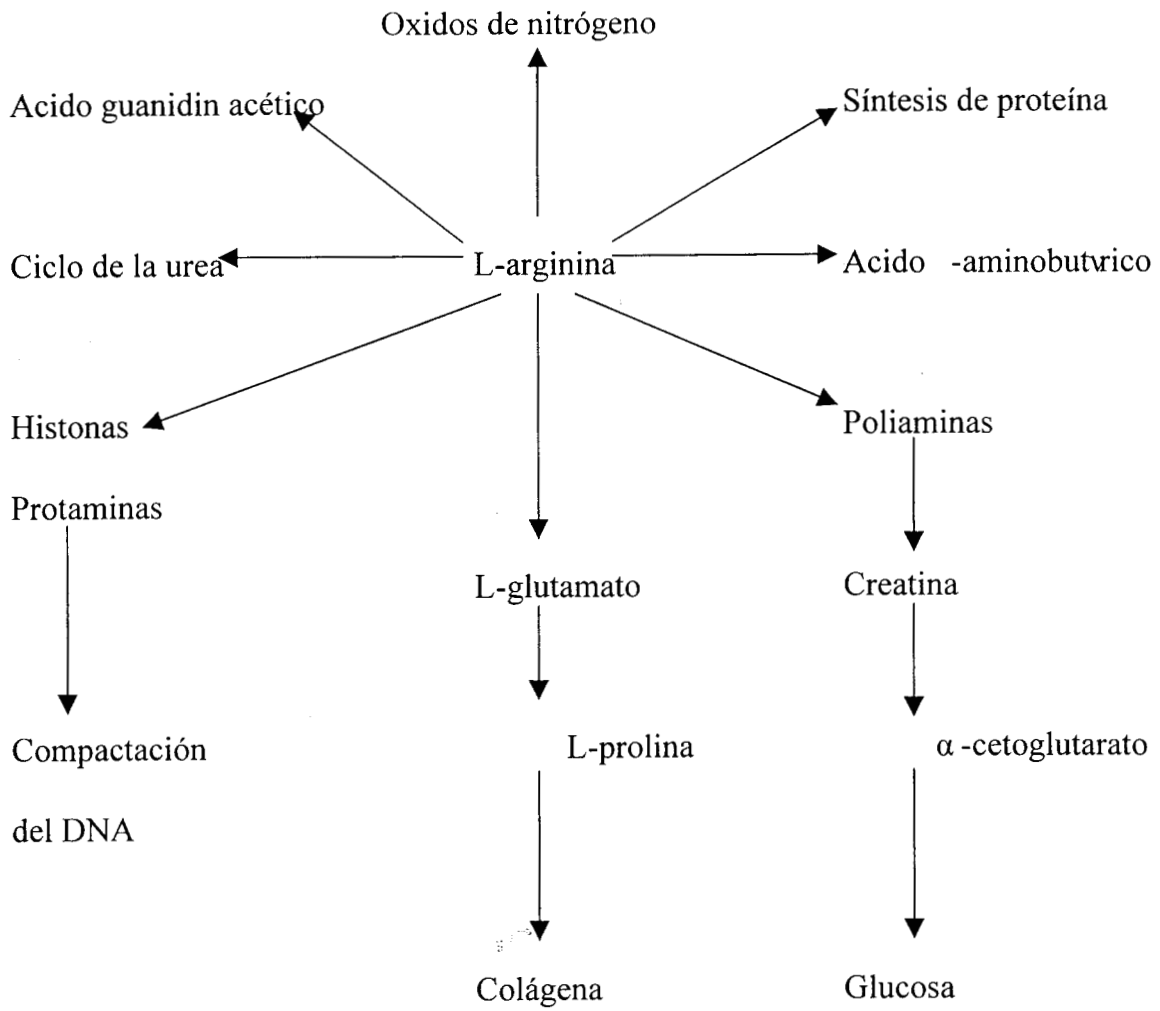


Figura 3. Destinos metabólicos de la L-arginina

adhesión de monocitos a células endoteliales y disminuye la expresión de ciertas moléculas de adhesión.

El grupo de Cooke (1991) describió que la L-arginina puede reducir el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en conejos Nueva Zelanda alimentados con 1% de colesterol. Los efectos benéficos de la L-arginina se han explicado con base en la producción de óxido nítrico en el tejido vascular (Cooke y cols., 1991; Böger y cols., 1998), ya que la formación de óxido nítrico por el endotelio puede prevenir la agregación plaquetaria la adhesión de leucocitos y promover la vasodilatación (Furchgott, 1983, Luscher, 1990). Sin embargo, no existen trabajos en los que se asocie una variación en las concentraciones de óxido nítrico con el efecto antiaterogénico de la L-arginina. Por otro lado, existe evidencia de que el óxido nítrico podría favorecer el proceso aterosclerótico. Una mayor cantidad de LDLox se produce como resultado de la acción del óxido nítrico o la enzima responsable de la formación de lipoxigenasa (Ylä-Herttuala, 1989), ambas moléculas secretadas por el endotelio dañado.

L-arginina también es el precursor metabólico de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina cuyas funciones, y su posible participación en la prevención del proceso aterosclerótico se exponen a continuación.

Características y funciones de las poliaminas

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina son bases alifáticas de bajo peso molecular (Heby, 1981). Se encuentran en forma libre o conjugada con fosfolípidos, carbohidratos, esteroides, péptidos y unidades subestructurales de alcaloide. La afinidad de las poliaminas por componentes ácidos es mayor que la de iones como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} o las monoaminas. Las funciones de las poliaminas deben estar determinadas entonces por su naturaleza catiónica.

En los mamíferos, incluyendo al hombre, la espermidina y la espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos en una concentración aproximada de 1mM, mientras que en el fluido seminal la espermina alcanza una concentración de 25 mM (Méndez, 1989; Persson, 1990). La putrescina se encuentra en concentraciones más bajas, excepto en tejidos que están estimulados para el crecimiento como la médula ósea (Tabor y Tabor, 1984). Es interesante mencionar que los niveles de poliaminas se incrementan por la acción de hormonas, drogas, procesos de regeneración de tejidos y factores de crecimiento (Bethell y cols., 1982)

La arginasa, que cataliza la hidrólisis de la L-arginina para producir ornitina y urea, es considerada una de las enzimas de la vía biosintética de poliaminas en tejidos

extrahepáticos (Méndez y Arreola, 1992). Produce ornitina para la subsecuente formación de putrescina, el precursor de las otras poliaminas.

En los mamíferos, la ornitina descarboxilasa cataliza la formación de putrescina a partir de ornitina (Bachrach, 1973; Tabor y Tabor, 1984) (Figura 4), esta enzima tiene un número de recambio extremadamente pequeño en células de mamífero (10 min.), y aumenta dramática y rápidamente después de un estímulo de crecimiento.

Las poliaminas poseen estructuras similares a la L-arginina y sus efectos sobre la óxido nítrico sintasa de cerebro fueron estudiados por Hu y cols. (1994) quienes encontraron que las poliaminas inhiben la conversión de L-arginina a L-citrulina por la óxido nítrico sintasa, sin embargo, las poliaminas no están involucradas en la estimulación de la NO sintasa mediada por N-metil-D-aspartato por lo que, probablemente, el papel de las poliaminas en este respecto no sea de importancia fisiológica.

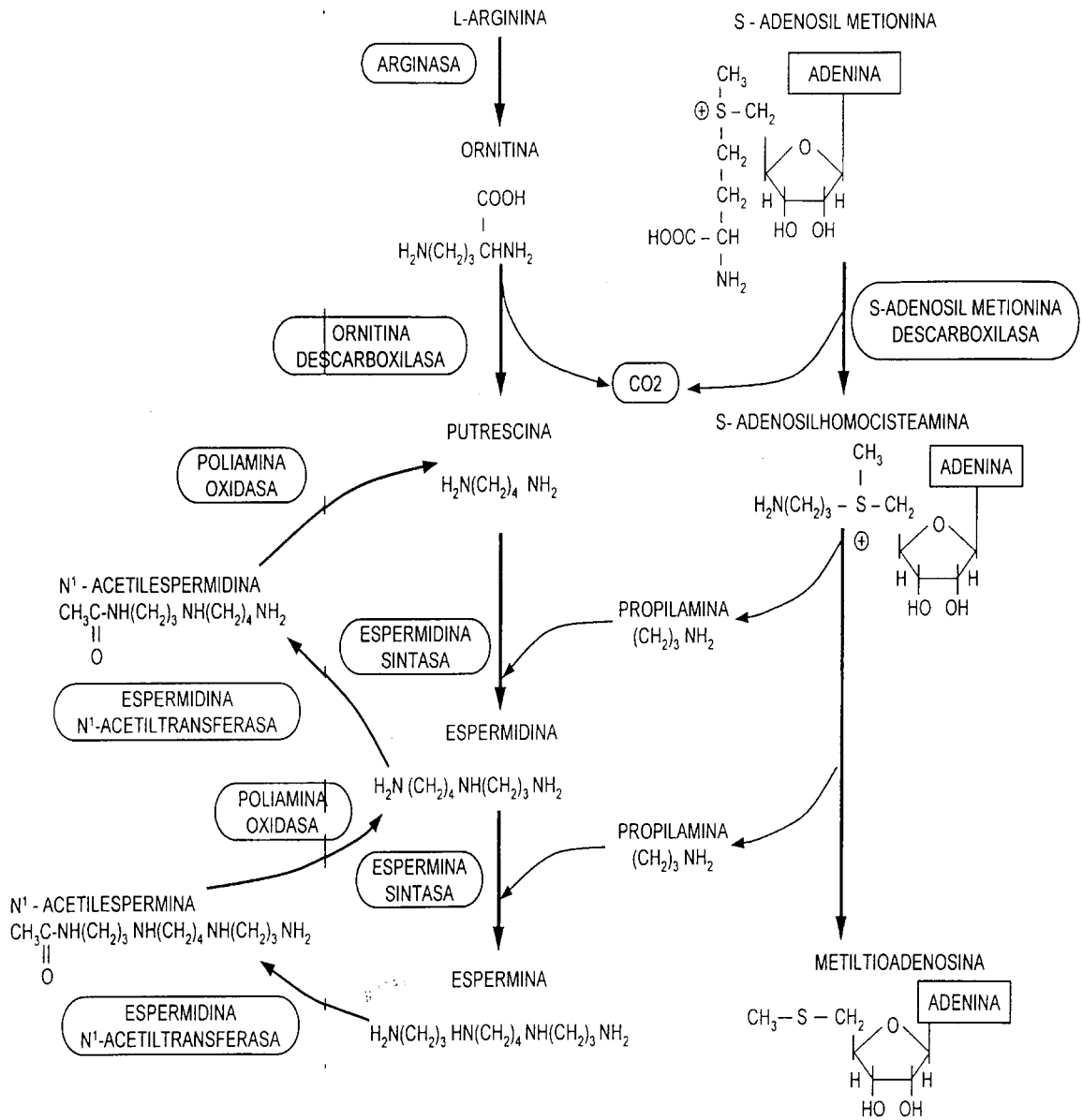


Figura 4. Biosíntesis e interconversión de poliaminas.

Se sabe que las poliaminas intervienen en procesos de proliferación celular y síntesis proteínica. Está bien establecido que la disminución en la concentración de putrescina y espermidina disminuyen la velocidad de proliferación celular (Mamont y cols., 1978) y que las concentraciones de poliaminas se incrementan en condiciones en la que aumenta la división celular. En el tracto gastrointestinal, por ejemplo, se presentan episodios de aumento en la proliferación asociados a incrementos en los niveles de poliaminas en la mucosa. Las poliaminas producen inhibición reversible de la respuesta de síntesis de DNA estimulada por fibroaglutinina, concanavalina A o lipopolisacáridos bacterianos, e inducen la respuesta citolítica de linfocitos.

Las poliaminas pueden afectar significativamente a las membranas biológicas (Schuber, 1989) y de esta manera modular la transducción y la transmisión de señales mediadas por receptores (Koenig y cols., 1983). Debido a sus propiedades químicas, estas moléculas pueden cambiar la fluidez de las membranas por entrecruzamiento electrostático con diversos componentes membranales, modificando indirectamente diversas actividades membranales de manera simultánea. Hay evidencia de que las poliaminas pueden estabilizar enzimas asociadas con las membranas del retículo endoplásmico y que interactúan con los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (Raina y Telaranta, 1967). De manera similar, las poliaminas interactúan con estructuras en la superficie

celular (Cuatrecasas, 1969) involucradas en diversas funciones de la insulina, modulando de esta manera el transporte y el metabolismo intracelular de varias sustancias.

Se conocen efectos citoprotectores de las poliaminas que han sido evidenciados en un modelo de diabetes inducida por aloxana (Méndez y Arreola, 1992). En presencia de poliaminas, el daño pancreático causado por aloxana, un agente utilizado para inducir diabetes en animales es menor (Méndez y Arreola, 1992). En el estado diabético, las concentraciones de putrescina disminuyen y se restablecen cuando se administra L-arginina (Méndez y Arreola, 1992), lo que indica que la L-arginina aumenta la síntesis endógena de poliaminas. La reducción en la concentración de poliaminas en ratas diabéticas está acompañada de una disminución en la actividad de arginasa, enzima que sintetiza ornitina, precursor de la síntesis de poliaminas. La actividad de arginasa también se normaliza con la administración de L-arginina (Méndez y Arreola, 1992).

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina previenen la embriotoxicidad y el desarrollo retardado causado por aloxana en ratas (Méndez y Balderas, 1999), resultados que han sido explicados con base en las propiedades antioxidantes de las poliaminas (Lovaas, 1997). La L-arginina y la espermidina pueden, también, disminuir la acumulación de colágena en riñones de ratones diabéticos, efecto que puede deberse a la protección de compuestos carbonilo, abundantes en el estado diabético (Marx y cols., 1995).

Se ha propuesto que las poliaminas pueden ayudar a regular la interacción entre la fosfolipasa y las membranas celulares, lo que facilitaría la acción de los ácidos grasos y permitiría a las células aumentar su capacidad de síntesis de TAG cuando aumenta el aporte de ácidos grasos (Martin-Sanz y cols., 1985). Las poliaminas también son capaces de modular el grado de daño a la mucosa causado por ciertos estímulos. Thirumalai y cols. (1987) encontraron que el pretratamiento de animales con poliaminas reduce significativamente la lesión causada por etanol ácido administrado intragástricamente o por solución hipertónica de cloruro de sodio. Kivietys y cols. (1992) demostraron que la administración intrayeyuno de ácido oléico daña el ordenamiento de las vellocidades intestinales, y que concentraciones de espermina y de espermidina, normalmente encontradas en el quimo postrandial (0.5 mM) evitan este daño, efecto que no puede ser producido por L-lisina o la L-arginina, lo que indica que no es debido a la carga eléctrica de las moléculas.

La espermina inhibe la peroxidación en microsomas de hígado de rata, debido a la interacción de las poliaminas con los fosfolípidos de las membranas (Tadolini y cols., 1984). Siendo más efectiva la espermidina (IC_{50} 0.04 mM) que la espermina (IC_{50} 0.18 mM).

En el tejido vascular, altas concentraciones de putrescina (10 mg/Kg) pueden producir hipotensión y taquicardia (Rossi y cols., 1984). Concentraciones micromolares de poliaminas estimulan la entrada intracelular de calcio a las células endoteliales de la vena umbilical (Morgan y cols., 1990), lo que podría resultar en la liberación de sustancias vasoactivas como el factor relajante derivado de endotelio (Moncada y cols., 1991). Bogle y cols. (1994) demostraron que el transporte de poliaminas a células endoteliales en cultivo tiene valores de $K_{0.5}$ de 2 μM y 0.6 μM para putrescina y espermidina, respectivamente y es sensible a la disminución de L-arginina.

La espermidina y la espermina no inhiben el transporte de putrescina, y la putrescina y la espermina no inhiben el transporte de espermidina, esto sugiere que existen transportadores independientes para cada una de las poliaminas. La sensibilidad del transporte de putrescina a la falta de L-arginina pero no a la falta de L-ornitina (Bogle y cols., 1994) sugiere que la L-arginina regula el metabolismo de poliaminas y su transporte a las células endoteliales. De tal manera que los factores que afectan la utilización de L-arginina también afectarán el metabolismo de poliaminas.

Las enzimas que oxidan las poliaminas están presentes en todos los tejidos de mamífero. La actividad de poliamina oxidasa aumenta durante el embarazo, lo que se cree juega un papel en la regeneración de factores inmunosupresores que contribuyen a proteger al feto

de rechazo materno. Los macrófagos contienen poliamina oxidasa y la liberan en cultivos que contienen lipopolisacáridos bacterianos.

Los macrófagos, al liberar poliamina oxidasa cerca de otras células inflamatorias regulan sus funciones. Se sabe que los linfocitos contienen cantidades nanomolares de espermina, y al morir estas células liberan suficientes poliaminas para interactuar con el suero. Las células del sistema inmune son muy sensibles a poliaminas en comparación con los fibroblastos. En fetos y tejido neoplásico hay antígenos específicos contra poliaminas, pero no experimentan rechazo inmunológico. Se ha encontrado que 40 μM de espermidina inhibe el movimiento de los macrófagos en presencia de suero bovino (Ferrante, 1985). Todo esto indica que las poliaminas son reguladoras de la respuesta inmune.

Joseph y cols. (1987) estudiaron el efecto de las poliaminas sobre plaquetas aisladas. Utilizaron un sistema en el que se induce la agregación plaquetaria por diversos agentes. En estos estudios una concentración de 10 mM de espermina fue suficiente para producir una total inhibición de la agregación plaquetaria. Por el contrario, utilizando colágena la inhibición solamente alcanzó el 50%. Méndez y cols. han descrito la inhibición de la agregación plaquetaria por L-arginina y poliaminas en ratas normales y ratas diabéticas (Bethell y cols., 1982). La agregación plaquetaria se inhibe en mayor proporción en

presencia de espermidina y, también se describe una menor actividad de arginasa en la rata diabética (Bethell y cols., 1982).

La espermidina y la espermina estimulan la oxidación de glucosa a CO₂ e inhiben la lipólisis. Estos efectos de las poliaminas se observan entre 1 y 50 μM, en condiciones en las que la concentración de glucosa es menor a 30 mM (Lockwood y cols., 1971) en adipocitos. La espermidina inhibe la lipólisis inducida por epinefrina o teofilina pero no por dibutilil AMPc, es decir, en las células adiposas, las poliaminas, así como la insulina inhiben la lipólisis suprimiendo los niveles de AMPc y facilitando el transporte de glucosa. El mecanismo de acción de las poliaminas no se conoce, pero se cree que no es un efecto debido a la carga de las moléculas, ya que a la misma fuerza iónica, la putrescina no tiene efecto. Como el efecto de las poliaminas es inhibido por análogos de la glucosa se cree que las poliaminas facilitan el transporte de glucosa. Concentraciones milimolares de poliaminas en células beta del páncreas disminuyen la cantidad de mRNA al interactuar con estas moléculas o con enzimas que lo degradan. La inhibición de la síntesis de poliaminas en las células beta disminuye la cantidad de mRNA para insulina mientras que la glucosa puede aumentar los niveles de síntesis de poliaminas. La L-arginina también estimula la secreción de insulina (Nogowski y Nowak, 1986).

La L-arginina y la espermidina tienen un efecto antihiper glucémico y son capaces de normalizar los niveles de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas en ratas diabéticas

(Méndez y Balderas, 1999). Estos efectos se han explicado por la acción antilipolítica de las poliaminas formadas a partir de L-arginina. La espermidina y la espermina aumentan la oxidación de glucosa e inhiben la lipólisis suprimiendo la producción endógena de AMPc de manera similar a la insulina en adipocitos aislados de rata (Furie y Furie, 1988).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva que se desarrolla en la capa íntima de las arterias, en respuesta a factores de riesgo entre los que se encuentra la hipercolesterolemia. Los principales fenómenos involucrados en el proceso aterogénico son la acumulación de lípidos en la capa íntima de las arterias, la proliferación de las células de músculo liso vascular y la agregación plaquetaria. En las lesiones ateroscleróticas la deficiente producción de moléculas antitrombóticas como el sulfato de heparan, el óxido nítrico y la prostaglandina E2 favorece la activación de la agregación plaquetaria. Las plaquetas activadas secretan factores de crecimiento y quimioattractantes que inducen la proliferación de células de músculo liso y estimulan a las células endoteliales para que formen otros factores de crecimiento, lo que favorece el desarrollo de la lesión.

La L-arginina ha sido utilizada para prevenir la formación de lesiones ateroscleróticas y mejorar la función contráctil de arterias en conejos hipercolesterolémicos. El efecto benéfico de la L-arginina se ha explicado en términos de la síntesis endógena de óxido nítrico, sin embargo este mecanismo no ha sido confirmado. En nuestro laboratorio se ha estudiado por varios años el metabolismo de las poliaminas y su precursor biosintético la L-arginina. Se ha encontrado que la administración de L-arginina incrementa la síntesis endógena de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) en un modelo de rata

diabética y que las poliaminas protegen de daño tisular, inhiben la agregación plaquetaria y tienen efectos antioxidantes. Por tanto, el papel regulador de las poliaminas, en procesos como el daño tisular, la agregación plaquetaria y la oxidación de lipoproteínas, podría tener un papel benéfico en la prevención de la aterosclerosis.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Establecer un modelo de aterosclerosis experimental en conejo, adecuado al tipo de estudio.
- Evaluar el efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria en el modelo de aterosclerosis experimental en conejo.

Objetivos particulares

- Establecer si existen diferencias entre las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, TAG, colesterol-LDL y colesterol-HDL de conejos control y conejos alimentados con 1 y 10% de colesterol.
- Establecer si existen diferencias entre la concentración sérica de L-arginina y la actividad de arginasa de conejos control y conejos hipercolesterolémicos.
- Evaluar el efecto de la L-arginina, putrescina, espermidina y espermina sobre la agregación plaquetaria en conejos control y conejos hipercolesterolémicos.

- Evaluar por medio de microscopía óptica la formación de ateromas en conejos Nueva Zelanda alimentados con dietas suplementadas con 1 y 10% de colesterol.

METODOLOGIA

Modelo de conejo hipercolesterolémico

Se utilizaron 15 conejos machos Nueva Zelanda con peso promedio de 4.5 Kg. Los animales fueron separados en jaulas individuales, y se alimentaron a libertad con alimento normal para conejo. Después de 2 semanas de adaptación se formaron 3 grupos de 5 conejos cada uno.

Grupo 1: conejos control, alimentados con una dieta normal para conejo durante 10 semanas.

Grupo 2: conejos alimentados con una dieta para conejo enriquecido con 1% de colesterol y 10% de aceite de maíz, durante 10 semanas.

Grupo 3: conejos alimentados con una dieta para conejo enriquecido con 10% de colesterol durante 10 semanas.

Toma de muestras

Se tomaron 4 ml de sangre de la vena central de la oreja al principio y al final del experimento. La sangre se centrifugó a 250 x g durante 10 min., y se determinaron los niveles séricos de glucosa, colesterol, TAG, LDL-colesterol y HDL-colesterol. En el caso del grupo 2 estas mediciones se realizaron cada semana.

Para las pruebas de coagulación y determinaciones de arginina y arginasa se tomaron muestras de sangre de conejos control y conejos alimentados con 10% de colesterol al final de las 10 semanas. Se tomaron 15 ml de la vena central de la oreja recolectando la muestra de sangre en un tubo con citrato de sodio al 3.8%, de manera que quedó una relación sangre : anticoagulante 9:1. La sangre se centrifugó a 250 x g durante 10 min. para preparar el plasma rico en plaquetas (PRP). Se recogió el PRP utilizando una punta de plástico hacia un tubo de plástico, se tapó y se mantuvo a temperatura ambiente. Para preparar el plasma pobre en plaquetas (PPP) se centrifugó el precipitado a 1500 x g durante 10 min., el plasma se mantuvo a temperatura ambiente y tapado. El ensayo de agregación se realizó inmediatamente ya que este debe realizarse en los 30 min. siguientes a la separación del PRP o 4 horas después de que la sangre ha sido extraída.

Aislamiento de aortas

Al final de las 10 semanas los conejos fueron anestesiados con xilazina 7 mg/Kg. i.m., ketamina 2.5 mg/Kg. i.m. y pentobarbital 20 mg/Kg. i.v. La aorta aislada se abrió longitudinalmente, se lavó 10 min. en isopropanol 60%, posteriormente se tiñó con rojo oleoso 3% en isopropanol 60% y finalmente se lavó 10 min. en isopropanol 60%. Se examinó la presencia de lesiones ateroscleróticas y se guardaron fragmentos de aorta y corazón en formol 10% para estudiar los tejidos por medio de microscopía óptica.

Preparación de alimento enriquecido con 1% de colesterol

Las croquetas de conejo (Conejina E.F., Purina, Chow) se embebieron en una solución de aceite de maíz con colesterol (1g colesterol/100 gramos de alimento) a 100°C.

Preparación de alimento enriquecido con 10% de colesterol

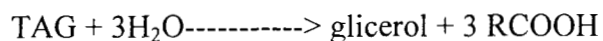
El alimento normal para conejo fue molido y mezclado con la cantidad adecuada de colesterol en polvo (10g de colesterol / 100g de alimento). Se le añadió agua (1000 ml/kg. de alimento) y

se pasó la mezcla por un molino para rehacer las croquetas. Las croquetas formadas se dejaron secar por 2-3 horas a temperatura ambiente.

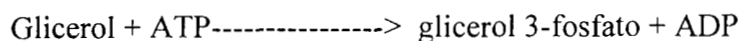
Determinación de TAG

Se determinaron con el método enzimático colorimétrico de Wahlefeld (1979) basado en la hidrólisis enzimática de los TAG por la lipasa y en la determinación enzimática del glicerol formado, por medio de las enzimas glicerol-cinasa, fosfoglicerol-oxidasa y peroxidasa; produciéndose peróxido de hidrógeno que forma un complejo colorido con el reactivo de color 4-aminofenazona y 4-clorofenol cuya absorbencia se mide a 620 nm la cual es directamente proporcional a la concentración de TAG en la muestra. Las reacciones involucradas son las siguientes:

Lipasa

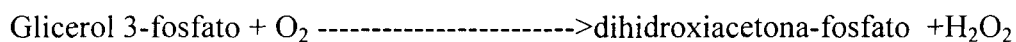


Glucocinasa

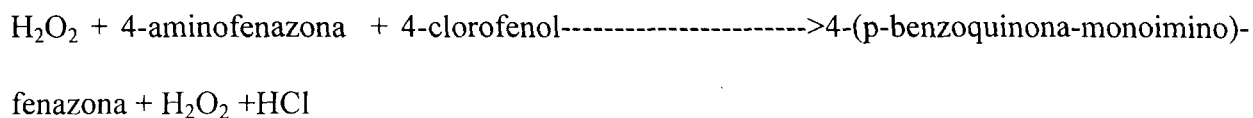


Glicerol fosfato

oxidasa



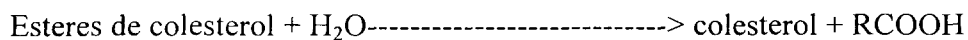
Peroxidasa



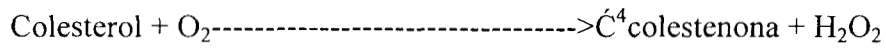
Determinación de colesterol total

Se cuantificó por el método de Siedel y cols. (1983) y Katterman y cols. (1984) que se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los ésteres del colesterol por la colesterol esterasa y la oxidación del colesterol libre por la colesterol oxidasa. La concentración de colesterol es directamente proporcional a la absorbencia a 540 nm que da el complejo formado con el reactivo de color 4-aminofenazona y fenol con el H₂O₂ que se produce al oxidarse el colesterol libre. Las reacciones involucradas son las siguientes:

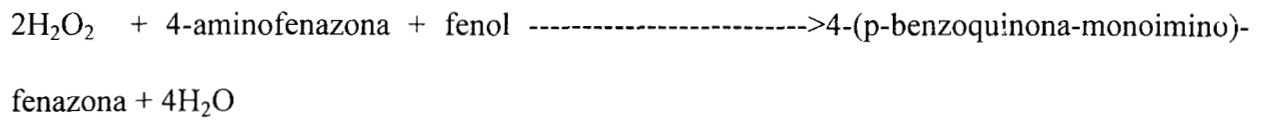
Colesterol esterasa



Colesterol oxidasa



Peroxidasa



Determinación de colesterol-HDL

Se determinó por el método modificado por López-Virella y cols. (1977). Este método se basa en la adición de iones magnesio y ácido fosfotúngstico a la muestra, lo que provoca la precipitación de los quilomicrones, las VLDL y las LDL. El sobrenadante de la centrifugación a 1500 x g durante 10 min. contiene las HDL cuya concentración de colesterol es determinada enzimáticamente como se describió anteriormente.

Determinación de colesterol-LDL

Se calculó el contenido de colesterol de las LDL por medio de la fórmula de Friedewald y cols. (1972) y Warnic y cols. (1990) que involucra la medición de colesterol total, TAG y HDL.

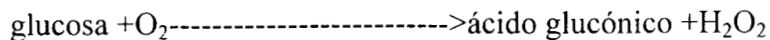
$$\text{LDL} = \text{CT} - \text{TG}/5 - \text{HDL}$$

Donde LDL es la concentración de colesterol-LDL, CT es la concentración de colesterol total, TG la concentración de TAG y HDL es la concentración de colesterol HDL. El cálculo de colesterol-LDL se considera válido solamente cuando los valores de triglicéridos se encuentran por debajo de 300 mg/dl.

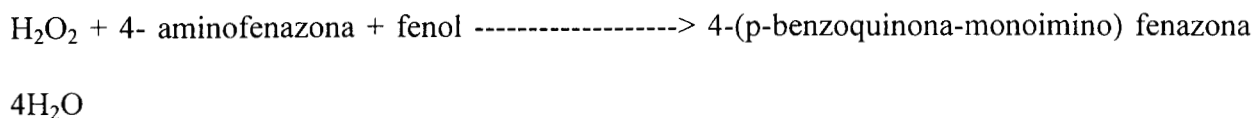
Determinación de glucosa

Se utilizó el método de Trinder (1969) que se basa en la oxidación de glucosa por la glucosa-oxidasa, con la subsiguiente cuantificación de peróxido de hidrógeno liberado, usando el reactivo de color 4-aminofenazona y fenol, el cual por medio de la peroxidasa forma un complejo colorido cuya absorbencia se mide a 540 nm. La concentración de este complejo es directamente proporcional a la concentración de glucosa. Las reacciones involucradas son las siguientes:

Glucosa oxidasa



Peroxidasa



Determinación de proteína

Se utilizó el método de Lowry (1951) utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La cuantificación colorimétrica de la proteína de una muestra utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu depende de la tirosina y triptofano presentes. El color se produce por la reducción del reactivo por los residuos de tirosina observándose una relación lineal entre la cantidad de proteína y la intensidad de color el cual se lee a 540 nm.

Determinación de actividad de arginasa y contenido de arginina

Se determinó por el método de Kung y cols. (1977), basado en la producción de urea y ornitina a partir de L-arginina por la arginasa. La urea forma, en solución ácida de diacetilmonoxima y en presencia de tiosemicarbazida, un complejo colorido que se mide a 530 nm. Tanto la

medición de arginasa como la de arginina utilizan este mismo principio, la diferencia en los ensayos radica en que en el caso de la arginasa se añade una cantidad conocida de arginina a la muestra de reacción y en el caso de la arginina se añade una cantidad conocida de arginasa a la mezcla de reacción.

Agregación plaquetaria

Se utilizó un método turbidimétrico para estudiar el efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación inducida por ADP y colágena (Rosemary y cols., 1976). Se utilizó un agregómetro Payton, y los porcentajes de agregación se calcularon utilizando el programa Crono-log. El porcentaje de agregación plaquetaria es directamente proporcional al aumento de transmitancia del plasma rico en plaquetas, producido en respuesta a un agente agregante como el ADP o la colágena. Para el ensayo se ajustó el número de plaquetas del PRP a 200,000 plaquetas / μ l diluyendo con PPP. La muestra se mantuvo a 37°C y con agitación. Se ajustó el aparato a 100% de transmitancia con el PPP a 37°C sin agitación. El porcentaje de agregación se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de agregación} = 90 - CR / 80 \times 100$$

donde CR es la lectura del problema.

Análisis de muestras por microscopía óptica

Las muestras fijadas en formol se procesaron tratándolas durante 2 horas con cada uno de los siguientes reactivos: formol 10%, alcohol 96°, alcohol absoluto y xilol. Las muestras procesadas se incluyeron en parafina formando bloques que se dejaron solidificar. Los bloques se mantuvieron a 4°C y se hicieron cortes de aproximadamente 4µm, en un microtomo. Los listones obtenidos se desparafinaron poniéndolos sobre un baño de agua con gelatina a 56-60°C y se recolectaron en portaobjetos. Posteriormente se desparafinaron en una estufa a 60°C durante 2 horas y se hidrataron para teñirlos. Los tejidos en las laminillas se hidrataron tratando con los siguientes reactivos: xilol, alcohol absoluto y alcohol 96°. Después de teñir los tejidos se deshidrataron con alcohol 96°, alcohol absoluto y xilol.

Tinción de hematoxilina/eosina

Esta tinción tiñe de azul los núcleos celulares (ácidos) y de rojo los citoplasmas (básicos). Los tejidos hidratados se tiñeron en hematoxilina de Harris (hematoxilina 5 g/l, alumbre de amonio y potasio 100 g/l, óxido rojo de mercurio 2.5g/l, ácido acético 2.5 ml/l y alcohol 96° 50 ml/l) 15-30 min., se lavaron en agua y se pasaron rápidamente por alcohol ácido (ácido clorhídrico 2.5 ml/400 ml de alcohol 96°), luego en agua carbonatada (hidróxido de amonio 2.5 ml/400 ml)

y finalmente 2 min. en eosina (eosina amarillenta 5g/460ml, dicromato de potasio 2.5 g/460ml, solución saturada de ácido pícrico 50 ml/460ml, alcohol absoluto 10ml/460ml). Posteriormente los tejidos se deshidrataron y se cubrieron con un cubreobjetos fijándolo con resina.

Tinción tricrómica de Masson

Esta técnica tiñe de azul la colágena (que se tiñe con colorantes ácidos de anilina). Da color rojo para músculo, rosa claro para citoplasma y tiñe de azul oscuro los núcleos. Los tejidos se desparafinaron e hidrataron, posteriormente se colocaron en la solución de Bouin (ácido pícrico 75 ml/100ml, formaldehído 25ml/100ml y ácido acético glacial 5 ml/100ml) 1 hora a 60°C. Se lavaron bajo el chorro de agua sin desprender el tejido hasta quitar el color amarillo. Se tiñeron en hematoxilina férrica o de Weigerts (preparada en el momento mezclando partes iguales de una solución de 2g hematoxilina/200ml de etanol y una solución de cloruro férrico 29% y ácido clorhídrico 1ml/200ml) durante 10 min. Se lavaron en agua corriente hasta quitar el color café (y que los núcleos estuvieran contrastados), se lavaron con agua destilada, se tiñeron en escarlata de Biebrich (escarlata de Biebrich 1%, 360 ml/400ml, fucsina ácida 1% 40 ml/400ml, ácido acético 1 ml/400ml) durante 15 min., se lavaron con agua destilada, luego se trataron con ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico (ácido fosfotúngstico 10g/200ml, ácido fosfomolibdico 10g/200ml) 15 min, se lavaron con agua destilada, se tiñeron en azul de anilina (azul de anilina 5g/200ml, ácido acético 8 ml/200ml) 15-20 min, se lavaron con agua destilada y luego en ácido acético 1% 1 min. Los tejidos se deshidrataron y se montaron las laminillas.

Tinción de Verhoeff-Van Giesen

Esta tinción tiñe de negro las fibras elásticas, de rojo la colágena y los núcleos celulares de gris o negro. Los tejidos se desparafinaron e hidrataron. Se tiñeron con hematoxilina de Verhoeff (hematoxilina 1g/40 ml, alcohol absoluto 20 ml / 40 ml, cloruro férrico 10% 8 ml/40, yodo de verhoeff (yodo 2g /100 ml, yoduro de potasio 4g /100ml) 8ml / 40ml) durante 15 min. o hasta que los tejidos se vieron negros, se lavaron con agua corriente durante 5 min., se introdujeron en la solución diferenciadora (cloruro férrico 2g/100ml) durante 1 min o hasta ver negras solamente las fibras elásticas, posteriormente en hiposulfito de sodio 5% 1 min y finalmente se lavaron con agua destilada, se deshidrataron y se montaron las laminillas.

Detección de grasa subendotelial

Una vez aisladas, las aortas fueron teñidas con rojo oleoso. Se lavaron en isopropanol 60% durante 10 minutos, luego se tiñeron en rojo oleoso 0.3% en isopropanol 60% y finalmente se lavaron en isopropanol 60%.

Para evaluar la presencia de grasa subendotelial se congeló el tejido cubriéndolo con Tissue Tek y se cortaron secciones de 10 μ m en un crióstato. Estos cortes fueron teñidos con rojo

oleoso como se indica a continuación: el tejido se lavó en propilenglicol durante 1 min., posteriormente se tiñó con rojo oleoso 1% en propilenglicol 80%, a 60°C, finalmente se lavó en propilenglicol al 80%.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan en promedios \pm D. E. Las comparaciones entre grupos se hicieron por el método de significancia t de Student no pareada.

RESULTADOS

Cambios en los niveles plasmáticos de lípidos y glucosa en los conejos alimentados con dietas ricas en colesterol

Se estudiaron los cambios en los niveles séricos de lípidos y glucosa en el grupo alimentado con colesterol al 1%. En la Figura 5 se observa que después de la primera semana de alimentación con colesterol los niveles de colesterol total y colesterol-LDL aumentan significativamente. La concentración plasmática de colesterol total se encuentra alrededor de 30 mg/ml al inicio del experimento y después de la primera semana se eleva por arriba de 100 mg/ml. La concentración inicial de colesterol-LDL se encuentra alrededor de 20 mg/ml y se eleva por arriba de 80 mg/ml después de la primera semana de alimentación con colesterol. Tanto los niveles de colesterol total como los niveles de colesterol-LDL permanecen constantes durante las 9 semanas siguientes. No existen cambios significativos en los niveles de glucosa y TAG debidos a la alimentación con colesterol. Se observó una ligera reducción en la concentración de colesterol-HDL.

En la Tabla 4 se muestran las concentraciones séricas de lípidos y glucosa en los conejos control y alimentados con las dietas ricas en colesterol al inicio y al final del experimento. Se encontró una diferencia significativa en los niveles séricos de colesterol después de alimentar a los conejos con una dieta rica en colesterol durante 10 semanas, tanto en el grupo alimentado con 1% de colesterol como en el grupo alimentado con 10% de colesterol. El colesterol plasmático se encontraba por debajo de 30 mg/dl al inicio del experimento, tanto en el grupo control como en los conejos alimentados con colesterol. Sin embargo, solamente en el grupo control los niveles de colesterol permanecieron constantes hasta el final del estudio.

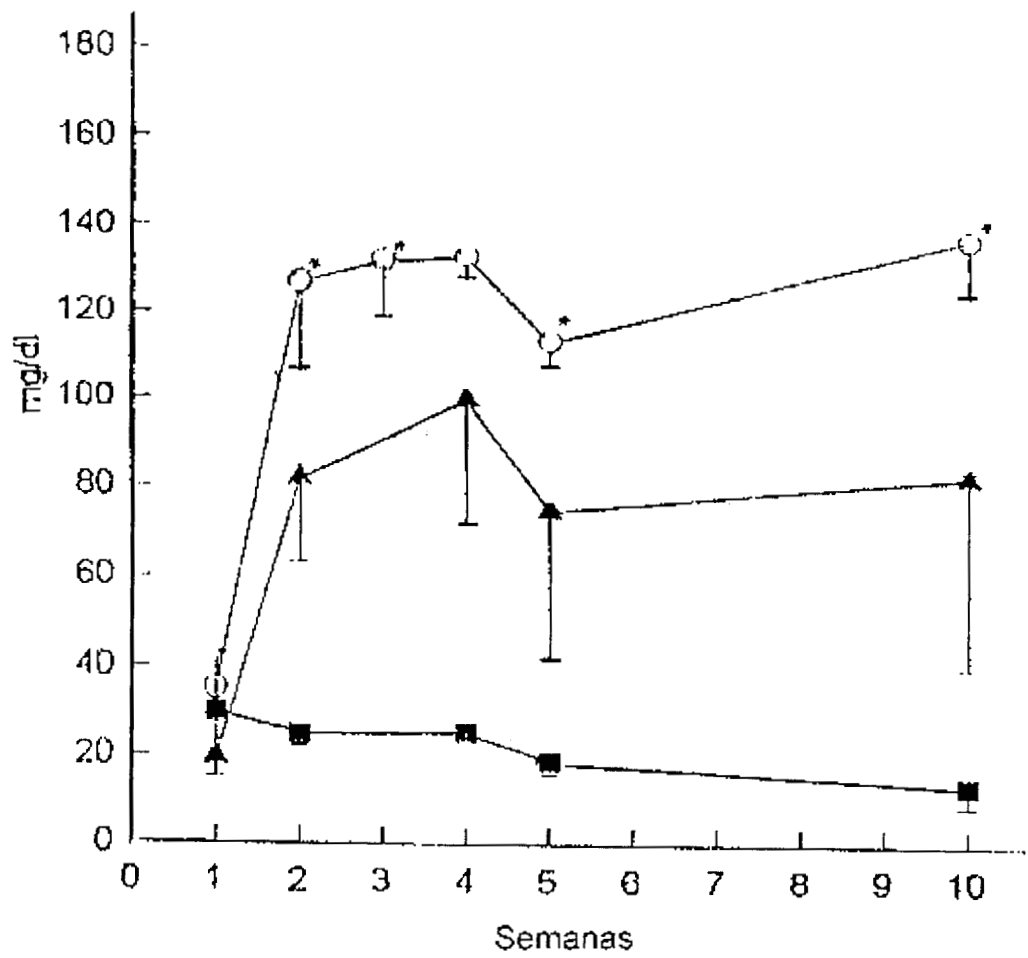


Figura 5. Niveles séricos de lípidos y glucosa con respecto al tiempo en conejos alimentados con colesterol al 1%. Se muestran los valores promedio \pm D.E. de 5 determinaciones. \circ colesterol, \blacksquare HDL, \blacktriangle LDL.

Tabla 4. Concentraciones séricas de lípidos y glucosa en conejos control y conejos alimentados con 2 dietas suplementadas con colesterol.

| | Control | | 1% colesterol | | 10% colesterol | |
|--------------------|--------------|-------------|---------------|---------------|----------------|--------------|
| | Semana 0 | Semana 10 | Semana 0 | Semana 10 | Semana 0 | Semana 10 |
| Glucosa | 163.4 ± 7.7 | 120.8 ± 3.8 | 149.8 ± 11.8 | 162.8 ± 23.7 | 98.0±7.9 | 126.3±6.6 |
| Colesterol | 29.6 ± 2.9 | 29.6 ± 2.9 | 35.4 ± 17.2 | 136.6 ± 38.0* | 26.3±8.1 | 1485.0±26.8* |
| TAG | 170.0 ± 22.2 | 127.2 ± 7.7 | 126.2 ± 27.9 | 102.8 ± 41.6 | 88.3±35.6 | 411.0±154.5* |
| LDL- colesterol | 12.3 ± 7.8 | 19.5 ± 4.1 | 19.5 ± 4.1 | 82.4 ± 14.2* | 15.9±5.9 | 1383.8±58.9* |
| HDL- colesterol | 34.8 ± 6.7 | 25.4 ± 3.0 | 30.5 ± 6.9 | 13.6 ± 10.8 | 14.3±5.8 | 19.0±4.5 |

Los valores están expresados en mg/dl.

Los valores corresponden a $\bar{X} \pm$ D.E. (n = 5).

* p <0.05 en comparación con el control.

De manera similar a lo que se observó para el grupo de conejos alimentados con 1% de colesterol, en los conejos alimentados con 10% de colesterol los cambios en los niveles séricos de colesterol total coinciden con los cambios en los niveles de colesterol-LDL (Tabla 4). Los niveles de colesterol total en el grupo alimentado con 10% de colesterol se encuentran alrededor de 30 mg/dl al principio del experimento y se elevan por arriba de 1400 mg/dl al final de las 10 semanas; de manera similar, los niveles de colesterol-LDL se elevan desde niveles 15.9 ± 5.9 hasta más de 1300 mg/dl. A diferencia del grupo alimentado con 1% de colesterol, los niveles de TAG sí aumentan significativamente debido a la alimentación con 10% de colesterol (de 80 a 400 mg/dl), y los niveles de HDL-colesterol no variaron significativamente. No se observaron cambios significativos en las concentraciones séricas de glucosa en ninguno de los 3 grupos.

Actividad de arginasa en conejos hipercolesterolémicos

En la Tabla 5 se presenta el número de plaquetas, la concentración de proteína total, concentración de arginina y actividad de arginasa tanto en el plasma de conejos control como en conejos alimentados con 10% de colesterol. No se encontraron diferencias entre los parámetros medidos de conejos normales y los conejos hipercolesterolémicos. Tanto en los conejos control como en los conejos hipercolesterolémicos se encontraron alrededor de 250 plaquetas/ μ l, la concentración de proteína en el plasma se encontró alrededor de 70 mg/ml y la actividad de arginasa se encontró alrededor de 2.5 nmol urea/mg proteína/min. El contenido de arginina en ambos casos es de alrededor de 700 nmol/mg proteína.

Tabla 5. Número de plaquetas, contenido de arginina y actividad de arginasa en plasma de conejos control y conejos hipercolesterolémicos.

| | Conejos control | Conejos hipercolesterolémicos |
|--|-------------------|-------------------------------|
| Número de plaquetas (plaquetas/ μ l) | 276.3 \pm 53.1 | 247.3 \pm 17.7 |
| Proteína total (mg/ml) | 64.6 \pm 10.6 | 67.5 \pm 17.7 |
| Contenido de arginina (nmol/mg proteína) | 793.4 \pm 401.4 | 704.3 \pm 322.2 |
| Actividad de arginasa (nmoles urea/mg proteína/min.) | 2.49 \pm 0.9 | 2.66 \pm 0.6 |

Los valores corresponden a $\bar{X} \pm$ D.E. (n = 5).

Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria

La Figura 6 muestra las gráficas generadas del ensayo de agregación plaquetaria. La adición de colágena induce un aumento de transmitancia en PRP de conejos control de aproximadamente 50% con respecto a un 100% de transmitancia del PPP. La L-arginina estimula significativamente la agregación plaquetaria.

La Figura 7 muestra el efecto de las poliaminas sobre la agregación plaquetaria en PRP de conejos control, utilizando colágena como agente agregante. Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina tienen un efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria, inhibiendo considerablemente el aumento en transmitancia inducido por colágena.

En la Figura 8 puede observarse el efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria de plasmas control en respuesta a ADP. Se observa también un efecto estimulador de la L-arginina sobre la agregación y un efecto inhibitorio de las poliaminas. El efecto inhibitorio es similar para las 3 poliaminas y menor que el producido en presencia de colágena.

El PRP obtenido de los conejos hipercolesterolémicos presenta una hiperagregabilidad como se muestra en la Figura 9, tanto en presencia de ADP (Figura 9A) como en ausencia de agonista (Figura 9B). Sin embargo, en presencia de colágena la agregación presentada por el PRP de conejos hipercolesterolémicos es similar a la de conejos control (9C).

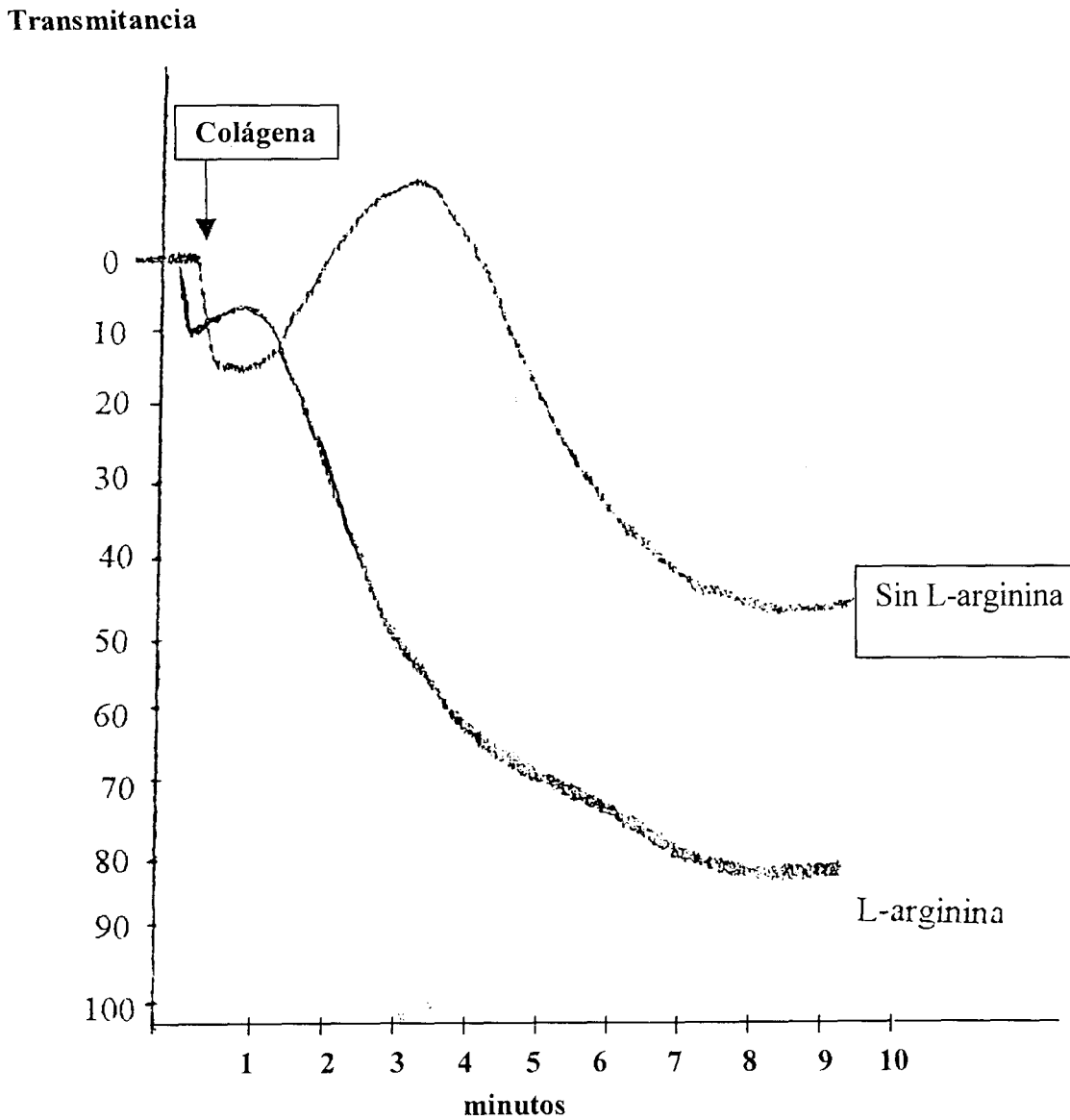


Figura 6. Agregación plaquetaria en conejos control en presencia de colágena. Se muestra el aumento en transmitancia de una muestra de PRP a 37°C en agitación, la flecha indica el momento en el que se añadieron 2 μg de colágena/ml. Con la adición del agonista la transmitancia aumenta un 50% aproximadamente. La L-arginina tiene un efecto estimulante de la agregación plaquetaria (L-arginina).

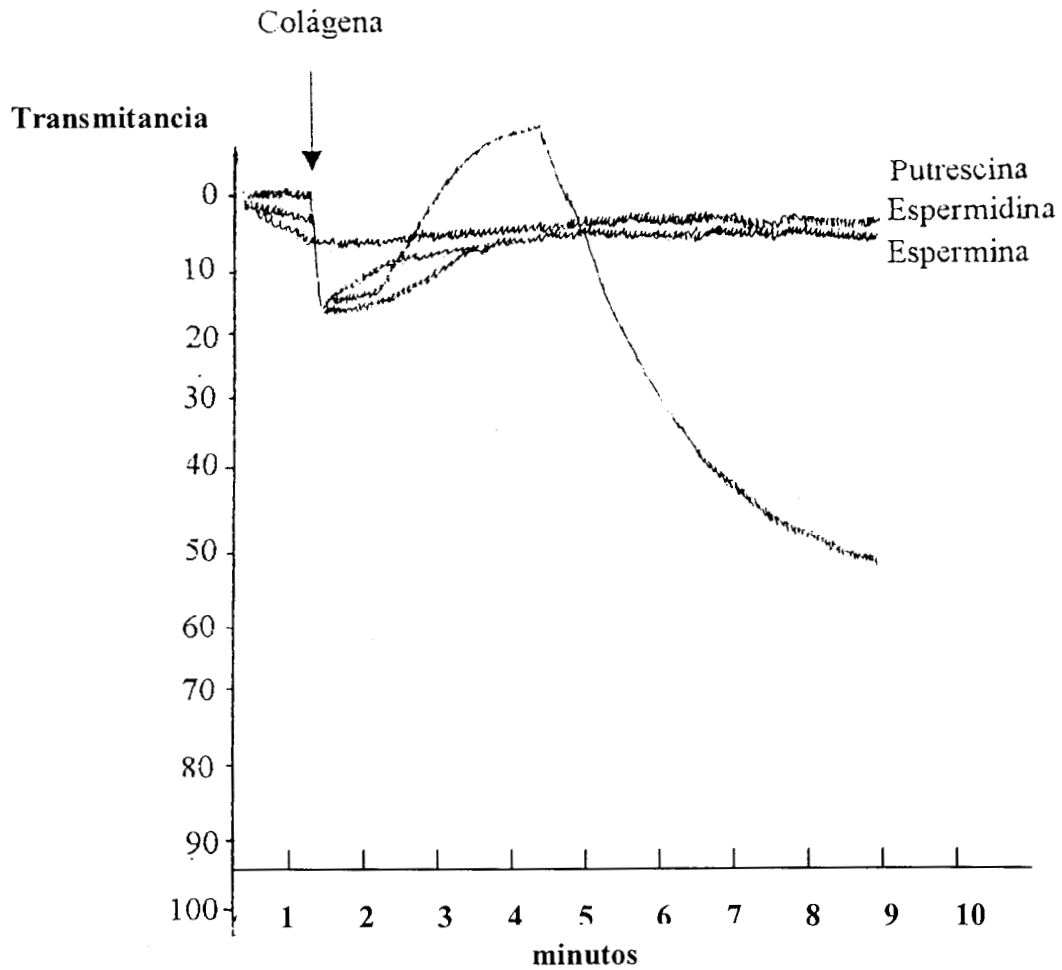


Figura 7. Efecto de las poliaminas sobre la agregación plaquetaria en conejos control en presencia de colágena como agente agregante. La colágena induce una agregación de aproximadamente 50%. Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina reducen la agregación a un 20% aproximadamente.

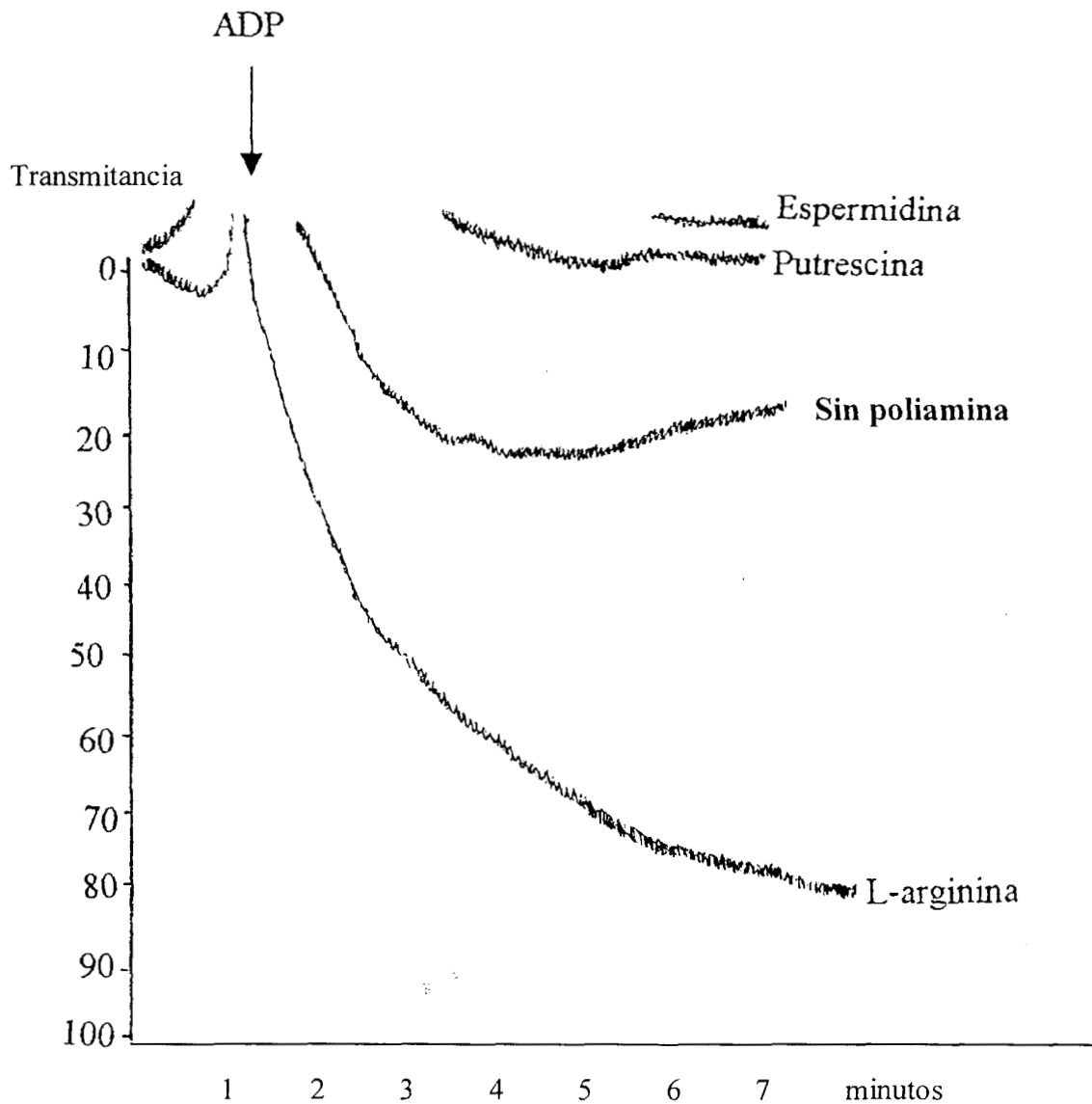


Figura 8. Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria de conejos control en presencia de ADP como agente agregante. La adición de 2.5 nmol ADP/ml (flecha) produce un aumento en la transmitancia del PRP de aproximadamente 20%. La L-arginina estimula este efecto provocando una agregación del 80% aproximadamente, mientras que las poliaminas inhiben la agregación a menos del 10%.

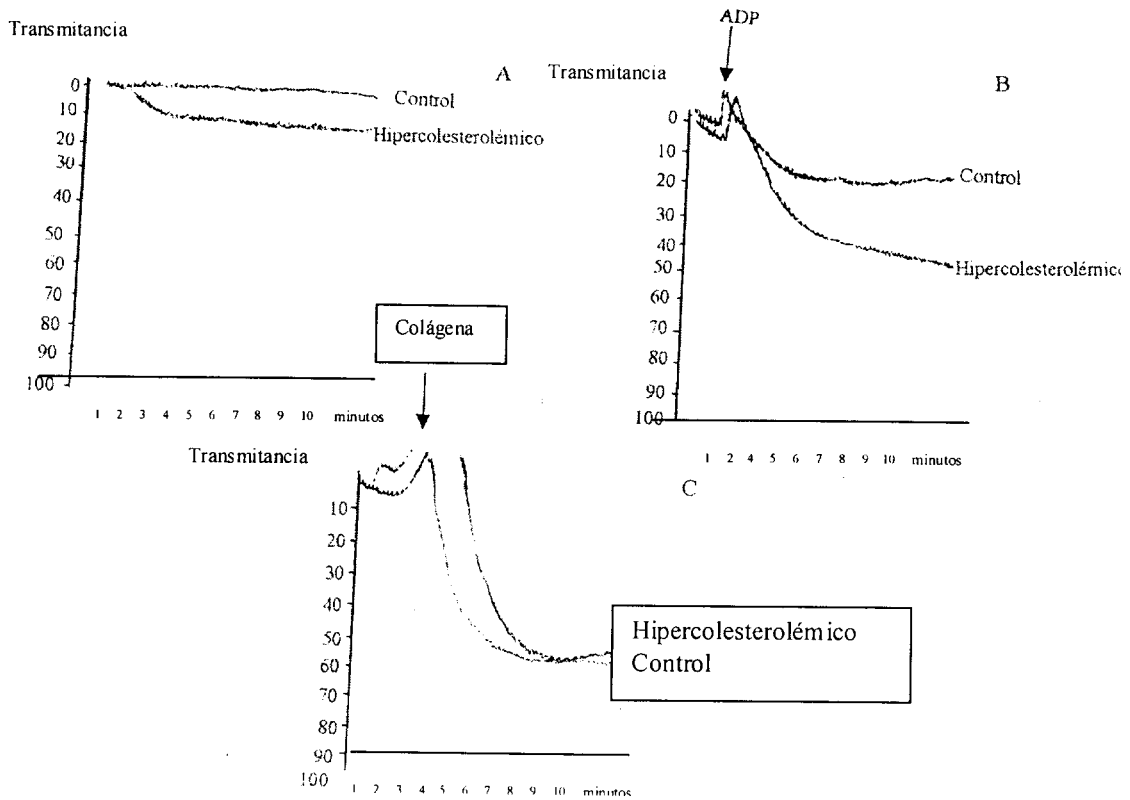


Figura 9. Agregación plaquetaria en PRP de conejos hipercolesterolémicos. En condiciones de hipercolesterolemia el PRP presenta agregación plaquetaria aún en ausencia de agonista (A), y la agregación es mayor que la presentada por PRP de conejos control utilizando ADP como agonista (B). La agregación es similar en ambos tipos de conejo cuando se utiliza colágena como agente agregante (C).

En el caso de los conejos hipercolesterolémicos también se observó un efecto estimulador de la L-arginina y un efecto inhibitorio de las poliaminas sobre la agregación (Figura 10A). Se evaluó también el efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación en ausencia de agonista (Figura 10B). En este caso, la L-arginina y la putrescina tuvieron un efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria, mientras que la espermidina y la espermina no inhibieron la agregación plaquetaria.

En la Tabla 6 se muestran los valores de los porcentajes de agregación plaquetaria en los conejos control. Se observa que la L-arginina estimula la agregación en un 284%, mientras que la putrescina inhibe la agregación en un 75.7%, la espermidina 82.5 y la espermina 80.5% utilizando ADP como agente agregante. Si se utiliza colágena como agonista, la L-arginina estimula la agregación un 62.8%, mientras que la putrescina inhibe la agregación un 79.2%, la espermidina 73.2% y la espermina 80.2%.

En el caso de los plasmas de conejos hipercolesterolémicos, la agregación en respuesta al ADP es estimulada un 100%, mientras que la putrescina inhibe la agregación un 20%, la espermidina un 49% y la espermina un 54.4% (Tabla 7). En el caso de los conejos hipercolesterolémicos solamente se hicieron ensayos con ADP como agonista, ya que el plasma de estos conejos es más viscoso y se obtiene una cantidad menor que la obtenida de conejos control.

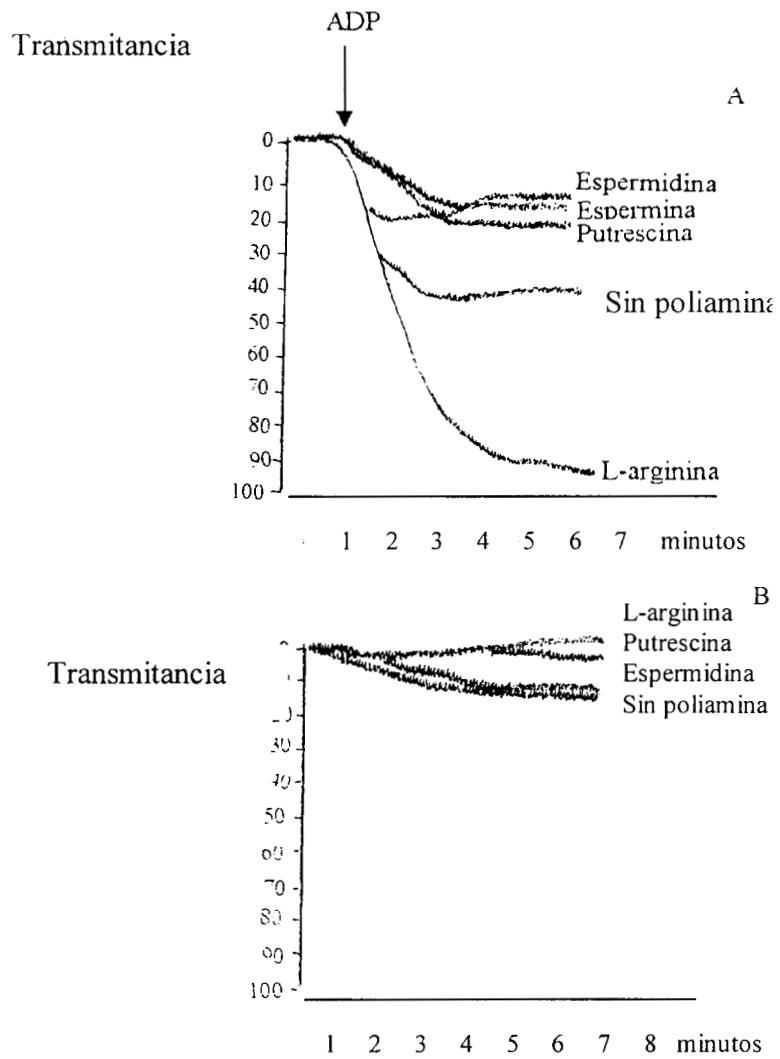


Figura 10. Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria en conejos hipercolesterolémicos. La agregación plaquetaria en presencia de ADP es estimulada por L-arginina e inhibida por poliaminas (A). En ausencia de agonista, tanto la L-arginina como las poliaminas ejercen un efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria (B).

Tabla 6. Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria de plasma de conejos control.

| Agonista | Control | L-arginina (10 μ M) | Putrescina (10 μ M) | Espermidina (10 μ M) | Espermina (10 μ M) |
|-----------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| ADP (2.5 μ moles/ml) | 20.7 \pm 2.8 | 79 \pm 5.1* | 5.0 \pm 3.0* | 3.6 \pm 1.1* | 4.0 \pm 2.8* |
| Colágena (2 μ g/ml) | 57.3 \pm 18.4 | 93.3 \pm 11.5* | 11.6 \pm 2.8 | 15.3 \pm 0.5 | 11.3 \pm 1.1 |

Los valores están expresados en porcentaje de agregación.

Los valores corresponden a $\bar{X} \pm$ D.E. (n = 5)

* p < 0.05 en comparación con el control.

Tabla 7. Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria de plasma de conejos hipercolesterolémicos.

| Agonista | Control (10 μ M) | L-arginina | Putrescina (10 μ M) | Espermidina (10 μ M) | Espermina (10 μ M) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| ADP (2.5 μ moles/ml) | 42.6 \pm 3.0 | 85.2 \pm 12.4 | 33.8 \pm 4.2* | 21.6 \pm 3.7* | 19 \pm 4.2* |

Los valores están expresados en porcentaje de agregación.

Los valores corresponden a $\bar{X} \pm$ D.E. (n = 5)

* p <0.05 en comparación con el control.

Evaluación de lesiones ateroscleróticas

Se analizaron las aortas torácicas y abdominales del grupo control y los grupos alimentados con colesterol. La Figura 11 muestra la estructura de la aorta torácica de un conejo control, teñida con la técnica de Verhoeff van Giesen, se observan las 3 capas características de la arteria: la capa íntima formada por una monocapa de células endoteliales, la capa media formada por capas alternadas de células musculares y fibras elásticas y la capa adventicia formada principalmente por colágena.

No se encontraron lesiones ateroscleróticas o acumulación de lípidos en la capa subendotelial, en el caso de los conejos control, ni en los conejos alimentados con 1% de colesterol y 10% de aceite de maíz. (Figura 12b).

Solamente en uno de los conejos del grupo alimentado con colesterol al 1% y 10% de aceite de maíz se observaron alrededor de 4 lesiones puntiformes en la aorta torácica. Las lesiones encontradas corresponden a acúmulos de grasa subendotelial (Figura 13a, 13b) y forman pequeños abultamientos en la capa íntima de la arteria que contienen restos celulares (Figura 13c-13f).

En el caso de los conejos alimentados con colesterol al 10% se encontraron pequeñas lesiones macroscópicas principalmente en la región del cayado de la aorta. La Figura 14b muestra un fragmento de las lesiones encontradas en estos conejos. Se observa un importante acúmulo de material subendotelial que produce un abultamiento hacia el lumen del vaso.



Figura 11. Micrografía de un fragmento de aorta torácica de conejo Nueva Zelanda. Se observa la capa íntima (i) formada por una monocapa de células endoteliales, la capa media (m) con capas alternadas de células musculares y fibras elásticas (en negro) y la capa adventicia (a) formada principalmente de colágena (en rojo). Tinción de Verhoeff van Giesen. x 400.

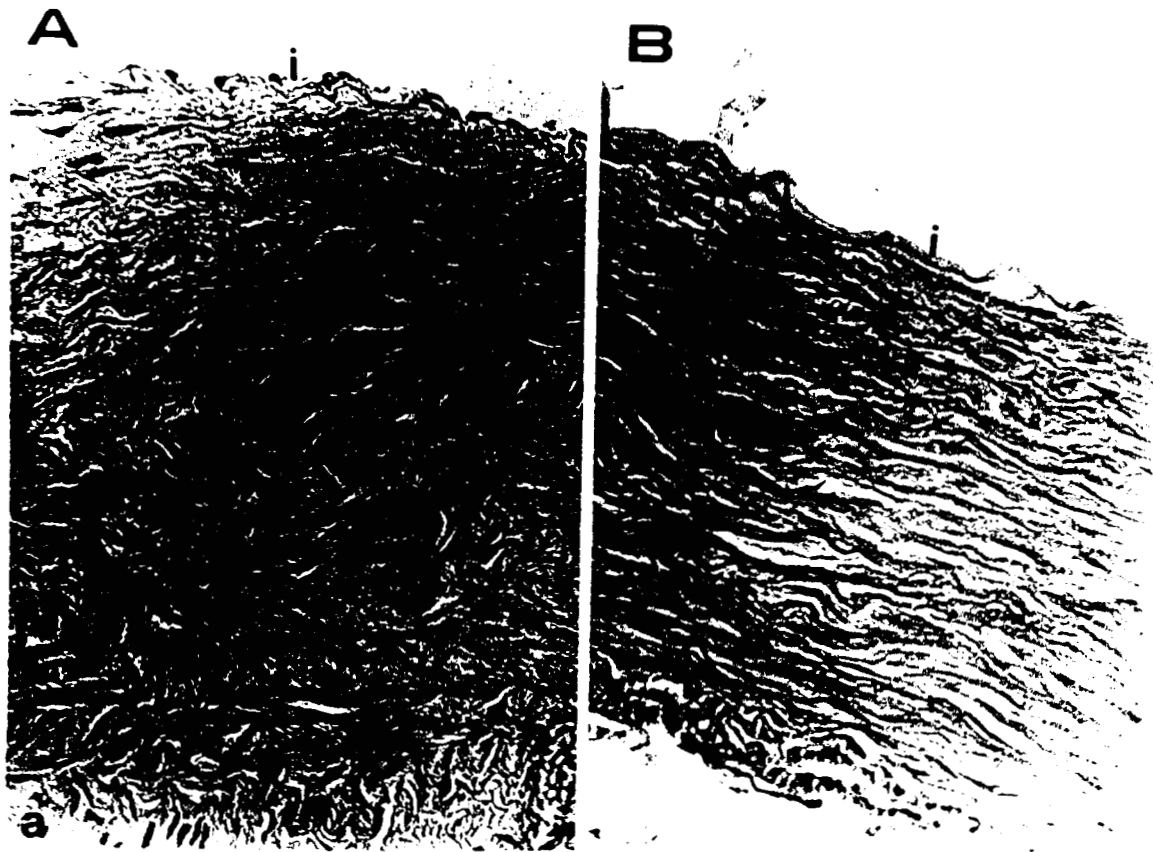


Figura 12. Micrografías de aorta de conejo Nueva Zelanda A) control y B) conejo alimentado con 1% de colesterol y 10% aceite de maíz. En ninguno de los dos casos se observan alteraciones en la estructura de la arteria, en la capa íntima (i), media (m) o adventicia (a). Tinción de hematoxilina / eosina. x 400.



Figura 13. Lesión aterosclerótica puntual en la aorta de un conejo alimentado con 1% de colesterol y 10% aceite de maíz. A) y B) tinción en fresco con rojo oleoso. Se observa un acúmulo subendotelial de lípido. x 150 y x 400 respectivamente. C) y D) Tinción tricrómica de Masson de otra lesión aterosclerótica puntual. x 150 y x 400 respectivamente. E) y F) fragmento de la misma lesión teñida con hematoxilina/eosina, se observa un pequeño abultamiento en la capa íntima de la arteria, con restos celulares y un espacio vacío que probablemente estuvo ocupado por lípido. x 150 y x 400 respectivamente.

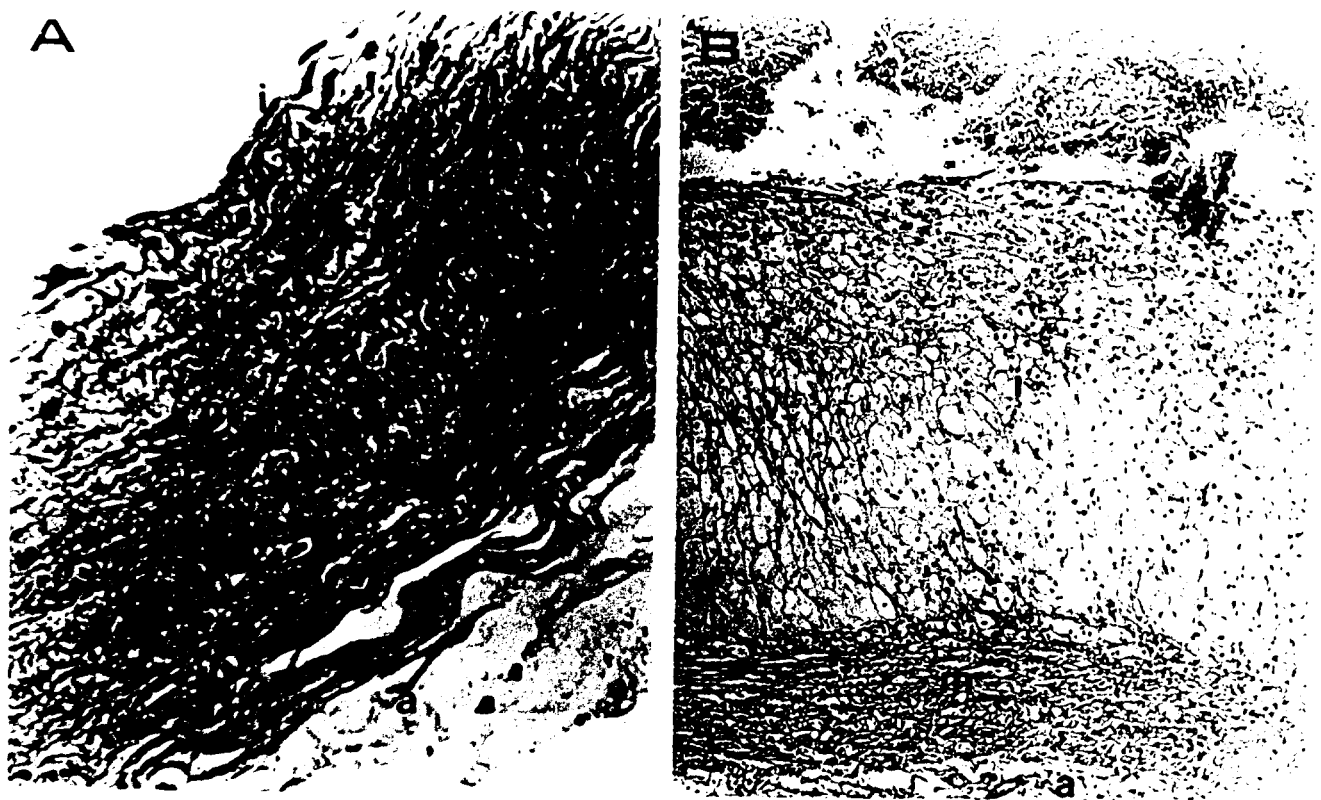


Figura 14. Micrografías de aorta torácica de un conejo control (A) y un conejo alimentado con 10% de colesterol durante 10 semanas. X 400. (B) se observa un importante engrosamiento de la capa íntima de la arteria, con numerosas células espumosas tanto en la capa íntima como en la capa media. X 150. Intima, i; media, m; adventicia, a.

DISCUSION

Cambios en los niveles séricos de lípidos en conejos alimentados con colesterol

Nuestros resultados demuestran que después de alimentar a los conejos con una dieta suplementada con 1% de colesterol durante 10 semanas, se produce un incremento de 3.3 veces en el colesterol sérico total (alrededor de 100 mg/dl). Sin embargo, otros autores han reportado que con esta misma dieta el colesterol sérico alcanza niveles de 500 mg/dl (Cooke y cols., 1991; Kugiyama y cols., 1996). Davies y cols. (Davies y cols., 1996) reportaron un incremento de 20 veces en el colesterol sérico, utilizando una dieta suplementada con 1% de colesterol durante 8 semanas; Verbeuren y cols. (Verbeuren y cols., 1986) por su parte, reportaron un incremento de 30 veces utilizando una dieta suplementada con 0.28% de colesterol, también durante 8 semanas. En los dos estudios antes mencionados, los niveles iniciales de colesterol se encuentran alrededor de 30 mg/dl, que corresponde al valor inicial de colesterol en los conejos utilizados en este trabajo. Lo anterior indica que posiblemente existe un factor adicional al colesterol de la dieta para que puedan alcanzarse niveles tan elevados de colesterol en la sangre.

En nuestros experimentos, el colesterol sérico en los conejos alimentados con 1% de colesterol aumentó en la primera semana de la dieta, pero estos cambios no inducen

la formación de ateromas en la aorta. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pfister y cols. (1996), quienes mostraron que después de utilizar una dieta complementada con 2% de colesterol por dos semanas se incrementa el colesterol sérico, pero no existe acumulación de lípidos en la aorta. McGill y cols. (1995) señala que después de 2 semanas de una alimentación suplementada con 2% de colesterol pueden detectarse cambios en los niveles séricos de colesterol pero sin causar aterosclerosis. Estos autores no encontraron lesiones en la aorta después de 4 semanas, pero sí un marcado desarrollo de éstas después de 8 semanas. Estos mismos autores también encontraron que el colesterol continúa aumentando hasta incrementarse 21 veces después de 84 días de tratamiento. Nosotros, sin embargo, encontramos que después de la primera semana de alimentación con colesterol los niveles de colesterol sérico se incrementan, y permanecen constantes durante el resto del experimento.

A diferencia de lo que ocurre con el colesterol total, los cambios que ocurren en las lipoproteínas, en los conejos alimentados con 1% de colesterol, parecen ser más graduales, estabilizándose a partir de la quinta semana. Los resultados presentados aquí indican que los niveles de colesterol-LDL tienden a aumentar hasta niveles muy cercanos a los del colesterol total. Aparentemente el colesterol sérico se incorpora, en su mayor parte, a la partícula de LDL. El perfil lipídico en los animales alimentados con una dieta rica en colesterol correspondió al perfil asociado con el

desarrollo de lesiones ateroscleróticas reportado por otros autores, es decir niveles elevados de colesterol total y colesterol-LDL.

En este trabajo no se hicieron mediciones de Lp (a), sin embargo es posible que su concentración haya aumentado en los conejos hipercolesterolémicos que desarrollaron lesiones ateroscleróticas, ya que una elevación en la concentración de estas lipoproteínas ha sido asociada a la formación de ateromas, especialmente en la capa íntima de la aorta (Jaimeson y cols., 1995).

En el caso de los conejos alimentados con 10% de colesterol, el colesterol total se incrementó 56 veces, incremento similar al que reportamos para el colesterol-LDL; lo que probablemente indica que el colesterol sérico se incorpora casi en su totalidad a la partícula de LDL. Los niveles de colesterol total y colesterol-LDL de los conejos alimentados con 10% de colesterol son similares a los reportados por otros autores que utilizaron dietas con contenidos menores de colesterol (Davies y cols., 1996; Pfister y cols., 1996). Consideramos que estas diferencias son debidas a que otros autores han utilizado cepas de conejos diferentes a la utilizada en este trabajo, y que estas cepas son similares al conejo Watanabe, que desarrolla hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y lesiones ateroscleróticas en la aorta, con una dieta estándar.

No se hicieron determinaciones de lipoperoxidación de lipoproteínas, sin embargo es probable que en estas condiciones de hiperlipidemia la modificación de las lipoproteínas, así como la hipertrigliceridemia (los niveles de TAG se incrementaron 4.6 veces) contribuyan a la formación de las lesiones ateroscleróticas que observamos en el área del cayado de la aorta.

En el caso de los conejos alimentados con 1% de colesterol, la concentración de colesterol-HDL disminuyó, sin embargo la diferencia con respecto al control no resultó estadísticamente significativa. Estos resultados demuestran que la hipercolesterolemia, en el caso de los conejos alimentados con 10% de colesterol está acompañada de hipertrigliceridemia, pero no de una disminución en la concentración de colesterol-HDL.

Actividad de arginasa y contenido de arginina en conejos hipercolesterolémicos

En este estudio se demuestra que la hipercolesterolemia en conejos no está acompañada de alteraciones en el número de plaquetas o de la concentración sérica de proteínas, y tampoco de una deficiencia de L-arginina o en la actividad de arginasa. Méndez y Zarzoza (1997) demostraron recientemente que la rata diabética presenta una deficiente actividad de arginasa. Debido al efecto antiagregante de las poliaminas, estos autores asocian la deficiencia de L-arginina y arginasa con una

deficiente producción de poliaminas, que a su vez pudiera estar involucrada en la hiperagregabilidad presentada en el estado diabético.

Como se demostró aquí, en el conejo hipercolesterolémico no existe una deficiencia en la actividad de arginasa ni en la concentración de L-arginina. Esto está en concordancia con lo reportado por Böger y cols. (1996), quienes reportaron que la concentración de L-arginina tanto en conejos control como en conejos alimentados con 1% de colesterol se encuentra alrededor de 85 $\mu\text{mol/l}$.

Por otro lado, la vía de síntesis de citrulina por medio de la arginasa y la síntesis de óxido nítrico utilizan como sustrato a la L-arginina. Los macrófagos contienen arginasa y óxido nítrico sintasa. La arginasa es inhibida de manera no competitiva por nitrito, el producto final de la síntesis de óxido nítrico (Murphy y Newsholme, 1998). Es decir, la utilización de L-arginina para sintetizar óxido nítrico en macrófagos disminuye la concentración de intermediarios del ciclo de la urea. Es probable que la vía de utilización de glutamina exista en los macrófagos para establecer una conexión con el ciclo de la urea, ya que los monocitos pueden usar glutamina a grandes velocidades y contienen la cantidad adecuada de enzimas para convertir glutamina en citrulina (Murphy y Newsholme, 1998) precursor de las poliaminas. Por lo anterior podemos suponer que existen las condiciones metabólicas para que, con la administración exógena de L-arginina, se vea incrementada la síntesis de poliaminas en células del tejido vascular, de manera

similar a lo que observaron Méndez y Arreola en la rata diabética (Méndez y Arreola, 1992).

Por otro lado, si existiera una disminución en la producción de óxido nítrico en condiciones de hiperlipidemia, como lo han sugerido algunos autores (Cooke y cols., 1991; Böger y cols., 1996) la actividad de arginasa se vería incrementada (ya que los productos de la síntesis de óxido nítrico inhiben a la arginasa) y probablemente habría una disminución en la concentración sérica de L-arginina, sin embargo, como se muestra en este trabajo, la actividad de arginasa y la concentración sérica de L-arginina se encuentran inalteradas en conejos hipercolesterolémicos.

Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria en conejos hipercolesterolémicos

La formación de trombos es un evento importante en la aterogénesis (Ross, 1993). Harker y cols. (1976) y Fuster y cols. (1978) aportaron evidencia de la relación que existe entre la respuesta plaquetaria y el daño endotelial. Un daño endotelial causado por homocisteinemia, por ejemplo, induce la formación de sitios de desendotelización y aumento en las plaquetas con la subsecuente formación de placas (Harker y cols., 1976). Fuster y cols. (1978) encontraron que el defecto plaquetario asociado a la enfermedad de von Willebrand (padecimiento que provoca

una deficiencia en la función plaquetaria) en cerdos, previene el desarrollo de placas ateroscleróticas en respuesta a una dieta enriquecida con colesterol, aún cuando se provoque un daño endotelial en la aorta (Fuster y cols., 1978). Downie y cols. (1963) por su parte, encontraron que el cerdo desarrolla aterosclerosis al aumentar la grasa en su dieta en ausencia de hipercolesterolemia significativa, notaron también que la naturaleza focal de la enfermedad presenta patrones que sugieren daño hemodinámico y tendencia al depósito de microtrombos. Estos autores sugirieron que la incorporación de elementos plaquetarios a la pared promueve la aterogénesis, principalmente en áreas en las que existe daño endotelial.

Los pacientes con hipercolesterolemia muestran alteraciones en la función plaquetaria y plaquetas con baja vida media. Nosotros observamos en este trabajo que la agregación plaquetaria está importantemente aumentada en conejos hipercolesterolémicos en comparación con los conejos controles, y que las plaquetas presentan una vida media menor (datos no mostrados en esta tesis).

La aterosclerosis se asocia a hiperactividad plaquetaria probablemente relacionada al incremento en la concentración de colesterol-LDL. Esta idea es apoyada por el hecho de que si se elimina la fracción de LDL del plasma en pacientes disminuye la agregación plaquetaria inducida por ADP (Fuster y cols., 1978). Con este procedimiento también disminuye la fracción lipídica aterogénica y el desarrollo de

la placa aterosclerótica, aumenta la regresión de la aterosclerosis (Fuster y cols., 1978) y disminuye los niveles de colesterol 64% y los de TAG 46% .

Se sabe que la partícula de HDL disminuye la función plaquetaria y aumenta la actividad de la óxido nítrico sintasa (Chem y Metha, 1994), en nuestros experimentos no se observaron cambios en las concentraciones de HDL en los conejos alimentados con 10% de colesterol, lo que puede indicar que la hiperagregabilidad del plasma en estos conejos no es provocada por una deficiencia en los niveles de colesterol-HDL.

En este trabajo se estudió el efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la agregación plaquetaria en plasmas de conejos hipercolesterolémicos. Böger y cols. (1996) describieron que la administración oral crónica de L-arginina disminuye la proliferación celular y el tamaño de la placa, mientras que la administración de un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico aumenta la proliferación y disminuye la relajación dependiente de endotelio. Por esto se ha sugerido que la hipercolesterolemia está asociada a una deficiencia de L-arginina (Cooke y cols., 1991). Como se mencionó anteriormente, no encontramos diferencia entre las concentraciones de L-arginina entre conejos control y conejos hipercolesterolémicos, de acuerdo con lo encontrado por Böger y cols. (1996).

Böger y cols. (1996) explican que la L-arginina restablece la síntesis de óxido nítrico y evita la formación de radicales libres en el tejido vascular. Sin embargo, hay que resaltar que no se han reportado mediciones de óxido nítrico en conejo hipercolesterolémico. Además, el mismo grupo de Cooke (Jeremy y cols., 1996) señala que los efectos de la L-arginina no se mantienen durante períodos largos, por lo que no podría servir para tratamientos prolongados en humanos, y que el efecto de este aminoácido no puede observarse en conejos hembras. La L-arginina no afecta los niveles de colesterol en conejo (Singer y cols., 1995) y tiene un marcado efecto antiaterosclerótico pero poco cambio en la reactividad de la arteria lo que sugiere un moderado aumento de óxido nítrico en el endotelio, es decir, el efecto antiaterogénico de la L-arginina muy probablemente no está mediado por la síntesis endógena de óxido nítrico. A este respecto, Singer y cols. (1995) sugirieron que los efectos discordantes de la L-arginina indican que su capacidad antiaterogénica no está mediada completamente por un efecto de este aminoácido sobre la célula endotelial.

El efecto antiagregante de la L-arginina (Méndez y Zarzoza, 1997; Bogle y cols., 1994) ha sido explicado también con base en la síntesis endógena de óxido nítrico que estimula a la guanilato ciclasa, aumentando los niveles de GMPc, lo que provoca la captación de Ca^{2+} e inhibe la agregación plaquetaria. Méndez y Zarzoza (1997) explican que la L-arginina podría favorecer la formación de óxido nítrico en el citosol plaquetario mediante la enzima óxido nítrico sintasa dependiente de calcio

y NADPH, que se activa cuando las plaquetas son estimuladas por distintos agonistas. Radomski y cols. (1987; 1990a) también explican que el efecto antiagregante de la L-arginina se produce mediante la formación de óxido nítrico.

En este estudio, la L-arginina, a diferencia de lo que ocurre en humano y rata mostró un efecto proagregante, tanto en conejos control como en conejos hipercolesterolémicos (Méndez y Zarzoza, 1997).

Nosotros no encontramos una explicación para los efectos que observamos en la agregación plaquetaria debidos a la L-arginina, y ya que no se hicieron mediciones de lípidos después de la adicción del aminoácido, no podemos especular acerca de los cambios que la L-arginina pudiera ocasionar en la membrana de la plaqueta.

Es interesante mencionar que no en todos los casos se ha observado una inhibición de la agregación plaquetaria por L-arginina. Singer y cols. (1995) describen que la L-arginina no tiene efecto sobre la agregación plaquetaria en mujeres, y en conejos hembra, respectivamente. Estos autores tampoco encontraron una explicación para estos hallazgos, ya que tanto en mujeres como en hombres la L-arginina estimula de la misma manera la secreción de glucagón.

Por otro lado, al igual que lo encontrado por otros autores (Méndez y Zarzoza, 1997), en este trabajo se demostró que las poliaminas, putrescina, espermidina y

espermina son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria. Es probable que la agregación plaquetaria *in vivo* sea regulada por el óxido nítrico intraplaquetario, así como por el óxido nítrico y las prostaciclina del endotelio. El efecto antiagregante de las poliaminas ha sido explicado por medio de 2 mecanismos: el primero explica que las poliaminas inhiben a la fosfolipasa C (PLC) y a la proteína cinasa C (PKC) lo que impide la formación de 1,2-DAG, el segundo mecanismo, específico para la espermina involucra la fijación de esta poliamina a los receptores del fibrinógeno, en un proceso similar al que realizan los aminoazúcares (Nahas y Graaf, 1982; Méndez y Zarzoza, 1997).

Nahas y Graaf (1982) y Joseph y cols. (1987) han propuesto 2 mecanismos para la inhibición por poliaminas, en virtud de que la fosfolipasa C es la enzima responsable de la reacción inicial en la liberación del ácido araquidónico necesario para la subsecuente biosíntesis de endoperóxidos de prostaglandinas, siendo estos últimos los promotores de la agregación inducida por ADP. El primer mecanismo involucra la interacción de los grupos amino cargados positivamente con las cabezas polares cargadas negativamente de fosfatidil inositol produciendo el desplazamiento del Ca^{2+} del sustrato. El segundo implica un desplazamiento de los iones calcio en los sitios de unión a enzimas. Joseph y cols. (1987) demostraron que la espermina inhibe específicamente a la trombina interfiriendo con sus receptores.

Nosotros sugerimos que, en virtud de las cargas positivas contenidas en las moléculas de poliaminas, el mecanismo de inhibición de la agregación plaquetaria por estas moléculas involucra una interacción con receptores de membrana, como explican Joseph y cols. (1987), o un cambio estructural en las moléculas de receptores inducido por la interacción de las poliaminas con fosfolípidos de la membrana. Estas interacciones deben de ser específicas ya que la L-arginina, que es un aminoácido básico no inhibió la agregación plaquetaria.

La agregación plaquetaria varía entre especies. Las plaquetas que presentan mayor agregación son las humanas y las de conejo, mientras que los gatos y los hámsters presentan niveles bajos de agregación. Es interesante mencionar que los niveles de agregación correlacionan con la susceptibilidad a aterosclerosis y con la relación LDL/HDL.

Los factores de trombosis (endotelio, hemostasis, coagulación y fibrinólisis) están implicados en la etapa inicial de la aterosclerosis, aunque su participación está más establecida (y estudiada) en las fases avanzadas de complicaciones tromboembólicas. Durante las etapas iniciales de la enfermedad, todos los factores tisulares de activación y desarrollo de coagulación están presentes en el vaso y luego en la lesión. Esta coagulación celular resulta en la formación de un trombo en el tejido y en la transformación de fibrinógeno en fibrina. El estado protrombótico precede y participa en la proliferación celular y depósito extracelular de lípido.

Como se mencionó anteriormente, los estudios en los que se atribuye un papel protector al óxido nítrico no reportan la medición directa de este ion en el sistema vascular, aunque es posible realizarla. Este tipo de mediciones son posibles, Malinski y cols. (1996) describieron la medición directa de óxido nítrico en el sistema vascular, tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando un sensor específico para óxido nítrico de 1-20 micras de diámetro, con un límite de detección de 10^{-9} M, y un tiempo de respuesta de 0.1^{-10} ns, el sensor puede implantarse en tejidos o en el torrente circulatorio. Estos autores midieron óxido nítrico en el corazón, venas y arterias de 5-100 mm de diámetro.

La L-arginina disminuye las anormalidades funcionales producidas por hipercolesterolemia en las células endoteliales (Davies y cols., 1996) y restaura la relajación inducida por acetil colina en conejos hipercolesterolémicos.

La L-arginina es el precursor fisiológico de óxido nítrico que se forma en las células endoteliales por la actividad de la óxido nítrico sintasa constitutiva. El óxido nítrico es producido tónicamente en el endotelio manteniendo el tono vasodilatador activo e inhibiendo la agregación plaquetaria, adhesión de monocitos y proliferación de células de músculo liso. En hipercolesterolemia experimental y aterosclerosis, así como en pacientes hipercolesterolémicos, las funciones mediadas por óxido nítrico están alteradas. No está claro si en este proceso están involucrados una disminución

en la formación o un aumento en la inactivación oxidativa. Se ha demostrado que la administración crónica de L-arginina tiene efectos antiateroscleróticos en conejos hipercolesterolémicos. La infusión intravenosa de L-arginina induce la vasodilatación periférica dependiente de óxido nítrico e inhibe la agregación plaquetaria en humanos sanos, así como en pacientes con isquemia y aterosclerosis generalizada. No se sabe si la L-arginina tiene efectos benéficos en la vasculatura periférica.

Finalmente, consideramos que nuestro modelo experimental será de gran utilidad para la realización de estudios relacionados con los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de aterosclerosis, así como en la evaluación del efecto de diversas sustancias, con posible aplicación terapéutica ya sea en la prevención o en la reversión de la aterosclerosis.

Los cambios notables que se observaron en las concentraciones de LDL en estas condiciones experimentales ofrecen también importantes perspectivas para el estudio del metabolismo de las lipoproteínas, particularmente las LDL.

Lesiones ateroscleróticas en conejos hipercolesterolémicos

Hemos encontrado que no es un problema trivial el establecer un modelo de aterosclerosis experimental, a pesar de que ha sido ampliamente reportada en la literatura la inducción de lesiones ateroscleróticas induciendo hipercolesterolemia en varias especies, especialmente en el conejo.

La hipercolesterolemia es considerada como factor de riesgo para la aterosclerosis. De acuerdo con Ross (1993), los factores de riesgo contribuyen a acelerar el proceso aterogénico causando un daño a la capa endotelial de las arterias. Este daño endotelial puede a su vez provocar una acelerada captación de colesterol-LDL por las células del tejido vascular. La partícula de LDL contribuye a la formación de ateromas ya que es altamente citotóxica, induce la proliferación de músculo liso e inhibe la relajación dependiente de endotelio (Springer, 1990; Carlos y Harlan, 1990). El colesterol-LDL se acumula en células de músculo liso o en macrófagos, que se convierten en células espumosas, principales componentes de las estrías grasas.

Los resultados obtenidos en este trabajo contrastan notablemente con trabajos de otros autores que describen la formación de ateromas en conejo Nueva Zelanda. En el caso del conejo Nueva Zelanda, alimentado con dietas adicionadas con 1% y 10% de colesterol las lesiones observadas no son comparables con las reportadas por

otros autores (Springer y cols., 1995; Tijburg y cols., 1997). Los hallazgos bioquímicos e histológicos, así como el efecto antiagregante de las poliaminas en el plasma de conejos control y conejos hiperlipidémicos obtenidos en este trabajo se analizaron con relación a lo reportado en la literatura.

Böger y cols. (Böger y cols., 1996) encontraron que la hipercolesterolemia en conejos está asociada con la acumulación de monocitos y con un aumento en la proliferación de células de músculo liso en la íntima.

Se ha descrito que el proceso aterosclerótico ocurre en el conejo Nueva Zelanda alimentado con una dieta adicionada con 1% (Singer y cols., 1995) o 0.5% (Riezebos y cols., 1999) de colesterol durante 10-12 semanas, y que las lesiones ateroscleróticas producidas ocupan más del 60% de la superficie endotelial de la aorta. Algunos autores incluso han descrito que una dieta suplementada con 0.15% de colesterol es capaz de producir este mismo efecto (Tijburg y cols., 1997). Incluso hay reportes de que las lesiones en conejo se vuelven más severas si después del tratamiento con colesterol se cambia a una dieta sin colesterol (Wissler y Veselinovitch, 1968).

Como se expuso anteriormente, existe controversia en cuanto a la concentración de colesterol en el alimento y el tiempo de inducción de aterosclerosis en el conejo Nueva Zelanda.

En este estudio los conejos alimentados con una dieta suplementada con 1% de colesterol y 10% de aceite de maíz no desarrollaron lesiones ateroscleróticas macroscópicas, ni se encontró acumulación de grasa subendotelial o alguna alteración en la estructura de la pared de la aorta. Es importante notar que los conejos del grupo control tampoco mostraron ningún tipo de lesión, de acuerdo a lo reportado por Araujo (Araujo y cols., 1997) y Verbeuren y cols. (1986), y Du y cols. (1992). También ha sido reportada la presencia de al menos 20% de lesión en la superficie endotelial de conejos sanos Nueva Zelanda, alimentados con dietas estándar (Enomoto y cols., 1978; Araujo y cols., 1995; Tyroler, 1987; Böger y cols., 1978; Marquie, 1979; Kato y cols., 1998).

Las aortas de los conejos control, y los conejos alimentados con 1% de colesterol presentan una morfología que corresponde a la de un vaso elástico. La capa íntima está compuesta por una monocapa de células endoteliales y una membrana basal. En la capa media predominan las fibras elásticas sobre las fibras colágenas. Las células de músculo liso se encuentran embebidas en una matriz de mucopolisacárido, y se distinguen claramente las unidades funcionales del vaso, formadas por una lámina de fibra elástica y una capa de células musculares. Se ha descrito que las bandas de colágena y elastina dan fuerza a la pared arterial, y que la distribución laminar de la capa media distribuye el estrés uniformemente a lo largo del vaso. Los mamíferos

pequeños, como el conejo, presenta menos de 20 láminas en la capa media, mientras que en el humano y el borrego pueden encontrarse entre 35 y 70 láminas.

Nuestros resultados demuestran que, en el caso de los conejos alimentados con 10% de colesterol, los niveles de colesterol son similares a los niveles de colesterol obtenidos por otros investigadores quienes han utilizado cantidades menores de colesterol en el alimento (Mora y cols., 1987; Munro y Cotran, 1988; Masuda y Ross, 1990; Davie y Ratnoff, 1964; Zur, 1982; Rao y Rapoport, 1988). En comparación con lo reportado por otros autores, los conejos alimentados con la dieta suplementada con 10% de colesterol desarrollaron niveles menores de hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia en respuesta a una dieta con contenido mayor de colesterol, y fueron menos sensibles a la formación de lesiones ateroscleróticas.

Con fines comparativos se alimentó un conejo con una concentración mas baja de colesterol (0.5%) durante un tiempo mas largo (14 meses) (datos no mostrados en esta tesis). Se produjeron lesiones mucho más extensas e incluso oclusivas en la aorta de este conejo. Sin embargo, el estado general del animal se afectó. Los animales alimentados con 1 o 10% de colesterol no presentaron alteraciones en su estado general de salud. Esto contrasta con los resultados obtenidos por otros autores. Cooke refiere que si se alimentan conejos Nueva Zelanda con dietas suplementadas con contenidos de colesterol mayores a 0.5%, el estado de salud de

estos se ve severamente afectado (comunicación personal). Es evidente que existen diferencias importantes entre los conejos utilizados en este trabajo y los que han sido utilizados de manera rutinaria por otros autores para inducir lesiones ateroscleróticas.

La mayoría de los modelos de aterosclerosis utilizan como agente etiológico la hiperlipidemia crónica, debido a que no se ha reportado población humana con bajos niveles de lípidos y alta incidencia de aterosclerosis. Las placas de formación rápida en humanos con hipercolesterolemia familiar se parecen mucho a las lesiones de formación lenta producidas en humanos. Wissler y Vesselinovitch (1968) compararon las lesiones producidas en pacientes con hipercolesterolemia familiar, de 10 años de edad, con lesiones observadas en personas de más de 70 años con niveles de lípidos ligeramente elevados, que tenían enfermedad vascular severa, y con lesiones encontradas en monos con hiperlipidemia severa de 2 años. Las lesiones en los tres casos fueron equivalentes en apariencia y componentes. Estas lesiones equivalentes se desarrollan en muy diferentes tiempos y con altos o moderados niveles de lípidos, lo que demuestra que el tiempo no es el factor determinante de la composición de la lesión.

McGill y Kushwaha (1995), por su parte, han reportado que existe una variabilidad en las respuestas a dietas hiperlipidémicas, tanto de humanos como en animales experimentales, y que esta variabilidad tiene un origen genético. Thiery y cols.

(1995) encontraron que el 12% de 62 conejos desarrollaron entre 0 y 30% de lesiones en la superficie de la aorta en respuesta a una dieta rica en colesterol. Estos autores, después de experimentos de cruzamiento, desarrollaron dos cepas, una con alta respuesta aterosclerótica y otra con baja respuesta aterosclerótica (que desarrollaron $27 \pm 17\%$ de lesión). Thiery y cols. (1995) explican que la inducción del receptor scavenger por PDGF está atenuada en la cepa con baja respuesta aterosclerótica comparada con la cepa de alta respuesta aterosclerótica, sin embargo, ambas cepas presentan niveles similares de transporte de colesterol al exterior de células musculares y capacidad similar para peroxidar lipoproteínas.

Existe una diferencia importante entre nuestros resultados y los reportados por otros autores, aún con aquellos que describen cepas de conejos con "baja respuesta aterosclerótica". En vista de las diferencias observadas, es posible que los conejos utilizados por otros autores tengan una predisposición genética para desarrollar niveles extremadamente altos de colesterol y estrías grasas en el tejido vascular.

En 1973 Watanabe descubrió un conejo con una mutación que expresaba altos niveles de colesterol y TAG en comparación con los niveles de lípidos séricos en conejos blancos japoneses normales. La concentración de colesterol y TAG en los conejos Watanabe se encuentra alrededor de 385 mg/dl y 304 mg/dl respectivamente. Con un régimen controlado de entrecruzamientos, Watanabe produjo una cepa de conejos que presenta concentraciones 8-14 veces mayores de

lípidos que los normales (Watanabe, 1980). Según Palmer y cols. (1998) el conejo Watanabe (WHHL) ha sido utilizado de manera rutinaria como modelo de aterosclerosis. El conejo Watanabe presenta niveles elevados de colesterol plasmático y desarrolla de manera espontánea aterosclerosis y xantoma. Esta cepa de conejo también presenta una mayor cantidad de lipoproteínas beta que de lipoproteínas alfa.

Brown y Goldstein (1983) y Kugiyama y cols. (1996) reportan niveles séricos de colesterol de 500 mg/dl en conejos alimentados con una dieta suplementada con 1% de colesterol, estos niveles séricos de colesterol son varias veces mayores que los que nosotros encontramos en este trabajo, utilizando una dieta similar, y muy similares a los reportados por Pfister cols. (1996), para el conejo Watanabe. que desarrolla lesiones ateroscleróticas de manera espontánea de más del 60% de la superficie de la aorta, debido a un defecto genético en el acarreador para LDL (Tanzawa y cols., 1980).

El conejo Watanabe es un modelo de hipercolesterolemia familiar humana, y no de aterosclerosis inducida por dietas hiperlipidémicas. La hipercolesterolemia familiar se caracteriza, en su forma homocigota, por una elevación masiva de colesterol-LDL sérico (Goldstein y Brown, 1979). El defecto responsable en la elevación de LDL es una mutación alélica en el gen del receptor membranal para LDL, que provoca un

incremento en el catabolismo del colesterol-LDL, y una acumulación de colesterol en la pared de las arterias con la formación de placas ateroscleróticas.

La importancia del receptor de LDL radica en que más del 70% de la LDL plasmática es removido por este receptor en hígado (Spady y cols., 1987). En la hipercolesterolemia familiar, y en el conejo Watanabe (WHHL), la mayor parte del transporte de colesterol-LDL ocurre en tejidos extrahepáticos, por medio de un mecanismo mucho más lento, e independiente de receptor (Spady y cols., 1987). Consecuentemente, la cantidad relativa de LDL internalizada por un tejido, como la pared arterial, podría ser mucho mayor que lo normal.

Los conejos WHHL desarrollan lesiones que solamente contienen células espumosas derivadas de macrófagos. Rosenfeld y cols. (1987a; 1987b) realizaron estudios utilizando anticuerpos monoclonales específicos para los distintos tipos de células y caracterizaron las lesiones de conejos WHHL y de conejos alimentados con colesterol. En sus estudios, la cronología de las interacciones celulares que ocurrieron durante el desarrollo de la estría grasa y en la expansión de estas lesiones tempranas a lesiones maduras fue similar para los conejos WHHL y los conejos Nueva Zelanda alimentados con colesterol. Esto incluyó la aparición de células espumosas derivadas de macrófagos en las lesiones tempranas y células de músculo liso. Estos autores también encontraron eventualmente la formación de trombos en la superficie de las células espumosas derivadas de macrófagos expuestos.

El crecimiento de la lesión involucra la continua adherencia y migración de monocitos en la íntima, que eventualmente acumulan lípidos y aumentan de tamaño. De modo que las lesiones en estos conejos tienen similitudes con las lesiones que se desarrollan en humanos, sin embargo, se puede observar que la contribución del acarreador LDL es relativamente pequeña en este proceso, si se toma en cuenta que, como se demostró en este trabajo, es posible desarrollar ateromas en conejos en respuesta a una dieta rica en colesterol sin la contribución de un defecto genético en el metabolismo de lipoproteínas.

Se ha encontrado una relación estrecha entre las células espumosas derivadas de macrófagos y el centro necrótico de un ateroma (Stary, 1987). De acuerdo a Stary (1987) el centro lipídico se forma por acumulación de residuos necróticos de numerosas generaciones de células espumosas derivadas de macrófagos. Es claro que el desarrollo de la placa depende de manera importante del tamaño y recambio de las células espumosas derivadas de macrófagos.

Las diferencias entre la naturaleza de las lesiones en los dos tipos de conejos es importante en cuanto a su relación con la aterosclerosis humana. Wissler y Veselinovitch (1974) señalan que una de las principales diferencias entre las lesiones en conejo y las del humano es que en los conejos hipercolesterolémicos la mayor parte de los lípidos arteriales se depositan en células derivadas de monocitos,

mientras que en humano y primate la principal célula involucrada es la célula de músculo liso. Cerca del 50% de las células que componen una lesión avanzada, y entre el 90-95% en lesiones tempranas derivan de células de músculo liso (Wissler y cols., 1990).

Por otro lado, se ha reportado el desarrollo de cepas susceptibles a aterosclerosis también en otras especies. El ratón, por ejemplo, por muchos años no fue utilizado como modelo de aterosclerosis porque se creía que no sobreviviría a dietas altas en grasa, que las lesiones no serían reproducibles, y que la mayoría de los animales no desarrollaría lesiones, además de que la patología no sería similar a la del humano. La utilización de dietas bajas en grasa y tiempos mas largos resolvió el problema con la utilización de cepas obtenidas de experimentos de entrecruzamiento de las cuales la mayoría de los animales desarrollan lesiones, en estas condiciones incluso se encontraron lesiones fibrosas (Paigen y cols., 1987; Ishida y Paigen, 1989). En el ratón, el grado de hiperlipidemia puede ser manipulado con el uso de agentes químicos como el poloxamero P-407 (Palmer y cols., 1998).

Los genes de los transportadores de lipoproteínas han sido utilizados para generar ratones transgénicos con niveles de lipoproteínas alterados. Estos modelos son útiles para el estudio de la regulación de la expresión genética, específica de tejido, de genes para las apo E/CI/CII y apo AI/CII/AIV. Algunas de estas cepas de ratones.

bajo condiciones específicas de alimentación, desarrollan lesiones ateroscleróticas (Fournier y cols., 1995).

Finalmente el envejecimiento normal se asocia a diversos cambios en el sistema cardiovascular que producen un aumento en el proceso patológico como la hipertensión, enfermedad coronaria y falla cardíaca. Las alteraciones consisten en cambios en la función y estructura de las arterias, éstas acumulan lípidos, colágena y minerales (Marin, 1995). Existen placas fibrosas en los humanos alrededor de los 40 años (Strong y McGill, 1962).

CONCLUSIONES

1. La alimentación de conejos Nueva Zelanda con una dieta suplementada con 1% de colesterol y 10% de aceite de maíz produce solamente hipercolesterolemia moderada, sin hipertrigliceridemia ni lesiones en la superficie endotelial de la aorta.
2. La suplementación de la dieta con 10% de colesterol durante 10 semanas produce, en el conejo Nueva Zelanda, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia importantes que conducen al desarrollo de algunas lesiones ateroscleróticas en la aorta.

3. Se demostró que las poliaminas putrescina, espermidina y espermina son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria en el plasma de conejos hipercolesterolémicos.

4. La hipercolesterolemia no afecta la actividad de arginasa ni la concentración de L-arginina en el plasma de conejos Nueva Zelanda.

PERSPECTIVAS

Para determinar si en condiciones de hipercolesterolemia existe una deficiencia de poliaminas circulantes, es necesario realizar mediciones de las concentraciones de estas moléculas, en suero y en el tejido vascular, tanto en conejos control, como en conejos alimentados con 10% de colesterol. Esto permitirá determinar si la falta de poliaminas es un factor que favorece la hiperagregación plaquetaria debida a hipercolesterolemia.

Por otra parte, el efecto de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, sobre la formación de lesiones ateroscleróticas, *in vivo*, deberá ser evaluado

mediante estudios bioquímicos e histológicos, en conejos alimentados con 10% de colesterol.

Consideramos que los resultados de estos estudios permitirán comprender mejor los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de lesiones ateroscleróticas y sus complicaciones, así como su posible prevención y/o reversión.

REFERENCIAS

- Ahnadi CE, Berthezene F, Ponsin G (1993). Simvastatin-induced decrease in the transfer of cholesterol esters from high density lipoproteins to very low and low density lipoproteins in normolipidemic subjects. *Atherosclerosis* **99**, 219-228.
- Araujo JA, Romano EL, Brito BE, Parthe V, Romano M, Bracho M, Montaña RF, Cardier J (1995). Iron overload augments the development of atherosclerosis lesions in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1172-1180.
- Bachrach U (1973). Function of the naturally occurring polyamines. Bachrach (Ed). Academic Press NY pp. 220-232.
- Berg K (1963). A new serum type system in man: the Lp system. *Acta Pathol Microbiol Scand* **59**, 369-382.
- Bethell DR, Hibasami HY, Pegg AE (1982). Regulation of polyamine content in cultured fibroblasts. *Am Phys Soc* C262-C269.
- Böger RH, Bode-Boger SM., Frolich JC (1996). Pathogenetische Bedeutung des L-Arginin-NO Stoffwechselwegs bei Arteriosklerose und mögliche therapeutische. *Aspecte Vasa* **25**, 305-316.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S, Stain AC, Nofe R, Frolich JC (1998). Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* **136**, 67-77.
- Bogle RG, Mann GE, Pearson JD, Morgan DML (1994). Endothelial polyamine uptake: selective stimulation by L-arginine deprivation of polyamine depletion. *Am J Physiol* **266**(Cell Physiol 35),C776-C783.

- Brown MW, Goldstein JL (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* **52**, 223-226.
- Buja LM, Kita T, Goldstein JL, Watanabe Y, Brown MS (1983). Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* **3**, 87-101.
- Carlos TMY, Harlan JM (1990). Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev* **114**, 2-28
- Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME (1991). Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* **90**, 1168-1172.
- Coverse CA, Skinner ER (1992). Lipoprotein Analysis a practical approach. The practical approach series. Cap 1. Coverse CA (Ed) Oxford University Press USA pp 215-220.
- Cuatrecasas P (1969). Interaction of insulin with the cell membrane: the primary action of insulin. *P Natl Acad Sci USA*. **63**, 450-457.
- Chem LY, Metha JL (1994). Inhibitory effect of high-density lipoprotein on platelet function is mediated by increase in nitric oxide synthase activity in platelets *Life Sci* **55**, 1815-1821.
- Dahlen G, Berg K, Frick MH (1976). Lp(a)/pre B1-lipoprotein, serum lipids, and atherosclerotic disease. *Clin Genet* **9**, 558-566.
- Davie EW, Ratnoff OD (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* **145**, 1310-1312.
- Davies MJ, Thomas A (1984). Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *New Engl J Med* **310**, 1137-40.
- Davies MG, Barber E, Dalen H, Hagen PO (1996). L-arginine supplementation improves venous endothelial cell but not smooth muscle

- cell dysfunction induced by prolonged diet-induced hypercholesterolemia. *J Invest Surg* **9**, 415-217.
- De Palma RG, Insuli W, Bellon EM, Roth WT, Robinson AV (1972). Animal models for the study of progression and regression of atherosclerosis. *Surgery* **72**, 268-278.
 - Downie H, Mustard JF, Rowsell HC (1963). Swine atherosclerosis: the relationship of lipids and blood coagulation to its development *Ann N Y Acad Sci* **104**, 539-561.
 - Dicorletto PE, Bowen-Pope DF (1983). Cultured endothelial cells produce a platelet derived growth factor like protein. *P Natl Acad Sci USA* **80**, 1919-1923.
 - Du ZY, Woodman L (1992). The effect of hypercholesterolaemia and atherosclerosis on α -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in conscious rabbits and rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* **211**, 149-456.
 - Enomoto H, Yoshikuni Y, Saito K, Ozaki T, Ohata K, Chocke R (1978). Effect of THD-341, a new hypocholesterolemic agent, on experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **30**, 109-121.
 - Esfahani M, Swaney JB (1990). Advances in cholesterol research. Esfahani y Swaney JB (Eds). Cap 8. The Oxford Press, USA pp. 271-311.
 - Faggiotto A, Ross R (1984). Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* **4**, 341-56.
 - Ferrante A (1985). Inhibition of human neutrophil locomotion by the polyamine oxidase-polyamine system. *Immunology* **54**, 785-90.
 - Fournier N, Atger V, Paul JL, Moatti N (1995). Value of transgenic mouse as a model for the study of human lipoprotein metabolism. *Ann Biol Clin - Paris* **53**, 209-220.

- French JE (1966). Atherosclerosis in relation to the structure and function of the arterial intima, with special reference to the endothelium. *Int Rev Exp Pathol* **5**, 253-353.
- Friedewald WJ, Levy FI, Fredrickson DS (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **18**, 499-502.
- Frohlich J, McLeod R, Hon K (1982). Lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT). *Clin Biochem* **15**, 269-278.
- Furchgott RF (1983). Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. *Circ Res* **53**, 557-572.
- Furie B, Furie BC (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell* **53**, 505-518.
- Fuster V, Bowie EJW, Lewis JC, Fass DN, Owen CA, Brown AL (1978). Resistance to atherosclerosis in pigs with von Willebrand's disease: spontaneous and high cholesterol diet-induced atherosclerosis. *J Clin Invest* **61**, 722-730.
- Garg UC, Hassid A (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **83**, 1774-1777.
- Gibbons GF (1982). Biochemistry of cholesterol. Cap. 7 Gibbons GF (Ed) Elsevier Biomedical NY USA Cap 7 pp. 235-253.
- Ginsberg J (1990). Lipoprotein physiology and its relationship to atherogenesis. *Endocrin Metab Clin* **9**, 211-227.
- Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, Dzau VJ, Creager MA (1990). L-arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* **67**, 1301-1308.

- Goldstein JL, Brown MS (1979). The receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia. *Annu Rev Genet* **13**, 259-289.
- Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM (1990). Cell proliferation in human coronary arteries. *P Natl Acad Sci USA* **87**, 4600-4604.
- Gown AM, Tsukada T, Ross R (1986). Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **125**, 191-207.
- Grundy SM (1990). Cholesterol and atherosclerosis. Diagnosis and treatment. Cap 1 Grundy SM (Ed) Lippincott Company. Philadelphia PA USA pp. 120-138.
- Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR (1976). Homocystinemia-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* **58**, 731-741.
- Hayes KC, Pronczuk A (1996). Sensitivity to platelet aggregation appears related to the lipoprotein profile and atherosclerosis risk in humans and across species. *Comp Biochem Phys B* **113**, 349-353.
- Heald PJ (1979). Changes in ornithine decarboxylase during early implantation in the rat. *Biol Reprod* **20**, 1195-1199.
- Heby O (1981). Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* **14**, 1-20.
- Hu J, Mahmoud IM, El-Fakahany EE (1994). Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Neurosci Lett* **175**, 41-45.
- Ishida BY, Paigen B (1989). Atherosclerosis in the mouse in Lusts A. Sparkes S. editors. Genetic Factors in Atherosclerosis. Approaches and model systems. Basel Karger, pp. 189-192.
- Jaimeson DG, Usher DC, Rader DJ, Lavi E (1995). Apolipoprotein (a) deposition in atherosclerotic plaques of cerebral vessels. *Am J Pathol* **147**, 1567-1574.

- Jeremy RW, McCarron HY, Sullivan D (1996). Effects of dietary L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilatation in the hipercholesterolemic rabbit. Response according to treatment duration, anatomic site, and sex. *Circulation* **94**, 498-506.
- Johnson G, Tsao PS, Malloy D, Leffer AM (1990). Cardioprotective effects of acidified sodium nitrite in myocardial ischemia with reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* **252**, 35-41.
- Joris Y, Zand T, Nunnari JJ, Krolkowski FJ, Majno G (1983). Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Phatol* **113**, 341-358.
- Joseph S Krishnamurth S, Kakkar U (1987). Effect of the polyamine-spermine on agonist-induced human platelet activation-specific inhibition of “aggregation-independent” events induced by thrombin, but not by collagen, thromboxane mimetic, phorbol ester on calcium ionophore. *Thromb Haemost* **57**, 191-195.
- Kato H, Okada R, Enoki M, Oogushi K, Emura S, Takashima T, Ohmori K (1998). The antiatherogenic effect of nifedipine on intramural small coronary arterial lesions in cholesterol-fed rabbits. *Angiology* **19**, 49-54.
- Kattermann R (1984). Rapid determination of total and free cholesterol in serum. *Clin Chem Biochem* **22**, 245-249.
- Kivietys PR, Specian RD, Cepinskas G (1992). Polyamines attenuate jejunal mucosal injury induced by oleic acid. *Am J Physiol* **263** (Gastrointest Liver Physiol 26), G224-G229.
- Kjeldsen K, Astrup P, Wanstrup J (1969). Reversal of rabbit atheromatosis by hyperoxia. *J Atheroscler Res* **10**, 173-178.
- Koenig H, Goldstone A, Lu CY (1983). Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. *Nature* **305**, 530-534.

- Kritchevsky D, Sallata P, Tepper SA (1969). Effect of N-gamma-phenylpropyl-N-benzyloxy acetamide (W-1372) on experimental atherosclerosis in rabbits. *P Soc Exp Biol Med* **132**, 303-306.
- Kugiyama K, Sugiyama S, Matsumura T, Ohta Y, Doi H, Yasie H (1996). Suppression of atherosclerotic changes in cholesterol fed rabbits treated with an oral inhibitor of neural endopeptidase 24.11 (EC 3.4.24.11). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 1080-1087.
- Kung JJ, Brooks SB, Taknay JP, Leonard LL, Talmage DW (1977). Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J Expt Med* **146**, 665-671.
- Lockwood DH, Lipsky JJ, Meronk F, East LE (1977). Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism of fat cells. *Biochem Bioph Res Co* **44**, 601-607.
- Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA (1977). Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* **23**, 882-884.
- López JAG, Armstrong ML, Adams Brotherton AFA, Piegors DJ, Heistad DD (1991). Effects of atherosclerosis and regression on vascular responses to products of activated platelets in primates. *Am J Physiol* **260**, H1051-H1056.
- Lovaas E (1997). Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv Pharmacol* **38**, 119-149.
- Lowry DH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Luscher TF (1990). Imbalance of endothelium-driven relaxing and contracting factors. A new concept of hypertension? *Am J Hypertens* **3**, 317-330.

- Malinski T, Mesaros S, Patton SR, Mesarosova A (1996). Direct measurement of nitric oxide in the cardiovascular system. *Physiol Res* **45**, 279-284.
- Marin J (1995). Age-related changes in vascular responses: a review. *Mech Ageing Dev* **79**, 71-114.
- Marquie G (1979). Comparative effects of metformin and phenformin on the progression and regression of cholesterol induced atherosclerosis in rabbits. *Paroi-Arterielle* **5**, 209-218.
- Martin-Sanz P, Hopewell R, Brindley DN (1985). Spermine promotes the translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to the microsomal fraction of rat liver and it enhances the effects of oleate in this respect. *Febs Lett* **179**, 262-266.
- Marx M, Trittenwein G, Aufricht C, Hoeger H, Lubec B (1995). Agmatine and spermidine reduce collagen accumulation in kidneys of diabetic db/db mice. *Nephron* **69**, 155-158.
- Masuda JY, Ross R (1990). Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis* **10**, 164-177.
- McGill HC (1984). Persistent problems in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* **4**, 443-451.
- McGill HC, Kushwaha RS (1995). Individuality of lipemic responses to diet. *Can J Cardiol* **11** (Suppl G), 15G-27G.
- McLean JW, Tomlinson HE, Kuang WJ, Eaton DL, Chem EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM (1987). cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* **330**, 132-137.
- Méndez JD, Arreola MA (1992). Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Int* **28**, 569-575.

- Méndez JD (1989). Poliaminas, en Bioquímica e Inmunología. Vol II Hicks JJ y Díaz -Zagoya CC (Eds) Facultad de Medicina, UNAM. pp. 365-385.
- Mendez JD, Zarzoza E (1997). Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Mol Biol Int* **43**, 311-318.
- Méndez JD, Balderas F (1999). Effect of L-arginine on metabolism of lipid an lipoprotein in rats with induced diabetes. *Biochimie* (sometido)
- Mora R, Lupu F, Simionescu N (1987). Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis* **67**, 143-54.
- Morel DW, Di Corieto PE, Chisolm GM (1984). Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis* **4**, 357-364.
- Morgan DML, Coade SB, Pearson JD (1990). Polyamines stimulate calcium uptake by human vascular endothelial cells. *Biochem Soc T* **18**, 1080-1084.
- Munro JM, Cotran RS (1988). The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* **58**, 249-61.
- Murphy I, Newsholme P (1998). Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea. *Clin Sci* **95**, 397-407.
- Nahas N, Graaf G (1982). Inhibitory activity of polyamines on phospholipase C from human platelets. *Biochem Bioph Res Co* **109**, 1035-1040.
- Newman HAY, Zilversmit DB (1962). Quantitative aspects of cholesterol flux in rabbit atheromatous lesions. *J Biol Chem* **237**, 2078-2084.

- Nishina PM, Lowe S, Verstuf J, Naggert JK, Kuypers FA, Paigen B (1993). Effects of dietary fats from animal and plant fatty sources on diet-induced fatty streak lesions in C57B/6J mice. *J Lipid Res* **34**, 1413-1422.
- Nogowski L, Nowak KW (1986). Arginine, administered in various ways, as a stimulator of insulin secretion in the rabbit. *Horm Metab Res* **18**, 730-733.
- Paigen B, Ishida BY, Verstuf RB, Winters D, Albee D (1990). Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Atherosclerosis* **10**, 316-323.
- Palmer RMJ, Ferridge AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
- Palmer WK, Emeson EE, Johnston TP (1998). Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57BL/6 mouse. *Atherosclerosis* **136**, 115-123.
- Pfister SL, Spitzbarth N, Edgmond W, Cambell WB (1996). Vasorelaxation by an endothelium-derived metabolite of arachidonic acid. *Am J Physiol* **270**, H1021-H1030.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1987). Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxin factor, nitric oxide, and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* **92**, 181-187.
- Radomski MW, Palmer, RMJ, Moncada S (1990a). Characterization of the L-arginine nitric oxide pathway in human platelets. *Brit J Pharmacol* **101**, 325-328.
- Raina A, Telaranta T (1967). Association of polyamines and RNA in isolated subcellular particles from rat liver. *Biochim Biophys Acta* **138**, 200-203.

- Rao LV, Rapaport, SI (1988). Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *P Natl Acad Sci USA* **85**, 6687-6691.
- Reagan JW, Miller LR, Clair RW (1990). *In vivo* clearance of low density lipoprotein in pigeons occurs by a receptor like mechanism that is not down-regulated by cholesterol feeding. *J Biol Chem* **265**, 9381-9391.
- Riezebos J, Vleeming W, Beems RB, Van-Amsterdam JG, Meijer GW, de-Wildt DJ, Porsius AJ, Wemer J (1994). Comparison of the antiatherogenic effects of isradipine and ramipril in cholesterol-fed rabbits: effect on progression of atherosclerosis and endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* **23**, 415-423.
- Rokita E, Cichocki T, Heck D, Jarczyk L, Strzalkowski A (1991). Calcification of aortic wall in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* **87**, 183-193.
- Rosemary B (1976). Human Blood coagulation, haemostasis and thrombosis. Rosemary B (Ed). Blackwell Scientific Publications Oxford London pp. 236-256.
- Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A, Bierman EL, Gown AM, Ross R (1987). Fatty streak expansion and maturation in Watanabe heritable hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* **7**, 24-34.
- Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R (1987). Fatty streak initiation in Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* **7**, 9-23.
- Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809.
- Rossi F, Nistico G, De marco G, Berrino L, Matera C, Bile G, Marmo E (1984). Cardiovascular effects of putrescine in dogs after systemic, intra-

- arterial vertebral and intraventricular injection. *Res Commun Chem Path* **46**, 43-52.
- Scanu AM (1992). Lp(a): a link between thrombosis and atherosclerosis. *Eur J Epidemiol* **8** (Suppl 1), 76-78.
 - Schulman KA, Kinoshian B, Jacobson A, Glick H (1990) Reducing high blood cholesterol level with drugs. *J Am Med Soc* **264**, 3025-3033.
 - Siedel J, Hagele EO, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW (1983). Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* **29**, 1075-1080.
 - Simonescu M, Popov D, Sima A, Hasu M, Costache G, Faitar S, Vulpanovici A, Stancu C, Stern D, Simonescu N (1996). Pathobiochemistry of combined diabetes and atherosclerosis studied on a novel animal model. *Am J Phatol* **148**, 997-1014.
 - Singer AH, Tsao PS, Wang BY, Bloch DA, Cooke JP (1995). Discordant effects of dietary L-arginine on vascular structure and reactivity in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharm* **25**, 710-716.
 - Sosa-Melgarejo JA, Berry CL (1992). Myoendothelial contacts in arteriolosclerosis. *J Pathol* **167**, 235-239.
 - Spady DK, Huettinger MB, Bilheimer DW, Dietschy JM (1987). Role of receptor independent low density lipoprotein transport in the maintenance of tissue cholesterol balance in the normal and WHHL rabbit. *J Lipid Res* **28**, 32-41.
 - Springer TA (1990). Adhesion receptors in the immune system. *Nature* **346**, 425-434.
 - Stary HC (1989). Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* **9**(Suppl 1), 119-132.

- Steinberg D (1991). Antioxidants and atherosclerosis. A current assessment. *Circulation* **84**,1420-1425.
- Strong JP, McGill HC (1962). The natural history of coronary atherosclerosis *Am J Pathol* **40**, 37-49.
- Sugano M Nakashima Y, Tasaki H, Takasugi M, Kuroiwa A, Koide-O (1988). Effects of diltiazem on suppression and regression of experimental atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* **69**, 515-23 .
- Tabor CW, Tabor H (1984). Polyamines. *Annu Rev Biochem* **53**, 749-90.
- Tadolini B, Carini L, Landi L, Varani E, Pasquali P (1984). Polyamine binding to phospholipid vesicles and inhibition of lipid peroxidation. *Biochem Bioph Res Co* **122**, 550-555.
- Tall AR (1993). Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* **34**, 1255-1270.
- Tanzawa K, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Mamour A, Watanabe H (1980). WHHL rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *Febs Lett* **118**, 81-84.
- Thiery J, Nebendahi K, Rapp K, Kluge R, Teupser D, Siedel D (1995). Low atherosclerotic response of a strain of rabbits to diet-induced hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1181-1188.
- Thirumalai CH, Tseng CC, Tabata K, Fitzpatrick LR, Johnson LR (1987). Relationship between ornithine decarboxylase activity and gastric damage. *Am J Physiol* **253**(1 Pt 1), G1-G6.
- Tijburg LB, Wisemen SA, Meijer SW, Weststrate JA (1997). Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis* **135**, 37-47.
- Trinder P (1969). Determination of glucose in blood using oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* **6**, 24-25.

- Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL, Van-Hove CE, Coene MC, Herman AG (1986). Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* **58**, 552-64.
- Voet D y Voet J. (1995) Lipids and Membranes, en Biochemistry. Voet D y Voet J (Eds). Wiley and Sons NY USA. pp.314-320.
- Wahlefeld AW (1979). Total lipids, en Bergmeyer, Methoden der enzymatischen analyse. Bergmryer HU (Ed) Verlag Chemie Weinheim. pp.1878.
- Warnic GR, Knopp FH, Branson L (1990). Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of Nationally Recommended Cutpoints. *Clin Chem* **36**, 15-19.
- Watanabe Y (1980). Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL rabbit). *Atherosclerosis* **36**, 261-268.
- Watts GF, Mandalia S, Slavin BM, Brunt JN, Coltart DJ, Lewis B (1994). Metabolic determinants of the course of coronary artery disease in men. *Clin Chem* **10**, 2240-2246.
- Wissler R, Vesselinovitch D (1968). Experimental models of human atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci USA* **149**, 907-922.
- Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D (1989). Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* **84**, 1086-1095.

- Yuan YV, Kitts DD, Godin DV (1997). Influence of dietary cholesterol and fat source on atherosclerosis in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Brit J Nutr* **78**, 993-1014.
- Zur M, Radcliffe RD, Oberdick J, Nemerson Y (1982). The dual role of factor VII in blood coagulation: initiation and inhibition of a proteolytic system by a zymogen. *J Biol Chem* **257**,5623-5631.

Archives of Medical Research

Luis Benítez-Briblesca, MD
Editor-in-Chief

Fabio Salamanca-Gómez, MD
Associate Editor

Maggie Brunner, MA
Managing Editor

2000/564

Julio 18, 2000

DR. JOSE DOMINGO MENDEZ
*Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Metabólicas*
Hospital de Especialidades "Bernardo Sepúlveda"
Centro Médico Nacional Siglo XXI
P.O. Box 73-032, 03020 México, D.F.

Re: 99/213

**Inhibition of Platelet Aggregation by Putrescine, Spermidine
and Spermine in Hypercholesterolemic Rabbits**

*Norma Corona de la Peña, Jorge A. Sosa-Melgarejo, Rubén Román
Ramos, José D. Méndez*

Dear Dr. Méndez:

We are pleased to inform you that the above mentioned manuscript has been accepted for publication in **Archives of Medical Research**. At a later date we will advise you as to in which issue your article will appear.

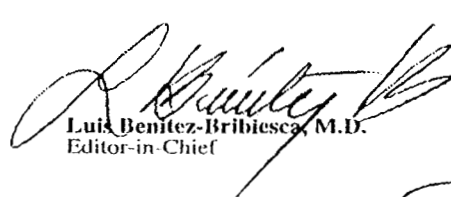
At this time we ask that you classify your paper by marking the appropriate box.

Biomedical Clinical Epidemiological

This will assist us in the preparation of the Table of Contents. We also request that a computer disk of the final version of the text be sent to our office, preferably in Word for Windows. If this is not possible, please indicate which word processor/software has been used.

We thank you for your interest and participation in our Journal.

Sincerely yours,


Luis Benítez-Briblesca, M.D.
Editor-in-Chief


Fabio Salamanca-Gómez, M.D.
Associate Editor


Maggie Brunner
Managing Editor



ELSEVIER LBB'FSG'MB'ans



IMSS

Centro Médico Nacional Siglo XXI, Bloque B, 4º piso, Unidad de Congresos, Av. Cuauhtemoc 330, 06725, México, D.F., México
Telephone and Fax: (+525) 761-1503 http://serpiente.dgsca.unam.mx/serv_hem/revistas/medical/
E-mail: archives@servidor.unam.mx <http://www.elsevier.com>
armedres@cim.spin.com.mx

New!



Tel.: (+525) 627-6982

Published by Elsevier Science Inc.

Inhibition of platelet aggregation by putrescine, spermidine and spermine in hypercholesterolemic rabbits.

ABSTRACT

Background: Hypercholesterolemia causes alterations in platelet function. Platelet hyperaggregation is considered a predisposing factor for atherosclerosis. In this paper the antiaggregating effect of the polyamines putrescine, spermidine and spermine was studied on platelets of normal and hypercholesterolemic rabbits.

Methods: New Zealand rabbits were fed with a cholesterol enriched diet for 10 weeks. Lipids and glucose were determined in serum. The assays of platelet aggregation were carried out using platelet-rich plasma (PRP) obtained from both control and cholesterol-fed rabbits. 2.5 μ moles/ml ADP and 2 μ g/ml collagen were used as inductors of platelet aggregation. In addition, arginase activity and L-arginine content were determined in PRP.

Results: Serum total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations were increased from 26.3 ± 8.1 to 1485.0 ± 26.8 mg/dl and from 15.9 ± 5.9 to 1383.8 ± 58.9 mg/dl respectively, whereas triglyceride concentration increased from 88.3 ± 35.6 to 411.0 ± 154.5 mg/dl upon cholesterol feeding. 75% of platelet aggregation inhibition was observed with 10 μ M of polyamines in PRP of normal rabbits. Spermine inhibited platelet aggregation by 54% in PRP of hypercholesterolemic rabbits when ADP was used as agonist. The order of polyamine action was spermine > spermidine > putrescine. In addition, we found that platelet arginase activity and L-arginine content were unaltered upon hypercholesterolemia.

Conclusions: These results show that the polyamines putrescine, spermidine and spermine have antagonist action in platelet aggregation and suggest a key role of polyamines in platelet

aggregation in normal and hypercholesterolemic conditions.

Key words: L-arginine, polyamines, platelet aggregation, low density lipoprotein, high density lipoprotein.

Abbreviations used in this paper: LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; PRP, platelet rich plasma; ADP, adenosine 5' diphosphate.

INTRODUCTION

The polyamines putrescine, spermidine and spermine are normal constituents of eukaryotic cells and play important roles in the regulation of both physiological and biochemical processes (1). Previous studies have indicated that polyamines can significantly influence biological membranes (2). Because of their cationic nature they tend to interact electrostatically with anions. It is well known that in some situations they mimic the effects of cations like Ca^{2+} by competing for the same anionic sites on phospholipid membranes, thereby modulating the transduction and transmission of receptor-mediated signals (3). Due to chemical properties, these molecules also change membrane fluidity by electrostatically cross-linking membrane components such as phospholipids, but also by modulating both the tertiary structure and the biological activity of proteins (4), and thus indirectly modify a number of membrane activities simultaneously (5). Polyamines, and in particular spermine may have gross regulatory functions on cell and organelle metabolism (5,6).

In mammals ornithine decarboxylase catalyzes the formation of putrescine from ornithine. This reaction is described elsewhere (7,8). Another decarboxylase, S-adenosyl-L-methionine decarboxylase (SAMDC), and spermine and spermidine synthases are also needed for polyamine

biosynthesis.

Arginase which catalyzes the hydrolysis of L-arginine to form L-ornithine and urea is considered one of the polyamine biosynthetic enzymes in extrahepatic tissues (9). It provides ornithine for the subsequent formation of putrescine, the precursor of the other polyamines. The presence of this enzyme was detected and measured in human platelets as well as platelets of normal and diabetic rats (10). This enzyme has been associated with the biosynthesis of polyamines needed to regulate platelet function.

Platelets are essential in haemostatic repair, however, they also play an important role in both thrombosis (11) and atherogenesis (12,13). The effect of L-arginine and polyamines on platelet aggregation has been reported in relation to hematologic complications in diabetes mellitus (10), in addition to other studies on the effect of L-arginine (15) and polyamines (16) on platelet aggregation, however, no studies on the role of polyamines in platelet aggregation in conditions of hypercholesterolemia have been done.

This work was designed to study the effect of polyamines on platelet aggregation in rabbits with induced hypercholesterolemia.

MATERIALS AND METHODS

10 male New Zealand rabbits (NZR) 4 months old with a mean weight about 4 kg maintained in a biotery were fed *ad libitum* standard rabbit chow (Conejina E.F., Purina Inc.) after acclimatized for at least 2 weeks, the rabbits were separated into two groups containing 5 rabbits per group.

Group I received neither treatment and served as control. The animals in group II were fed chow containing 10 % cholesterol (Sigma Chem. Co. Cat. C-8506) for 10 weeks.

Blood sample collection. In order to make biochemical determinations blood was taken from the central ear vein and collected in test tubes containing trisodium citrate as anticoagulant (3.8%, pH 6.3, J.T. Baker No. 3646) at the beginning and at the end of the 10 weeks. Blood was centrifuged at 1500 rpm for 10 min. and platelet rich plasma (PRP) was collected. Total cholesterol (17), glucose (18) and triglycerides (19) were assayed enzymatically. In addition, HDL-cholesterol was measured by a precipitation method (20). and LDL-cholesterol was calculated by the Friedewald formula (21).

Platelet aggregation. Platelet aggregation was assayed in PRP according to the O'Brien (22) method, and recorded in a Payton, Chrono-Log aggregometer (Linear Instrument Corp.). Antiaggregating activity was studied by the addition of 10 μ M putrescine dihydrochloride (Sigma Chem. Co. Cat P-7505), 10 μ M spermidine trihydrochloride (Sigma Chem. Co. Cat. S-2501), and 10 μ M spermine tetrahydrochloride (Sigma Chem. Co. Cat. S-2876), which were incubated (37°C, stirring at 1000 rpm) 3 min. before the addition of 2.4 μ moles ADP (Sigma Chem. Co. Cat A-855-5) or 2 μ g/ml collagen (Sigma Chem. Co. Cat. 885-1). Platelet aggregation was then monitored for 5 min.

L-arginine content and arginase activity. Arginase activity in platelets was assayed colorimetrically by the Kung et al. (23) method as described previously (10). L-arginine content was determined by measuring urea formation under the same principle but using purified liver arginase (Nutritional Biochemical's Co.).

Total protein. Total protein content was measured in blood plasma according to Lowry et al. (24)

Results of plasma concentrations of lipids and glucose, and platelet aggregation were expressed

in mg/dl and percentage of aggregation respectively, as mean \pm S.D. Significance of differences between the means of tests and control studies were established by Student's t-test; $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Cholesterol levels. The hypercholesterolemic state was produced by the addition of 10% cholesterol to the standard diet and it was well characterized by measuring several clinical parameters including total cholesterol, triglycerides, and other such as HDL-cholesterol and LDL-cholesterol (Table 1). A significant increase in cholesterol levels was observed in the group fed the cholesterol enriched diets after 10 weeks.

Triglycerides. Triglyceride concentrations in the rabbits fed with 10% cholesterol were significantly higher than those of control group ($p < 0.05$) while control group did not show significant differences after 10 weeks (Table 1).

Lipoproteins. LDL-cholesterol levels were altered in the experimental group. Increased levels of LDL-cholesterol were observed ($p < 0.05$) which were similar to the increase in total cholesterol for the 10% cholesterol-fed rabbits. No significant change was observed in the control group at the end of the experiment (Table 1).

Glucose. There were no significant changes in glucose levels among the two groups studied (Table 1).

Arginase activity and L-arginine content. Arginase activity, arginine content and platelet count were evaluated in the control and 10% cholesterol-fed groups. There were not significant differences between the two groups in parameters evaluated (Table 2).

Antiaggregating effect of polyamines. Platelet aggregation was evaluated in response of ADP (2.5 μ moles/ml) and collagen (2 μ g/ml). PRP from control rabbits showed a higher aggregation in response to collagen than in response to ADP (Table 3) and the three polyamines tested inhibited approximately 75% the platelet aggregation when ADP was used as agonist, whereas in the presence of collagen the inhibition caused by polyamines was about 80%.

Platelet aggregation was significantly higher in hipercholesterolemic plasmas than in control plasmas (Table 4). Polyamines also inhibited platelet aggregation in hipercholesterolemic plasmas. Putrescine inhibited aggregation by 20%, spermidine 49% and spermine 54%. It is also worth noting that hypercholesterolemic plasmas showed aggregation in the absence of any agonist corresponding to approximately 10% and this hyperaggregation was almost completely inhibited by polyamines.

DISCUSSION

The results obtained in this study in normal and hypercholesterolemic rabbits indicate that the polyamines putrescine, spermidine and spermine have a positive effect as antagonists in platelet aggregation, when the aggregation was induced by ADP or collagen.

The antiaggregating effect of the polyamines may be partially explained by several mechanisms: the first involves the regulation of two enzymes, the phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC). The PLC is the key enzyme in the arachidonic acid release for further synthesis of prostaglandins endoperoxides, responsible for the aggregation by ADP release. However, although polyamines inhibit these two enzymes in cell free systems (25, 26), their positive charge, and the lack of a specific platelet uptake system (27) for these

molecules makes it unlikely that exogenous polyamines may inhibit platelet aggregation by this mechanism. On the other hand, it has been demonstrated that polyamines do not interfere with Ca^{2+} mobilization in the platelet (16), and therefore this may not be the mechanism by which polyamines inhibit platelet aggregation.

A third mechanism, is through the binding of polyamines to the fibrinogen receptors in a similar way to the binding of amino-sugars, which have been described also to inhibit the activity of endogenous platelet lectin (28). Polyamines, like amino sugars and basic amino acids (29) inhibit platelet aggregation with an order of magnitude dependent on the charge of the molecule. Agam et al. (29) suggested the presence of cooperative surface interactions that underline platelet aggregation and platelet lectin activity. The polyamines inhibit aggregation in the presence of many agonist: ADP and collagen as shown here, thrombin (16, 10) and epinephrine (10), therefore the inhibition may be exerted via the common mechanism that mediates aggregation in response to all platelet agonist i.e. fibrinogen binding and/or lectin activity (30, 31).

This study focussed on the inhibition of platelet aggregation in hypercholesterolemic platelets. In accordance with previous reports (32), hypercholesterolemic PRP showed increased aggregation, without and an increase in the platelet count as described by others (33). It is more likely that the hyperaggregability is caused by the high levels of LDL-cholesterol which has been described to promote aggregation (34), enhance mobilization of arachidonate from phospholipids (35), and increase thromboxane B₂ production (36). On the other hand fibrinogen binding to ADP-activated platelets is increased with hypercholesterolemia (37).

Platelet aggregation is one of the main mediators involved in thrombosis and atherosclerosis, and the role of plasma lipids in thrombosis is evidenced by the high incidence of atherosclerosis and thrombotic complications in hyperlipidemic humans (38). In this respect, it is well known that dietary fats alter platelet function, and that there is an inverse relationship between aggregation and platelet cholesterol content (33).

Regulation of platelet aggregation by polyamines may be supported by the demonstration of putrescine, spermidine and spermine in platelets (39). However, there are not reports of changes in the concentration of these polyamines in response to hypercholesterolemia. Other studies are been carried out in order to address these question.

In this study the presence of arginase activity in PRP was demonstrated, and was not affected by hypercholesterolemia. The enzyme may be needed to provide the ornithine required for polyamine synthesis as has been demonstrated in other tissues apart from the liver (9).

Arginine which is the substrate of arginase was not deficient in hypercholesterolemic rabbits, in accordance with Cooke et al (40). Interestingly, arginine deprivation is a potent stimulus for increasing putrescine transport to vascular endothelial cells (41). However, as there is not an arginine deficiency in hypercholesterolemia, as shown here, it is not likely that polyamine transport to the subintimal space may be increased, and exogenous polyamine supplementation may be needed to reduce platelet activation in the

hypercholesterolemic state. Other factors like arginine conversion to nitric oxide may also influence polyamine metabolism and content in the arterial wall.

In conclusion, these results show a positive antiaggregating effect of polyamines on normal and hypercholesterolemic PRP, in the presence of different agonists studied. The relation of polyamine content and platelet function, as well as the contribution of these molecules to prevent the development of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis is being investigated in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially financed by grant from FOFOI (Project FP0038/220) and CONACYT (538P-M9506). The authors would like to thank Dr. Pablo Rivera, Head of the Central Laboratory and Química Guadalupe Montiel from the Laboratorio de Coagulación Especial, Hematology Service of the Specialities Hospital of the 21st Century, National Medical Center, for their help in carrying out the necessary clinical tests related to this study. N. Corona de la Peña is a CONACYT Doctorate Fellow.

REFERENCES

1. Williams-Ashman HG, Lockwood UM. Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. *Ann NY Acad Sci* 1970; 171: 882.
2. Schuber F. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem J* 1989; 260: 1.
3. Koenig H, Goldstone A, Ly CY. Polyamines regulate calcium fluxes in rapid plasma membrane response. *Nature* 1983; 305: 530.

- 4.-Yung MW, Green C. The binding of polyamines to phospholipid bilayers. *Biochem J* 1986; 35: 4037.
- 5.- Bratton DL. Polyamine inhibition of transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the erythrocyte ghost. *J Biol Chem* 1994; 269: 22517.
6. Lovaas E. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 119.
7. Bachrach U. Polyamines. Bachrach ed. New York Academic Press, 1976; 126.
8. Tabor H, Tabor CW. Spermidine, spermine and related amines. *Pharmacol Rev* 1964; 16: 245.
9. Méndez JD, Arreola MA. Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Int* 1992; 28: 569.
10. Méndez JD, Zarzoza E. Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43: 311.
11. Harker L, Slichter S. Platelet and fibrinogen consumption in man. *N Engl J Med* 1972; 287: 999.
12. Ross R, Raines EW, Bowen DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; 46: 155.
13. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488.
14. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S, Palmer-RM, Moncada-S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193.
15. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Characterization of the L-arginine nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 325.
16. Joseph S, Krishnamurth S, Kakkar U. Effect of the polyamine-spermine on agonist-induced human platelet activation-specific inhibition of “aggregation-independent” events induced by

- thrombin, but not by collagen, thromboxane mimetic, phorbol ester on calcium ionophore. *Thromb Haemost* 1987; 57: 191.
17. Katterman R. Rapid determination of total and free cholesterol in serum. *Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 245.
 18. Trinder P. Determination of glucose in blood using oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969; 6: 24.
 19. Wahlefeld AM. Triglycerides, determination after enzymatic hydrolysis. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York Academic Press, 1974; 1831.
 20. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein-cholesterol in plasma without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499.
 21. Warnick GR, Knopp RH, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of Nationally Recommended Cutpoints. *Clin Chem* 1990; 36: 15.
 22. O'Brien JR. Platelet aggregation. II. Some results from a new method of study. *J Clin Pathol* 1962; 15:452.
 23. Kung JJ, Brooks SB, Taknay JP, Leonard LL, Talmage DW. Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J Exptl Med* 1977; 146: 665.
 24. Lowry DH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
 25. Nahas N, Graaf G. Inhibitory activity of polyamines on phospholipase C from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1982, 109: 1035.

26. Qi D, Schatzmann RC, Mazzei GT, Turner RS, Rayner RL, Liao S, Fueo JF. Polyamines inhibit phospholipid-sensitive and calmodulin-sensitive Ca²⁺-dependent protein kinases. *Biochem J* 1983; 213:218.
27. Nadlel SG, Takahashi MT. Putrescine transport in human platelets. *Biochem Biophys Acta* 1985; 812:345.
28. Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mustard JF. Effects of amino-sugars on platelet aggregation and fibrinogen binding. *Thromb Haemost* 1984; 52:75.
29. AgamG, Garther TK, Livine A. Inhibition of platelet aggregation and endogenous lectin activity by oligoamines. *Throm Res* 1984; 33: 245.
30. Peerschke EIB. The platelet fibrinogen receptor. *Semin Hematol* 1985; 22: 241.
31. Gartner TK, Gerrard JM, White JG, Williams DC. Fibrinogen is the receptor for the endogenous lectin of human platelets. *Nature* 1981; 289: 263.
32. Shattils J, Cooper RA. Membrane microviscosity and human platelet function. *Biochemistry* 1976; 15:4832.
33. Berlin E, ShapiroSG, Friedland M. Platelet membrane fluidity and aggregation of rabbit platelets. *Atherosclerosis* 1984; 51:223.
34. Kowalska MA, Tuszynski GP, Capuzzi DM. Plasma lipoproteins mediate platelet adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172:113.
35. Ardlie NG, Selley MI, Simons LA. Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1989; 76:117.
36. Kramer RH, Jakubowski JA, Villancourt R. Effect of membrane cholesterol on phospholipid metabolism in thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1982; 257:6844.

37. Pawlowska A, Swiatkowska M, Krzeslowska J, Pawlicki L, Cierniewski CS. Increased platelet-fibrinogen interaction in patients with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1993, 103:13.
38. Gerrard JM, Saxena SP, McNicol A. Mechanisms of platelet activation and control. Authi KS, ed. New York Plenum Press, 1993; 209.
39. Rennert O, Shukla J. Polyamines in health and disease In: Campbell R, Morris D, Bartos D, Daves G, Bartos F, eds. *Advances in polyamines research*. New York Raven Press, 1978; 196.
40. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 1992; 90:1168.
41. Bogle RG, Mann GE, Pearson JD. Endothelial polyamine uptake: selective stimulation by L-arginine deprivation or polyamine depletion. *Am J Physiol* 1994; 266 (Cell Physiol 35):C776.

TABLES

Table 1. Mean \pm S.D. of cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol levels in plasma of rabbits treated and non treated with cholesterol.

| | Control | | 10% cholesterol | |
|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| | Week 0 | Week 10 | Week 0 | Week 10 |
| Glucose | 163.4 \pm 7.7 | 120.8 \pm 3.8 | 98.0 \pm 7.9 | 126.3 \pm 6.6 |
| Cholesterol | 29.6 \pm 2.9 | 29.6 \pm 2.9 | 26.3 \pm 8.1 | 1485.0 \pm 26.8* |
| Triglycerides | 170.0 \pm 22.2 | 127.2 \pm 7.7 | 88.3 \pm 35.6 | 411.0 \pm 154.5* |
| LDL-cholesterol | 12.3 \pm 7.8 | 19.5 \pm 4.1 | 15.9 \pm 5.9 | 1383.8 \pm 58.9* |
| HDL-cholesterol | 34.8 \pm 6.7 | 25.4 \pm 3.0 | 14.3 \pm 5.8 | 19.0 \pm 4.5 |

Values are expressed as mg/dl

The values correspond to 5 determinations

* The values are significant at $p < 0.05$ compared with the control

Table 2. Platelet count, arginine content and arginase activity in serum of normal and hypercholesterolemic rabbits

| | Normal rabbits | Hypercholesterolemic rabbits |
|--|----------------|------------------------------|
| Platelet count (platelets/ml) | 276000* | 247000* |
| Total proteins (mg/ml) | 64.6 ± 10.6 | 67.5 ± 17.7 |
| Arginine content (nmol/mg protein) | 793.4 ± 401.4 | 704.3 ± 322.2 |
| Arginase activity (nmoles urea/mg protein/min) | 2.49 ± 0.9 | 2.66 ± 0.6 |

The values correspond to mean ± S. D. of 3 determinations.

*Values are significant at $p < 0.05$

Table 3. Antiaggregating effect of polyamines (putrescine, spermidine, spermine) on two different agonists in plasma of normal rabbits.

| Agonist | Control | Putrescine (10 μ M) | Spermidine (10 μ M) | Spermine (10 μ M) |
|--------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| ADP (2.5 μ moles/ml) | 20.7 ± 2.8 | 5.0 ± 3.0 | 3.6 ± 1.1 | 4.0 ± 2.8 |
| Collagen (2 μ g/ml) | 57.3 ± 18.4 | 11.6 ± 2.8 | 15.3 ± 0.5 | 11.3 ± 1.1 |

Each value represents the percent of aggregation and correspond to mean ± S.D. of 3 determinations.

All values are significant at $p < 0.01$ compared with control

Table 4. Antiaggregating effect of polyamines (putrescine, spermidine and spermine) on two different agonists in plasma of hypercholesterolemic rabbits.

| Agonist | Control | Putrescine (10 μ M) | Spermidine (10 μ M) | Spermine (10 μ M) |
|--------------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| ADP (2.5 μ moles/ml) | 42.6 \pm 3.0 | 33.8 \pm 4.2 | 21.6 \pm 3.7 | 19 \pm 4.2 |

Each value represents the percent of aggregation and correspond to mean \pm S.D. of 3 determinations.

The values are significant at $p < 0.01$.