

Los niveles elevados de fibrinógeno plasmático podrían estimular la actividad fibrinolítica de la pared arterial e inducir la generación de plasmina que regularía la activación de las MMPs, contribuyendo ambas a la digestión enzimática de la matriz extracelular.

1. Estudiar la influencia del fibrinógeno en el funcionalismo enzimático de la pared arterial.
2. Comprobar si la capacidad generadora de plasmina de la pared arterial regula la activación de las MMPs.
3. Estudiar si hay diferencias morfológicas, funcionales y evolutivas del desarrollo de la lesión arteriosclerótica en carótida, aorta y femoral y la existencia de posibles marcadores plasmáticos.
4. Relación de factores de riesgo con la patología de los sectores arteriales estudiados.

## SELECCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DONADORES

El grupo de estudio está formado por 127 pacientes de los que se extrajeron muestras de arterias en el servicio de Cirugía Vascular del Hospital del Mar (IMAS), recogidas por el Dr. Manuel Miralles y el Dr. August Corominas (71 muestras), durante el periodo comprendido entre el año 1994 y 1996 (proyecto CICYT nº SAF-96-0439) y en el servicio de Cirugía Vascular de la Cruz Roja, recogidas por el Dr. August Corominas (56 muestras), durante el periodo comprendido entre el año 1997 y 1998 (proyecto CICYT nº SAF-96-0313), ambos de Barcelona. Los pacientes incluidos en esta tesis padecían enfermedad vascular, necesitaban tratamiento quirúrgico para la reparación de las arterias y no presentaban procesos infecciosos concomitantes. Para la realización de este estudio, se contó con la autorización del Comité Ético de dichos centros.

Las piezas proceden de tres lugares anatómicos distintos:

- Sector de bifurcación carotídea a nivel del cuello (41 muestras)
- Sector aorto-ilíaco a nivel abdominal (37 muestras)
- Sector femoro-poplíteo a nivel de las extremidades inferiores (49 muestras)

Todos los pacientes han sido incluidos en un protocolo de recogida de datos que incluye todas sus características básicas:

- Fecha
- Datos de filiación: edad, sexo, domicilio, teléfono.
- Peso y talla.
- Historia clínica: fumadores, ingesta de alcohol, enfermedades intercurrentes.
- Parámetros hematológicos básicos y bioquímicos.
- Perfil lipídico.
- Electrocardiograma y estudio cardíaco.
- Estudio vascular completo.

## DESCRIPCIÓN DE LA EXTRACCIÓN QUIRÚRGICA DE LA MUESTRA

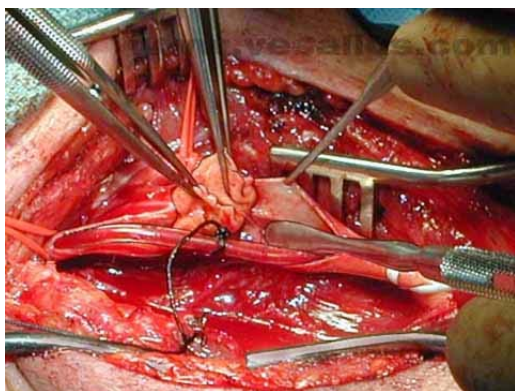
Las arterias se han obtenido durante el acto quirúrgico. Su procedencia puede ser: de un “by pass” aorto-femoral o femoro-poplíteo; de una extracción para sustituirlas por otras sintéticas; de una amputación; o de una endarterectomia (fragmento de la endarterectomia mas ojal de arteria para realizar la intervención).

Un fragmento de las mismas es enviado a Anatomía Patológica del hospital donde se realiza la intervención y el resto es congelado inmediatamente a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido y enviado para su estudio a la Unidad de Trombosis y Arteriosclerosis del IIBB-CSIC (Barcelona).

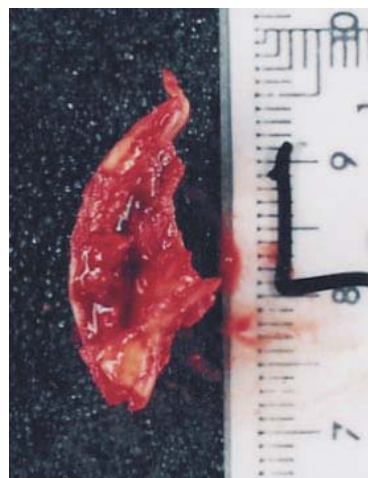
## CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

Las muestras presentan cuatro características distintas:

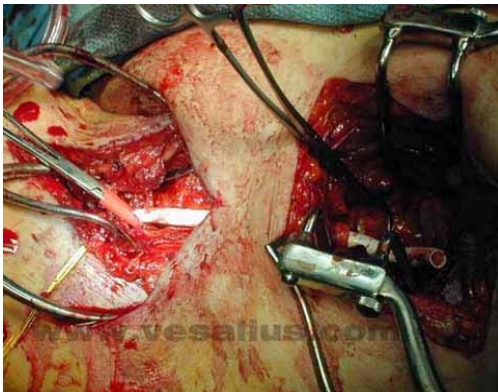
- 1- Placas ateromatosas del interior de las arterias, que engloban habitualmente las capas íntima y media de la arteria y que se extraen al realizar la técnica quirúrgica de endarterectomia (figuras 22 y 23).
- 2- Ojales de arteria sin patología relevante, obtenidos al realizar un “by-pass”, técnicas como la endarterectomia, o procedentes de pacientes donantes de órganos (figura 24 y 25).
- 3- Fragmentos completos de arterias pequeñas enfermas de unos 2-3 cm de longitud que se extraen para reimplantar arterias sintéticas (figuras 26 y 27 ).
- 4- Fragmentos de arterias mayores sustituidos por injertos o procedentes de amputaciones (figuras 28 y 29 ).



**Figura 22.-** Técnica quirúrgica de endarterectomia (Vesalius, 2001).



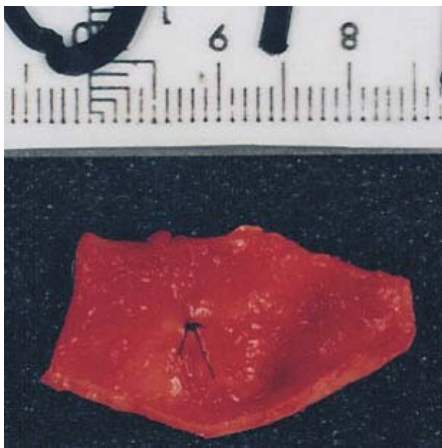
**Figura 23.-** Arteria carótida extraída por endarterectomia, endotelio.



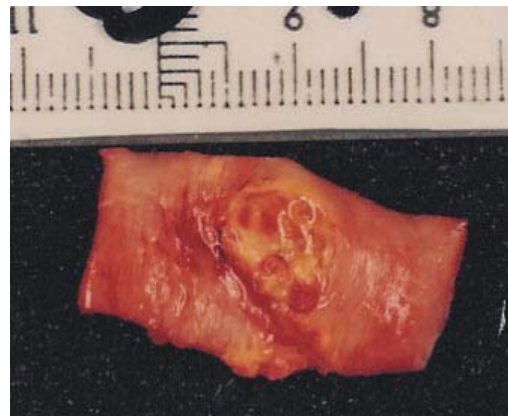
**Figura 24.-** Cirugía en arteria femoral (Vesalius, 2001).



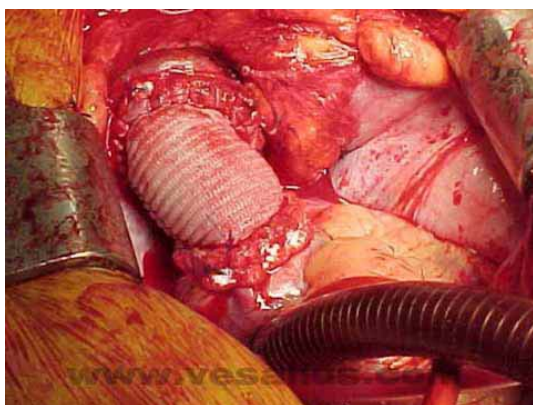
**Figura 25.-** Arteria femoral sin patología relevante.



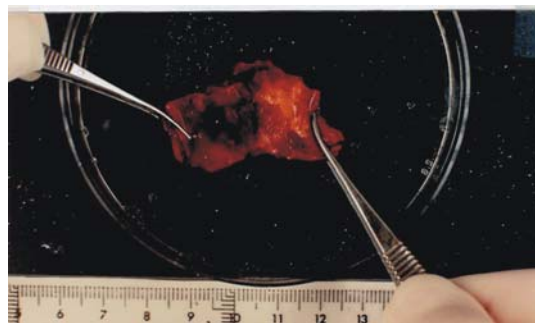
**Figura 26.-** Arteria femoral lesionada, endotelio.



**Figura 27.-** Arteria femoral lesionada, adventicia.



**Figura 28.-** Cirugía a nivel de arteria aorta (Vesalius, 2001).



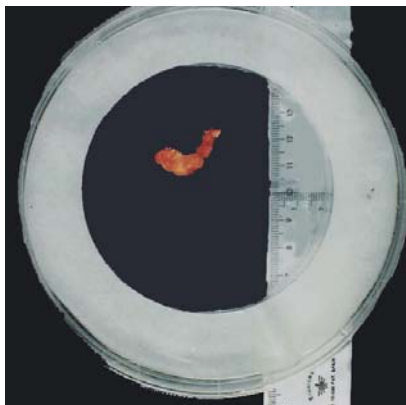
**Figura 29.-** Arteria aorta lesionada, endotelio.

### **EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE**

La extracción de sangre se efectúa siempre por la misma persona con las mismas condiciones de recogida. Se recogen 25 c/c de sangre sin practicar previamente éxtasis venoso con citrato sódico para todos los parámetros plasmáticos excepto para el fibrinopeptido A (FPA), en este caso se utiliza un anticoagulante especial suministrado por la casa comercial (Boheringer Mannheim GmbH Diagnostica), que contiene una mezcla de citrato sódico, heparina y aprotinina, en proporción 1:9) Una parte de la sangre se centrifuga y el resto se procesa en el laboratorio del hospital. El plasma se reparte en tubos de 1 ml, y posteriormente se congela a menos 70°C, hasta su traslado, en las mismas condiciones que las arterias, a la Unidad de Trombosis y Arteriosclerosis del IIBB-CSIC.

### **PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

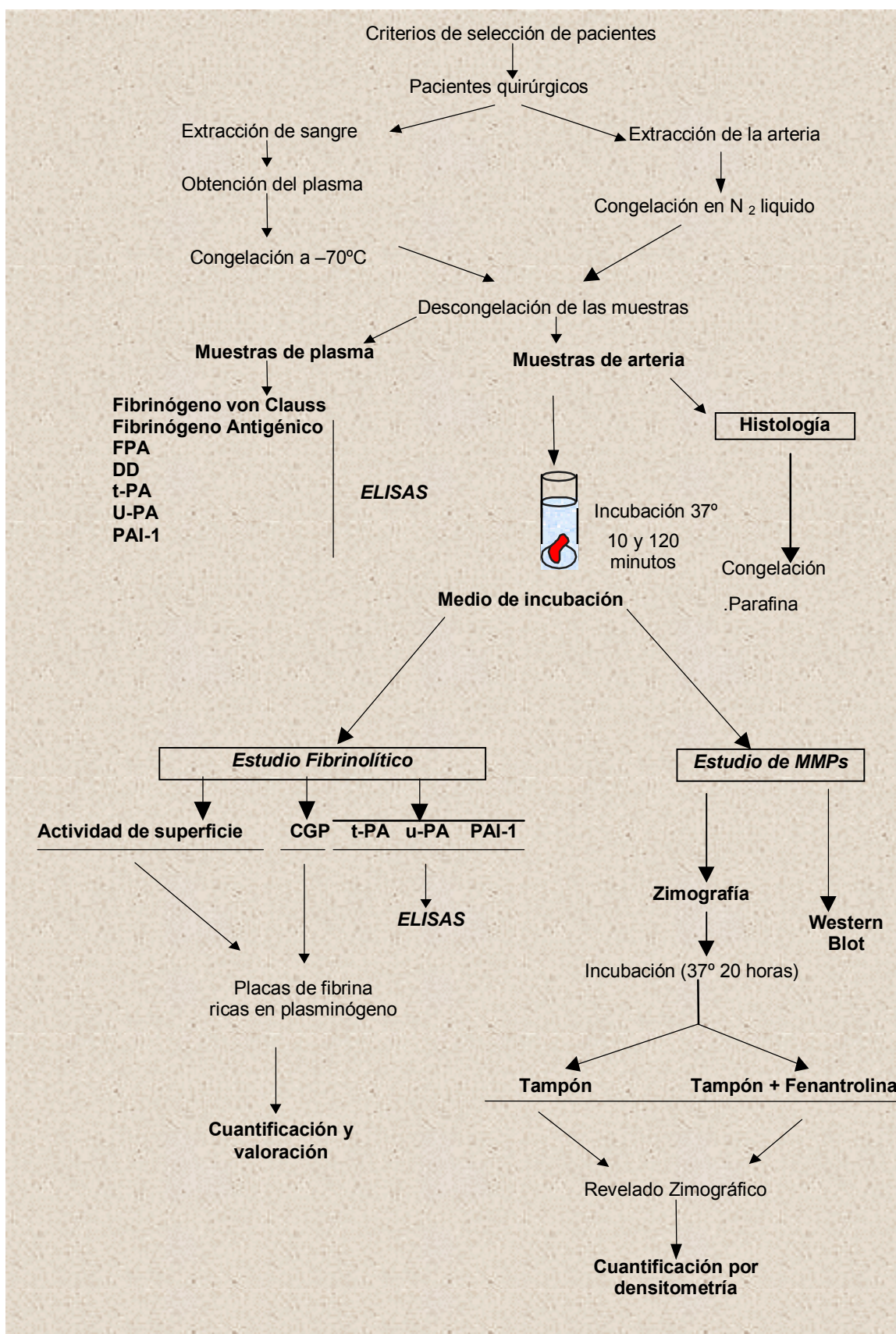
Una vez recibidas las muestras de plasma y arterias, se descongelaron en grupos según las normas propuestas por Naber (Naber SP, 1992), en cámara húmeda (figura 30) para procesarlas convenientemente según las técnicas a aplicar. De cada muestra de tejido se obtienen dos fragmentos, uno para el estudio bioquímico y otro para el estudio histológico.



*Figura 30.-* Cámara húmeda



DISEÑO EXPERIMENTAL



**VALORACIONES EN FRAGMENTOS ARTERIALES:****Actividad fibrinolítica de la pared arterial*****Actividad fibrinolítica de las superficies de la pared :***

Se descongelan las arterias y se lavan con solución fisiológica. Se coloca la arteria en una cámara húmeda y se captan las moléculas de la superficie de la de la íntima y la adventicia del vaso, con un disco de celulosa (Schleicher&Schuell, 589<sup>1</sup>) de 5 mm de diámetro durante dos minutos. Se transfiere el disco a una lámina de fibrina humana rica en plasminógeno, la preparación de esta lámina se especifica en el apartado de preparación del coágulo laminar de fibrina. Se deja incubar durante 20 horas a 37°C. Las valoraciones de los halos de lisis producidos se realizan por duplicado tanto en adventicia como íntima, frente a una curva estándar de uroquinasa, como se detalla en el apartado de valoración frente a uroquinasa (Padró T, 1988).

***Capacidad generadora de plasmina:***

Se corta un fragmento de la arteria correspondiente al utilizado en el apartado 1-1, de un tamaño determinado (8mm de diámetro) con un sacabocados estéril (Steiefel) y se incuba en 1 mililitro de tampón tris (pH= 7,4) a 37°C durante 10 y 120 minutos, cambiando el medio de incubación a los 10 minutos. Se alicuotan los incubados y se les añade tween en proporción 0,2%. Se colocan 20µl de estos incubados sobre una lámina de fibrina rica en plasminógeno y se deja incubar 20 horas a 37°. El resto de líquido de incubado se alícuota y congela para el resto de valoraciones bioquímicas. Se procede al secado del fragmento arterial incubado, en papel secante con peso para facilitar el proceso, durante 48 horas, transcurridas las cuales se pesa el fragmento. Las valoraciones se realizan por duplicado, frente a una curva estándar de uroquinasa, como se detalla seguidamente.

***Preparación del coágulo laminar de fibrina***

La valoración de las distintas muestras fibrinolíticamente activas se ha efectuado sobre placa de fibrina rica en plasminógeno según la metodología desarrollada por Villaverde (Villaverde CA, 1977), la cual es una modificación de la técnica descrita inicialmente por Astrup (Astrup T, 1952) y mejorada posteriormente por él mismo y otros autores a fin de conseguir un método de alta sensibilidad y reproducibilidad (Jespersen J, 1983).



El principio de esta técnica consiste en colocar muestras fibrinolíticamente activas sobre una malla de fibrina, desarrollada en una placa de Petri y cuantificar la cantidad relativa de activadores en función del área de fibrina lisada (expresada como diámetro) después de 20 horas de incubación en ambiente húmedo a 37° C.

Para ello se prepara una solución de fibrinógeno rico en plasminógeno (Fibrinógeno humano, Sigma) al 4‰ en tampón veronal (0,1N a pH= 7,8). Esta solución se deja a 37° durante 45 minutos y se filtra.

Paralelamente se prepara una solución de trombina bovina (Menarini) disuelta en cloruro cálcico (0,025 M) de forma que se obtiene una solución con una concentración final de 5NIHU/ml.

Se colocan las placas de Petri de plástico de 90 mm de diámetro en una estufa a 37° C y cuando la temperatura es estable se colocan 2 mililitros de la solución de trombina en cada placa y sobre ésta se vierten 5 mililitros de la solución de fibrinógeno, evitando la formación de burbujas, y se reparte uniformemente sobre la superficie de la placa (toda la operación se realiza a 37°). Se deja en reposo a 37°C en una superficie plana y nivelada hasta su coagulación, consiguiéndose una lámina de 3mm de espesor.

Sobre esta lamina se colocaran las muestras a valorar. Para detener la lisis de la fibrina, después de las 20 horas de incubación, se utiliza un método que induce la desnaturalización de la proteína vertiendo sobre ella una solución saturada de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$ . Esta solución se deja actuar durante unos 5 minutos y se procede al lavado de la placa con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Por este método la fibrina translúcida sufre un proceso de opacificación, que facilita su posterior valoración. Se valora el área de lisis tanto de los discos como de los incubados frente a una curva estándar de uroquinasa, por analizador de imágenes utilizando una videocámara SONY XC-77 CE y software MCID, expresando los resultados en UP(unidades Ploug)  $10^{-2}/\text{cm}^2$  para la actividad fibrinolítica de superficie y en UP  $10^{-2}/100$  mg tejido seco para la capacidad generadora de plasmina de la pared. 1UP se define como la cantidad de activador que provoca la lisis de un coagulo de fibrina de 500 mg y 7 mm de diámetro a 37° C en 3 minutos cuando 100 U lo hacen en 30 minutos. 1UP equivalen a 1,85 UI.

### ***Valoración frente a uroquinasa***

Se prepara una curva patrón con este activador partiendo de viales de 25.000 UP, donados por UCB, a las concentraciones de 0,16; 0,08; 0,04; 0,02; 0,0125 UP, en tris-tween (pH=7,4) valorándose la actividad fibrinolítica de las distintas concentraciones, según la metodología descrita. El punto intermedio de la curva (0,04) se coloca en todas las placas, tanto patrón como problemas, lo que permite corregir defectos individuales de las placas debidos a factores imponderables. Los diámetros obtenidos para las distintas muestras problema se interpolan en la curva (figura 31) , expresándose así los resultados finales en unidades Ploug de uroquinasa (UP).



**Figura 31.-** Placas de fibrina con los halos de las concentraciones de la curva de uroquinasa.

### **Activadores e inhibidores de la fibrinólisis**

**t-PA:** Determinación cuantitativa por la técnica de ELISA del activador tisular del plasminógeno en el líquido de incubación del tejido (Holvoet P, 1985). Kit Asserachrom t-PA Boehringer Mannheim Diagnostica Stago. Resultados expresados en ng/ml.

**u-PA:** Determinación cuantitativa por ISAC de u-PA y sc-uPA antigénicas en el líquido de incubación del tejido (Astedt B, 1976; Ranby M, 1986). Kit TintElize uPA Biopool International. Resultados expresados en ng/ml.

**PAI-1:** Determinación cuantitativa por ELISA del inhibidor del activador del plasminógeno en el líquido de incubación del tejido (Declerck PJ, 1988). .Kit Asserachrom PAI-1 Boehringer Mannheim Diagnostica Stago. Resultados expresados en ng/ml.

## **Evaluación de metaloproteasas**

### ***Estudio zimográfico:***

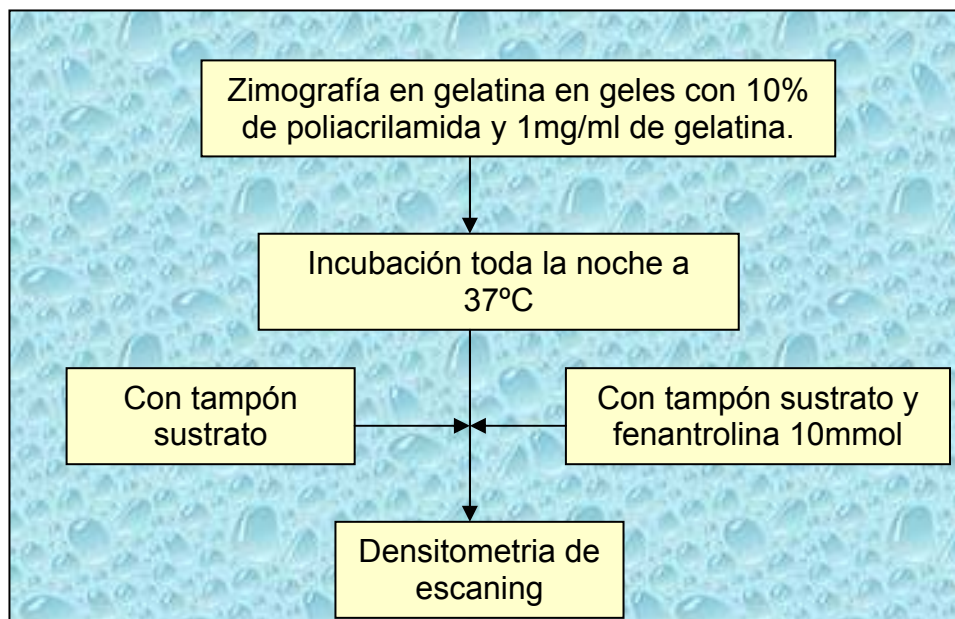
Se realizan zimografías según técnica propuesta por Hibbs (Hibbs MS, 1985) y adaptada por Galis (Galis Z, 1994a), en geles SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida que contienen 1 mg/ml gelatina (Bio-Rad), y con un gel empaquetador al 4%. En los geles se colocan estándares de peso molecular pre-teñidos (111, 73, 47.5, 33.9, 28.8 y 20.5 Kd. Prestained SDS-PAGE Standards Low Range; BIO-RAD), muestras del líquido de incubación de las arterias y estándares de MMPs MMP-2 humano purificado (Purified Human MMP-2. Chemicon International, INC) y MMP-9 humano purificado (Purified Human MMP-9. Chemicon International, INC). De los estándares se parte de una concentración de proteína de 5µg por vial y se prepara una solución madre con tampón Tris-HCL 5mM, pH 7,5, 0,1mM.

Las muestras y los estándares de MMPs son resuspendidos con tampón no reductor (10% SDS, Tris-HCl 0,5M a pH= 6,8; sacarosa, azul de bromofenol al 0,5 % y H<sub>2</sub>O) en proporción 75 microlitros de incubado o estándar mas 25 microlitros de tampón no reductor. De esta solución se colocan 10 microlitros en cada pocillo. La concentración final de los estándares en el pocillo es de 6 ng/10 µl.

Los geles corren a un voltaje de 100V en tampón de corrido a pH=8,3 durante 2 horas. Una vez finalizada la incubación se lavan los geles con Triton X-100 2,5% para eliminar el SDS y reactivar la actividad enzimática, durante 30 minutos en agitación, cambiando el triton cada 15 minutos. Posteriormente se incuban en tampón Tris-HCl 50 mmmol/L con 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, durante toda la noche a 37° C.

Para la identificación de metaloproteasas se realizan dos geles idénticos y uno se incuba con el tampón mencionado y el otro con el tampón mas un inhibidor específico de MMPs la 1,10 fenantrolina a una concentración 10 mmol (Sigma), ver figura 32 .

Se tiñen los geles con azul Coomassie al 0,5% durante 30 minutos (se tiñe todo el gel de azul) y se decolora hasta detectar las bandas de lisis de las proteínas con actividad gelatinolítica (bandas transparentes). Este método detecta tanto las formas activas como inactivas. El área de lisis producida en el gel por la actividad gelatinolítica de las MMPs se lee por densitometría de scanning (Bio-Rad Multi-Analyst TM/pc). Los resultados se expresan por DOxmm<sup>2</sup>/1g tejido. Con el mismo sistema se procede a la extrapolación y determinación de los PM de las bandas de lisis con respecto a los estándares de peso molecular.



**Figura 32.-** Proceso de identificación de las MMPs con un inhibidor específico.

#### **Western blot:**

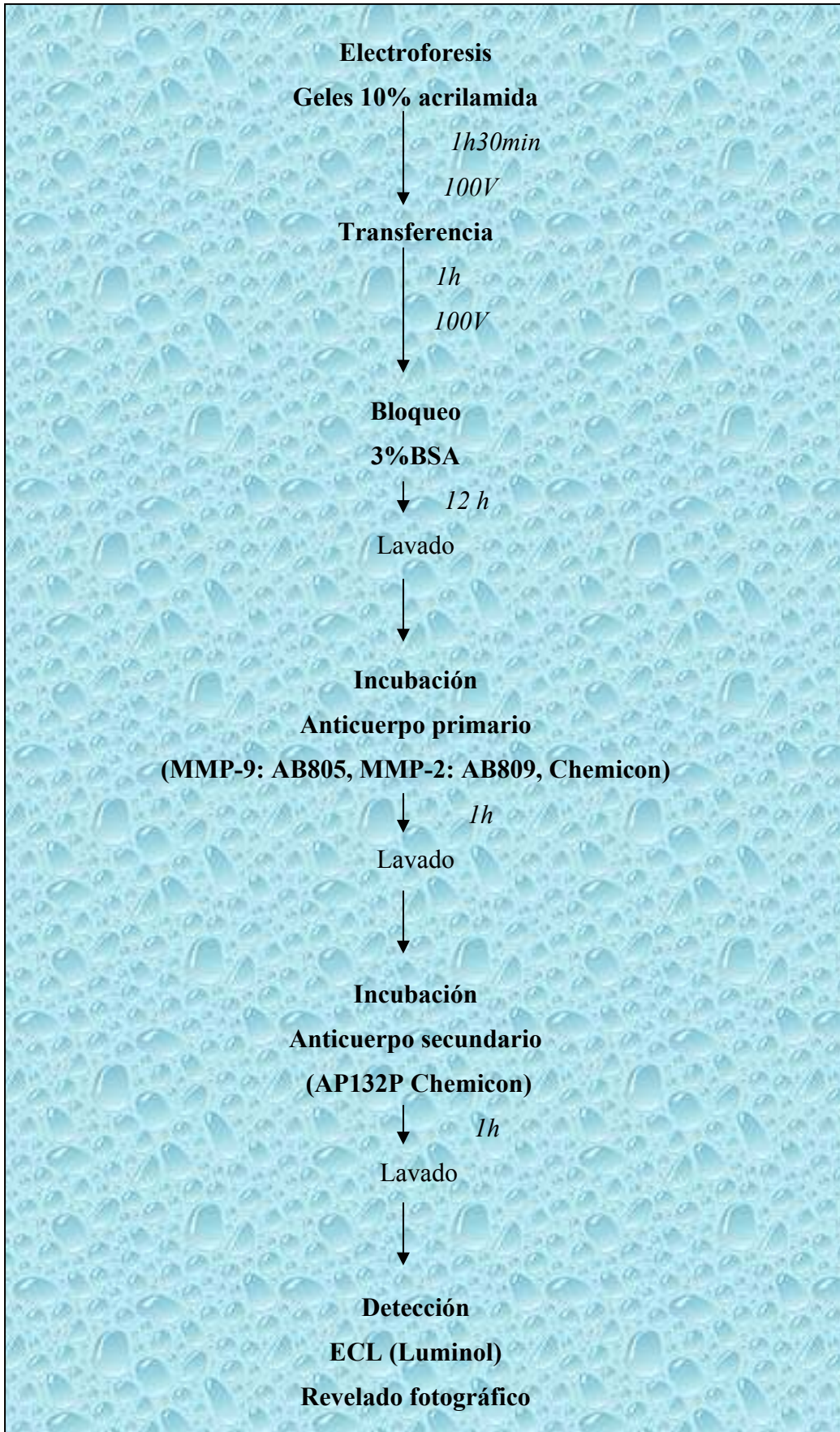
Para la identificación de estas proteínas con actividad gelatinolítica se aplica una adaptación de la técnica descrita por George (George SJ, 1997), ver figura 33. El paso inicial es un tratamiento especial de las muestras. Una alícuota de 200  $\mu\text{l}$  de la muestra se coloca en concentradores de 30K (Microcon YM-30, Amicon, Millipore). Las muestras se centrifugan durante 15 minutos a 5000 g y se procede a recuperar el sobrenadante. 20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se resuspenden en 70  $\mu\text{l}$  de solución no reductora con un 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se hierven las muestras y las soluciones estándar a 100° C durante 5 minutos y se procede a realizar la electroforesis.

Se realiza una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con un gel empaquetador al 4% A 100V durante 2 horas. En los geles se colocan 20  $\mu\text{l}$  de estándares de MMPs, MMP-2 humana purificada y MMP-9 humana purificada (Chemicon International, INC) a una concentración final de 300 ng/10  $\mu\text{l}$  y 20  $\mu\text{l}$  de las muestras del líquido de incubación de las arterias con mercaptoetanol y los estándares de peso molecular anteriormente especificados. Una vez finalizada la electroforesis se equilibran los geles en tampón de transferencia. Se realiza el “trans-blotting” a una membrana de nitrocelulosa (Trans Blot, Transfer Medium, Pure nitrocellulose membrane 0,45  $\mu\text{m}$ . Bio-Rad). La transferencia se lleva a cabo a 4° C con un voltaje de 100 V durante 1 hora en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20 v/v de metanol). Se

verifica que se ha realizado bien la transferencia con rojo Ponceau y se corta la banda correspondiente a los pesos moleculares.

Se procede al bloqueo de los filtros con PBS-TW-BSA al 3% durante toda la noche a 4° C. Se incuba la membrana con el anticuerpo primario que en nuestro caso es MMP-2 Polyclonal Antibody AB809 o MMP-9 Polyclonal Antibody AB805 (Chemicon International, INC), después de lavar la membrana se incuba con el anticuerpo secundario AP132P (goat Anti rabbit IgG H&L horseradish peroxidase conjugated affinity purified antibody, Chemicon International, INC).

El último paso es la detección de las bandas con ECL (RPN2109 Amersham Pharmacia Biotech), para ello se coloca la membrana sobre una placa fotográfica (Curix RP2, Medical X-Ray Film, AGFA). La placa se revela y sobre ella se procede a la identificación de las bandas positivas.



**Figura 33.-** Esquema de la técnica de Western Blot.



## ESTUDIO HISTOLÓGICO

Se procede a descongelar el fragmento de arteria y se realiza una observación directa de la muestra con lupa binocular y una descripción macroscópica. El fragmento de arteria se divide en dos fragmentos y se fijan en glutaraldehído al 0,2% y paraformaldehído al 2% en tampón fosfato (pH= 7,4).

Un fragmento se incluye en parafina (Procesador automático de inclusión de parafina Shandon-Elliot), y el otro fragmento se incluye en OCT (Agar).

Se realizan cortes seriados de 5  $\mu$  con: micrótopo para congelación (Criostato 2800 Frigocut E), y con micrótopo para parafina (Reichert-Jung). En ambos casos se recogen los cortes sobre portas de vidrio previamente gelatinizados.

**Cortes por congelación:** En los cortes por congelación se realizan las siguientes tinciones:

**Estudio de lípidos:** mediante la tinción de Herxheimer (McManus JFA, 1968). Las preparaciones se observan por microscopia óptica (Carl Zeiss, D-7082 Oberkochen) y se valora el contenido de lípidos por escala semicuantitativa (Juan O, 1999):

Lípidos:

- 1 = Sin lípidos
- 2 = Ligera infiltración lipídica (hasta un 30%)
- 3 = Infiltración lipídica moderada (entre un 30% y un 60%)
- 4 = Gran infiltración lipídica (superior al 60%)

**Tinción por Inmunofluorescencia del fibrinógeno-fibrina:** Para valorar la penetración de fibrinógeno en la pared vascular se utiliza la técnica descrita por Bini (Bini A, 1989). Se desparafinan las muestras según método habitual y se colocan en una cámara húmeda opaca. Se permeabilizan las muestras con solución de triton X-100 al 1% en PBS, se saturan con albúmina bovina al 2% en PBS y se incuban con el anticuerpo primario específico contra fibrinógeno y los fragmentos D, E, X e Y (A080, Dako) a una dilución 1:100 en una solución al 1% de albúmina bovina en PBS (0,1M) durante 2 horas. Posteriormente se incuban con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia (R156, Dako) a una dilución de 1:50 en una solución al 1% de albúmina bovina en PBS (0,1M) durante 1 hora. Se lavan las muestras con agua destilada y se montan con glicerol (Dako). Para valorar la posible unión inespecífica de los anticuerpos se realiza



un control de la misma muestra incubada con suero preinmune de conejo en vez de con el anticuerpo específico para fibrinógeno.

Para la cuantificación del área y la penetración de fibrinógeno en la pared vascular observamos las muestras por microscopia de epifluorescencia (Axiophot) utilizando un filtro B-546. Realizamos un registro fotográfico en diapositivas a 200 aumentos en las que se valora la penetración y el área de fibrinógeno en la pared vascular por analizador de imágenes utilizando una videocámara (Module CCD, Sony Model-77 CE; y software MCID) en un área de pared vascular de 40.000  $\mu\text{m}^2$ . Para evitar la posible unión inespecífica ponemos sobre la fuente de luz la diapositiva del control primario y calibramos a cero y luego se mide la penetración del fibrinógeno (profundidad máxima alcanzada desde la superficie al interior) de intima y adventicia; y el área ocupada por el fibrinógeno-fibrina que presenta la pared vascular expresándose los resultados en  $\mu\text{m}$  y  $\mu\text{m}^2$  respectivamente.

**Cortes por parafina:** En los cortes por parafina se realizan las siguientes tinciones:

**Estudio de la pared del vaso:** con la tinción de Hematoxilina-eosina. Método tradicional de Ehrlich (Smith A, 1977), utilizando la hematoxilina de Mayer. Se valora el estado global de la pared del vaso, la presencia de calcificaciones y el estado de las células musculares por escala semicuantitativa. Estudio de las fibras elásticas, mediante microscopia de epifluorescencia (Axiophot) *utilizando un filtro de 450-490 nm* por escala semicuantitativa (Juan O, 1999):

Estructura de la arteria

- 1 = Conservada
- 2 = Alterada
- 3 = No reconocible

Células musculares

- 1 = Normales
- 2 = Alteradas, pocos núcleos
- 3 = Ausencia de núcleos, pérdida de estructuras celulares

Fibras elásticas

- 1 = Normales
- 2 = Alteradas
- 3 = Ausentes

### Calcificaciones

- 1 = Sin calcificaciones
- 2 = Presencia de microcalcificaciones
- 3 = Presencia de macrocalcificaciones

*Puntuación final de la lesión arteriosclerótica suma de la puntuación de: lípidos, estructura de la arteria, células musculares, fibras elásticas y calcificaciones.*

## VALORACIONES EN SANGRE

### Elementos Formes

**Recuento automático:** Leucocitos totales, linfocitos y monocitos. Automatic Counter. System 9000 Menarini. Número total en sangre venosa por mm<sup>3</sup>.

**Recuento diferencial:** Formula leucocitaria a partir de la extensión de sangre sobre porta: Leucocitos totales, linfocitos y monocitos. Resultados expresados en %.

## VALORACIONES EN PLASMA

### Evaluación del fibrinógeno

**Fibrinógeno antigénico:** Valoración cuantitativa del fibrinógeno intacto por el método inmunológico de ELISA tipo sándwich (Koppert PW, 1988). Los pocillos están recubiertos con un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra el extremo carboxiterminal de la cadena A $\alpha$  intacta del fibrinógeno. Se añade la muestra o el calibrador al pocillo y el fibrinógeno intacto de la muestra se unirá a dicho anticuerpo de la fase sólida. En el siguiente paso se añade otro anticuerpo monoclonal murino, dirigido contra el extremo aminoterminal de la cadena A $\alpha$  (fibrinopeptido A) y marcado con HRP (peroxidasa de rábano), que se unirá solo al complejo fibrinógeno intacto/anticuerpo de la fase sólida ya formado. Tras añadir el sustrato (tetrametilbenzidipina) se produce color azul que vira a amarillo al parar la reacción con ácido sulfúrico. La intensidad del color es proporcional a la concentración de fibrinógeno intacto de la muestra. Elisa kit Fibrinostika Intact Fibrinogen. Organon Teknika. Resultados expresados en mg/dl.

**Fibrinógeno von Clauss:** Estudio funcional del fibrinógeno según la técnica de von Clauss (Clauss A, 1957) adaptada para el analizador automático JBLAB ST4 Stago. La técnica es una evaluación cronométrica del fibrinógeno en plasma. Cuando el plasma diluido se pone en contacto con un exceso de trombina, el logaritmo del tiempo de coagulación está en relación lineal con el logaritmo de la concentración en fibrinógeno del plasma estudiado. Coagulometro Diagnostica Stago JBLAB ST4; fibrinogen-Reagenz. Boehringer Mannheim. Resultados expresados en mg/dl.

### **Productos de degradación de la fibrina**

**Fibrinopeptido A (FPA):** Determinación cuantitativa en plasma del FPA por el método inmunológico ELISA (Amiral J, 1984). Esta técnica precisa de un tratamiento especial del plasma. Una vez obtenido con el anticoagulante especial, ya descrito, el plasma debe ser tratado con bentonita (80 mg/ml) en una proporción 1:0,5, agitado y centrifugado 10 minutos a 3000 rev/min, se separa 1 ml del sobrenadante que se mezcla con bentonita 1:0,5 y se repite el paso de centrifugación. Se recupera 1 ml del sobrenadante con el que se procede a realizar la determinación. Este paso previo es necesario para eliminar el fibrinógeno. La técnica se basa en un enzimoimmunoensayo competitivo en dos fases. Una cantidad constante de anticuerpo anti-fibrinopeptido A en exceso es incubada con la muestra o estándar, formándose complejos antígeno-anticuerpo. Queda un exceso de anticuerpo cuya concentración es inversamente proporcional al contenido de FPA en la muestra. Para su determinación se introducen en los pocillos recubiertos con FPA formándose complejos antígeno-anticuerpo fijados a la pared que a continuación forman complejos sándwich con anticuerpos anti-IgG marcados con OPD (peroxidasa) La cantidad de los complejos sándwich formados es una medida de la concentración de FPA en la muestra. ELISA Kit FPA Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica. Resultados expresados en ng/ml.

**Dímero D (DD):** Determinación cuantitativa en plasma del DD producido al degradarse la fibrina en plasma por el método inmunológico ELISA basado en un ensayo sándwich (Morgenthaler JJ, 1987). En la primera inmunorreacción, el anticuerpo específico contra el dímero D, unido a los pocillos, fija los productos de degradación de la fibrina contenidos en la muestra pero no reacciona con el fibrinógeno y sus productos de degradación. En la siguiente inmunorreacción con anticuerpos anti-PDF-D marcados

con OPD se forman complejos sándwich. La cantidad de estos complejos es la medida del contenido del DD en la muestra. El exceso de OPD no ligado se elimina por lavado y después de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el cromógeno (o.fenilendiamina) la actividad de OPD ligada es determinada fotométricamente. Kit Asserachrom Dimero D Boehringer Mannheim Diagnostica Stago. Resultados expresados en ng/ml.

### **Activadores e inhibidores de la fibrinólisis**

**t-PA:** Determinación cuantitativa ELISA del activador tisular del plasminógeno t-PA antigénico en plasma (Holvoet P, 1985). En la primera inmunorreacción, el anticuerpo específico contra el t-PA, unido a los pocillos, fija el t-PA contenido en la muestra. En la siguiente inmunorreacción con anticuerpos anti-t-PA marcados con OPD se forman complejos sándwich. La cantidad de estos complejos es la medida del contenido de t-PA en la muestra. El exceso de OPD no ligado se elimina por lavado y después de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el cromógeno (o.fenilendiamina) la actividad de OPD ligada es determinada fotométricamente. Kit Asserachrom t-PA Boehringer Mannheim Diagnostica Stago. Resultados expresados en ng/ml.

**u-PA:** Determinación cuantitativa por ELISA de la uroquinasa (u-PA) y pro-uroquinasa (sc-uPA) antigénicas en plasma (Ranby M, 1986). Para realizar esta técnica se añade igual cantidad de plasma a los pocillos N y A. Los pocillos N contienen anticuerpos monoclonales contra u-PA inmovilizados en su superficie y anticuerpos solubles dirigidos a estructuras no relacionadas. Durante la incubación, la u-PA contenida en el plasma se une cuantitativamente a los anticuerpos de la superficie de los pocillos. Al añadir anticuerpos HRP-anti-uPA (conjugado) se forman complejos sándwich. Se elimina el exceso de conjugado no unido y se añade el sustrato (HRP), la cantidad de color desarrollada es proporcional a la cantidad de u-PA unida al conjugado (respuesta específica) y a la cantidad de conjugado unido a HRP por otros mecanismos (respuesta inespecífica). Para determinar la respuesta inespecífica se utilizan los pocillos A que contienen anticuerpos monoclonales contra u-PA inmovilizados en su superficie y anticuerpos solubles dirigidos a u-PA. De esta forma se evita la unión específica de u-PA con los anticuerpos fijados sin interferir en ningún otro mecanismo. La valoración de la concentración de u-PA se realiza sustrayendo del valor de los pocillos N (unión total)

el de los pocillos A (unión inespecífica). A este método se le denomina ISAC. Kit TintElize uPA Biopool International. Resultados expresados en ng/ml.

**PAI-1:** Determinación cuantitativa por ELISA del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) antigénico en plasma (Declerck PJ, 1988). En la primera inmunorreacción, el anticuerpo específico contra el PAI-1, fijado en los pocillos, fija el PAI-1 contenido en la muestra. En la siguiente inmunorreacción se utilizan anticuerpos anti-PAI-1 conjugados con enzimas peroxidadas (OPD), formándose así los complejos sándwich. La cantidad de estos complejos es la medida del contenido de PAI-1 en la muestra. El exceso de OPD no ligado se elimina por lavado y después de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el cromógeno (o.fenilendiamina) la actividad de OPD ligada es determinada fotométricamente. La cantidad de color final será directamente proporcional a la cantidad de PAI-1 presente en el plasma. Kit Asserachrom PAI-1 Boehringer Mannheim Diagnostica Stago. Resultados expresados en ng/ml.

## **METODOS ESTADÍSTICOS**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM (error estándar de la media), a no ser que se especifique lo contrario. La significación estadística se establece al nivel de  $p < 0,05$ .

Se ha realizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los resultados siguen una distribución normal y poder aplicar las pruebas estadísticas paramétricas cumpliéndose esta condición en todos los parámetros bioquímicos estudiados.

Para el estudio de los factores de riesgo se utilizó la prueba de Chi cuadrado y el coeficiente de Phi-Cramers.

Para el estudio comparativo de los valores de medias se ha aplicado: la prueba de t de Student para datos no apareados para la comparación de dos grupos, y para el análisis de tres grupos se utilizó el test one way anova y el análisis de la varianza para grupos desiguales de Student-Newman-Keuls.

Para el estudio de la correlación entre variables se ha calculado el coeficiente de correlación (r) y la significatividad de dicha correlación (p).

Los cálculos estadísticos y las gráficas se han realizado con los programas informáticos SPSS para Windows Versión 6.0 y MicroCal Origin Versión 3.0.

## ARTERIALES

### Estudio histológico

#### Clasificación de las muestras

Se ha valorado el grado de lesión que presentan las arterias recibidas en la unidad por las técnicas histológicas descritas en el apartado de material y métodos.

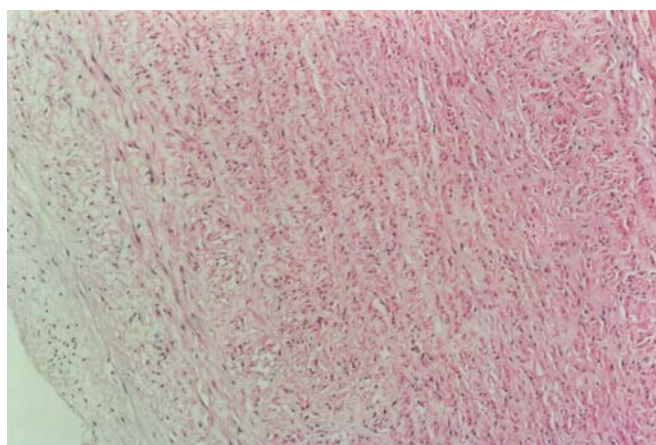
Según la puntuación obtenida sumado los valores de la escala semicuantitativa de los parámetros: estado de la estructura de la arteria, presencia de calcificaciones, estado de las células musculares, fibras elásticas y lípidos (figuras 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42), hemos clasificado las muestras en:

Entre 5 y 8 = Lesión leve (1)

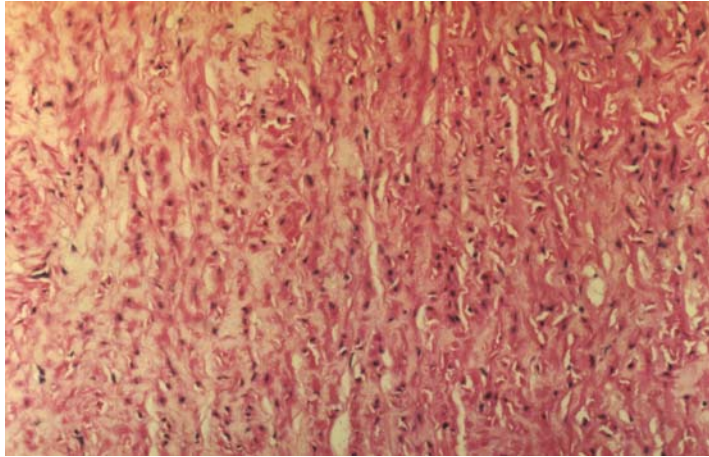
Entre 9 y 12 = Lesión moderada (2)

Entre 13 y 16 = Lesión avanzada (3)

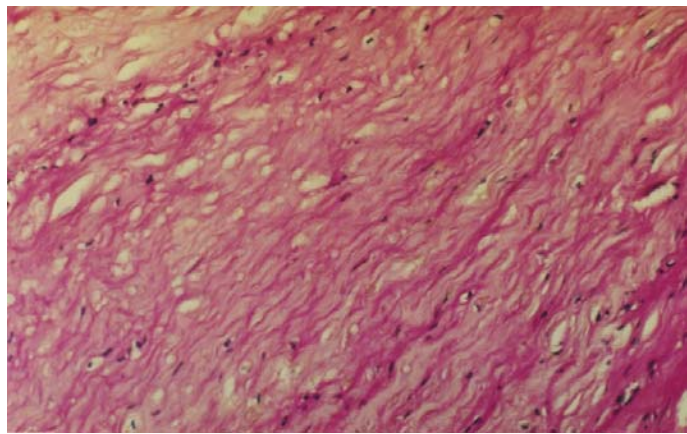
De las 126 muestras arteriales estudiadas 22 presentaban lesiones del tipo 1 (Lesión leve), 59 del tipo 2 (Lesión moderada) y 45 lesiones de tipo 3 (Lesión avanzada).



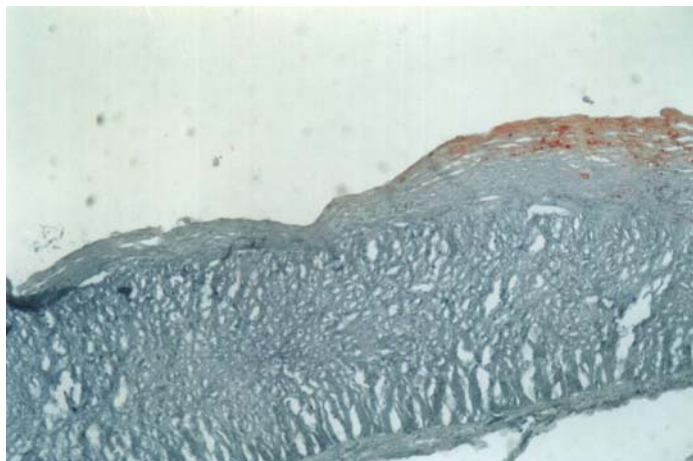
**Figura 34.-** Arteria aorta con ligero engrosamiento subintimal. Tinción Hematoxilina-Eosina. *Izquierda: íntima, Derecha: adventicia* (x100).



**Figura 35.-** Arteria aorta con células musculares normales. Tinción Hematoxilina-Eosina. (x200).

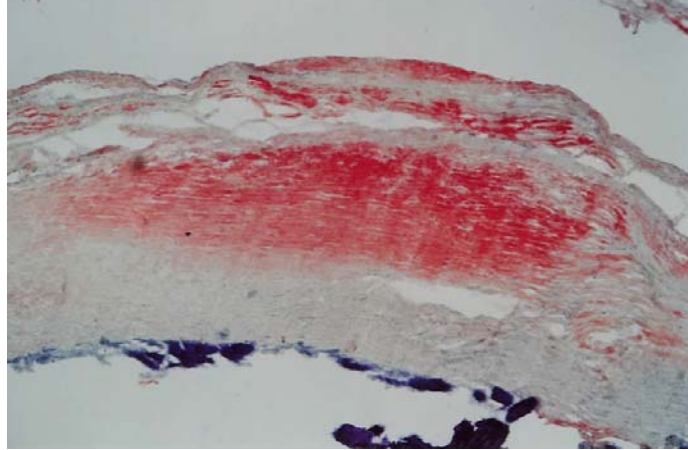


**Figura 36.-** Arteria carótida con células musculares alteradas, con pocos núcleos. Tinción hematoxilina-eosina . (x200).

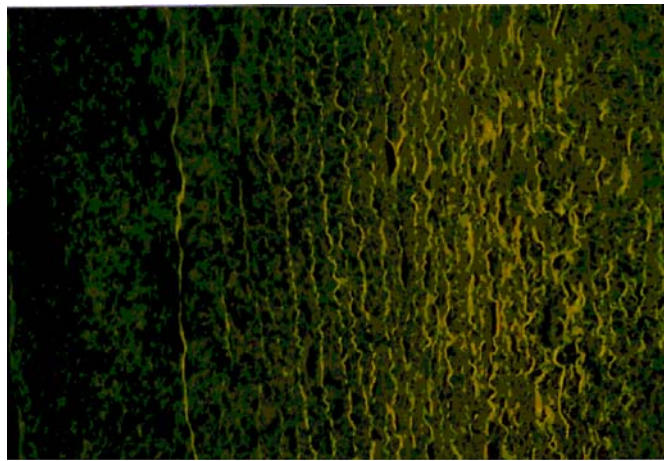


**Figura 37.-** Arteria femoral con ligera infiltración lipídica. Tinción Herxheimer. Parte superior: Íntima; Parte inferior: adventicia. (x40).

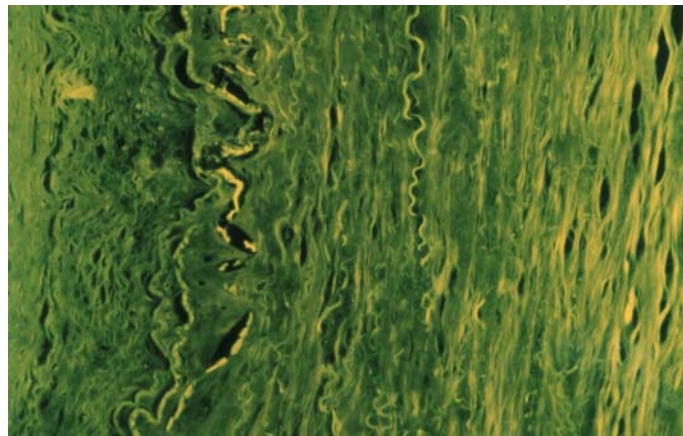




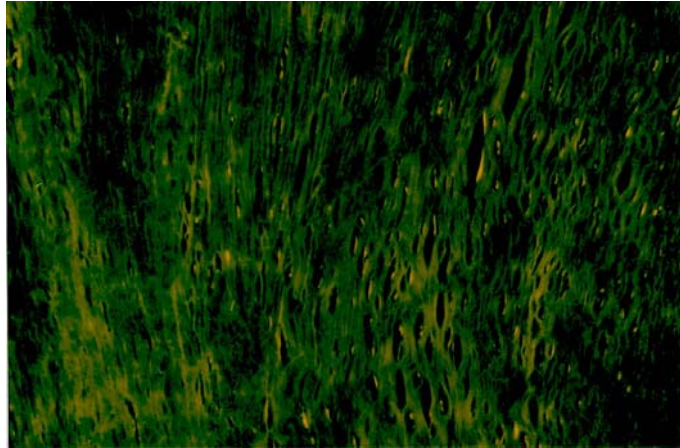
**Figura 38.-** Arteria carótida con gran infiltración lipídica. Tinción Herxheimer. *Parte superior: Íntima; Parte inferior: adventicia* (x40).



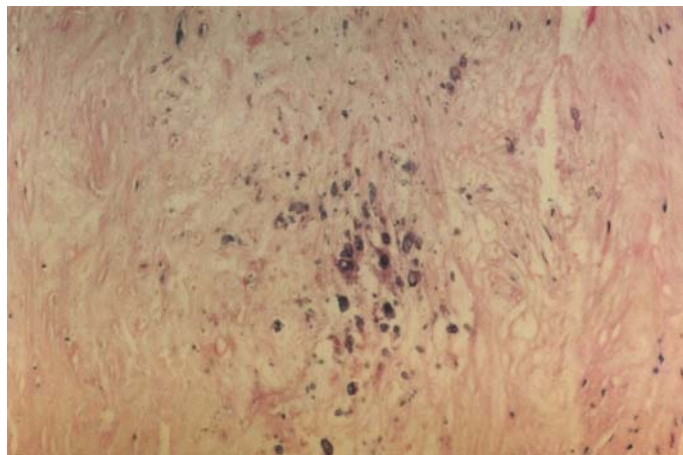
**Figura 39.-** Arteria aorta con fibras elásticas normales. Fluorescencia. *Izquierda: Íntima; Derecha: adventicia*. (x100).



**Figura 40.-** Arteria femoral con fibras elásticas alteradas. Tinción Hematoxilina-Eosina observada por microscopía de fluorescencia. *Izquierda: Íntima; Derecha: adventicia*. (x200).



**Figura 41.-** Arteria femoral con fibras elásticas prácticamente ausentes. Fluorescencia. (x200).



**Figura 42. –** Arteria femoral con microcalcificaciones.  
Tinción Hematoxilina-Eosina. (x200).

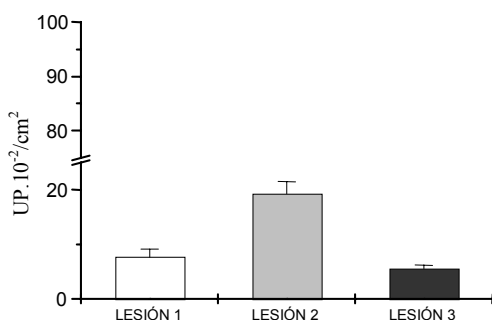
**Estudio bioquímico**

**Parámetros fibrinolíticos**

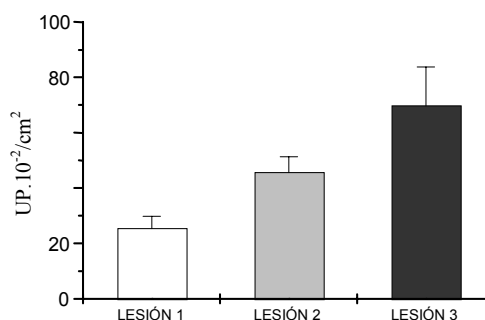
***Actividad Fibrinolítica de la Pared Arterial:***

La actividad fibrinolítica de la superficie del endotelio (figura 43) presenta un incremento significativo en la lesión 2 con respecto a la 1 y a la 3 (tabla 5). En la adventicia esta actividad fibrinolítica (figura 44) esta incrementada con el grado de lesión siendo este incremento significativo estadísticamente entre las lesiones 1-3, y 2-3 (tabla 5).

La actividad fibrinolítica de la superficie del endotelio y de la superficie de la adventicia se muestran en la figura 45.



**Figura 43.-** Actividad fibrinolítica de la superficie del endotelio.



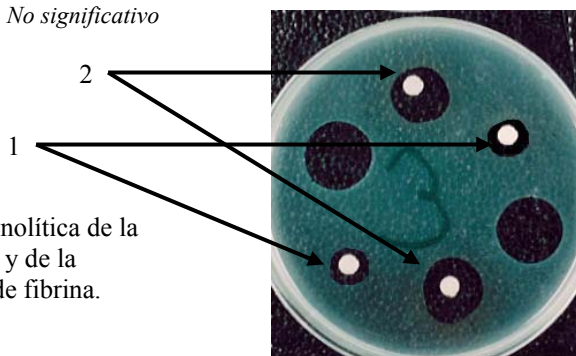
**Figura 44.-** Actividad fibrinolítica de la superficie de la adventicia.

**Tabla 5.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 43 y 44.

	Actividad fibrinolítica Endotelio	Actividad fibrinolítica Adventicia
Lesión 1-Lesión 2	*	NS
Lesión 1-Lesión 3	NS	*
Lesión 2-Lesión 3	*	*

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

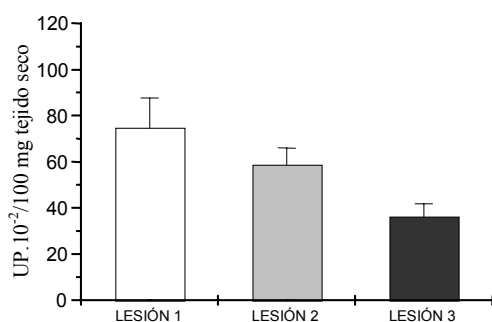
**Figura 45.-** Actividad fibrinolítica de la superficie del endotelio (1) y de la adventicia (2) sobre placa de fibrina.



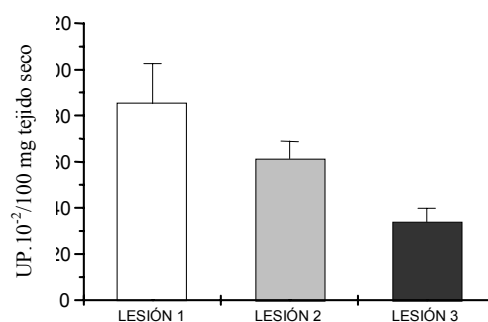
**Capacidad Generadora de Plasmina por la Pared Arterial:**

La actividad fibrinolítica de los incubados de arterias a los 10 minutos disminuye paulatinamente con el grado de lesión siendo esta disminución significativa estadísticamente entre las lesiones 1-3, y las lesiones 2-3 (figura 46, tabla 6).

La actividad fibrinolítica de los incubados a los 120 minutos también experimenta una disminución significativa con el grado de lesión. Siendo esta disminución significativa entre las lesiones 1-3, y las lesiones 2-3 (figura 47, tabla 6).



**Figura 46.-** Capacidad Generadora de Plasmina a los 10 minutos de la incubación.



**Figura 47.-** Capacidad Generadora de Plasmina a los 120 minutos de la incubación.

**Tabla 6.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 46 y 47.

	Capacidad Generadora de Plasmina 10 minutos	Capacidad Generadora de Plasmina 120 minutos
Lesión 1-Lesión 2	NS	NS
Lesión 1-Lesión 3	*	*
Lesión 2-Lesión 3	*	*

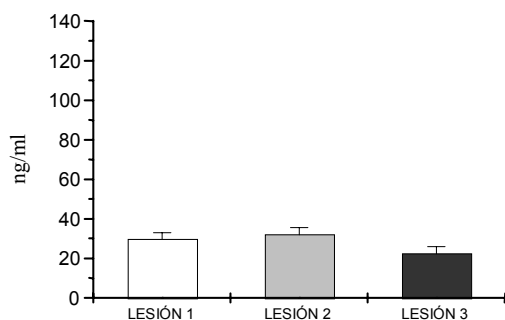
\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

***Activadores e inhibidores de la fibrinólisis:***

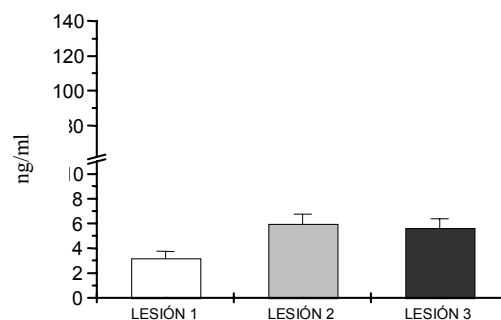
El t-PA antigénico tisular contenido en el líquido de incubación no experimenta modificaciones significativas con el grado de lesión arterial, aunque esta ligeramente disminuido en la lesión 3 (figura 48, tabla 7).

La u-PA tisular tampoco muestra diferencias significativas con el grado de lesión arterial (figura 49, tabla 7).

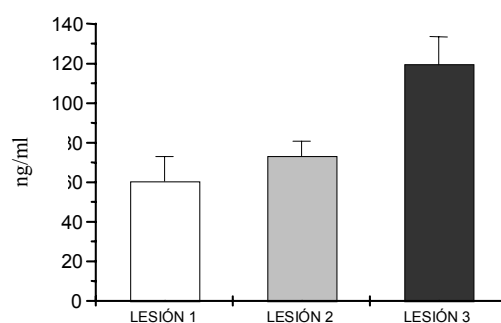
El PAI-1 antigénico tisular experimenta un incremento con el grado de lesión arterial de un 20 % entre la lesión 1 y 2, de un 63 % entre la 2 y 3, y de un 98% entre la 1 y 3. Siendo este incremento significativo entre las lesiones 1-3, y las lesiones 2-3 (figura 50, tabla 7).



**Figura 48.-** t-PA antigénico tisular.



**Figura 49.-** u-PA tisular.



**Figura 50.-** PAI-1 antigénico tisular.

**Tabla 7.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 48, 49 y 50.

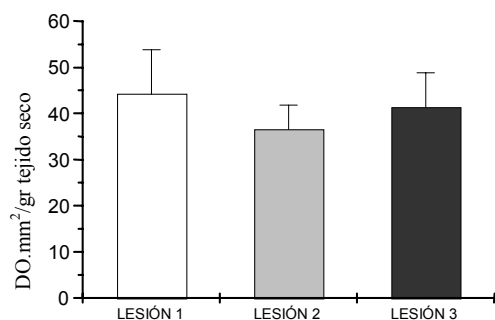
	t-PA	u-PA	PAI
Lesión 1-Lesión 2	NS	NS	NS
Lesión 1-Lesión 3	NS	NS	*
Lesión 2-Lesión 3	NS	NS	*

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

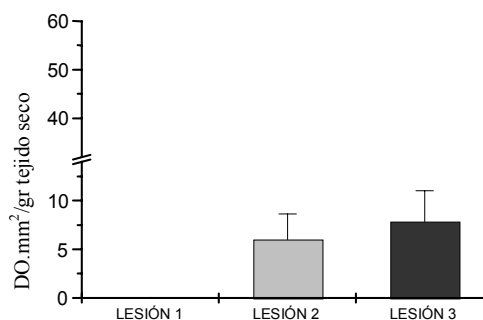
### Valoración de la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas

La metaloproteasa 9 inactiva no experimenta una modificación significativa al aumentar el grado de lesión arterial (figura 51, tabla 8).

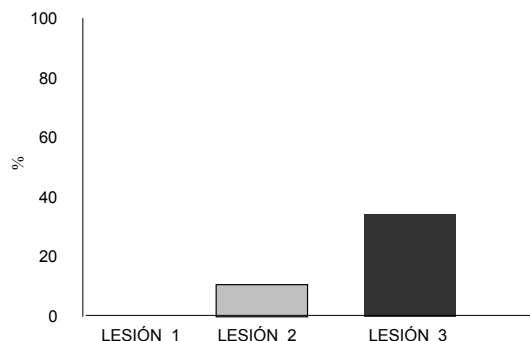
La metaloproteasa 9 activa tampoco experimenta diferencias significativas entre los grupos de lesión 2 y 3 (figura 52, tabla 8). Sin embargo es importante remarcar que esta metaloproteasa no aparece en ninguno de las arterias estudiadas del grupo de lesión 1, aparece en 11% de las arterias pertenecientes al grupo de lesión 2 y en un 35 % de las arterias con un grado de lesión 3 (figura 53).



**Figura 51.-** MMP-9 inactiva.



**Figura 52.-** MMP-9 activa.



**Figura 53.-** % de pacientes con la MMP-9 activa.

La MMP 2 inactiva sufre una disminución con el grado de lesión de un 42% entre la lesión 1 y 2, de un 27% entre la lesión 2 y 3, y de un 58% entre la 1 y 3 (figura 54). Esta disminución es significativa entre las lesiones 1-2 y 1-3 (tabla 8).

La MMP 2 activa no varía significativamente entre los grupos de lesión (figura 55, tabla 8). Pero al estudiar el porcentaje de la presencia de forma activa vemos que esta presente en un 36% de las arterias del grupo de lesión 1, en un 50% de las arterias del grupo de lesión 2 y en un 54% de las del grupo de lesión 3 (figura 56).

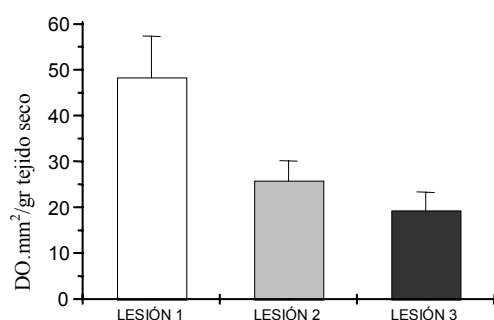


Figura 54.- MMP-2 inactiva.

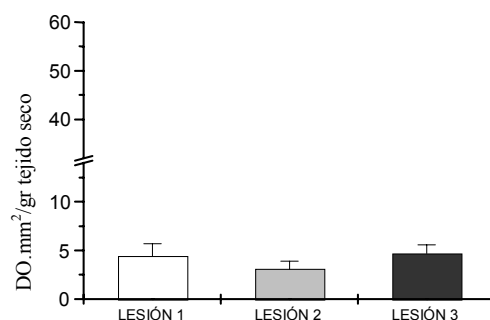


Figura 55.- MMP-2 activa.

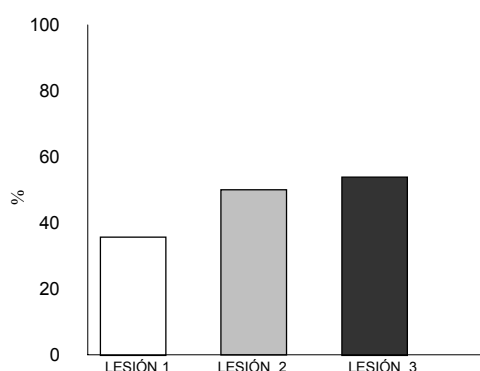


Figura 56.- % de pacientes con la MMP-2 activa.

Tabla 8.- Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 51, 54 y 55; y de la prueba t-Student para la figura 52.

	MMP- 9 inactiva	MMP-9 activa	MMP- 2 inactiva	MMP-2 activa
Lesión 1-Lesión 2	NS	NS	*	NS
Lesión 1-Lesión 3	NS	NS	*	NS
Lesión 2-Lesión 3	NS	NS	NS	NS

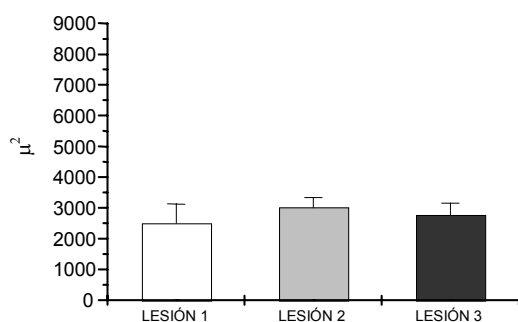
\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo



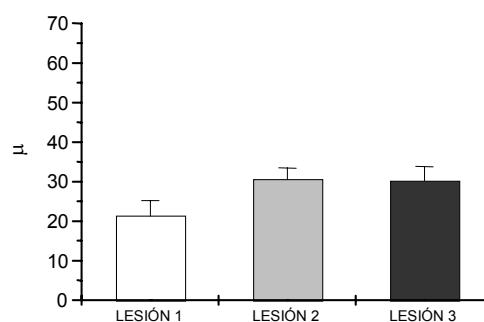
### Fibrinógeno en pared

El área de fibrinógeno que ocupa la capa íntima de la pared arterial no experimenta modificaciones significativas con el grado de lesión (figura 57, tabla 9).

La penetración de fibrinógeno en el endotelio no muestra diferencias estadísticamente significativas con el grado de lesión aunque hay un incremento del 30% de esta penetración entre las arterias de los grupos de lesión 2 y 3 con respecto al 1 (figura 58, tabla 9).

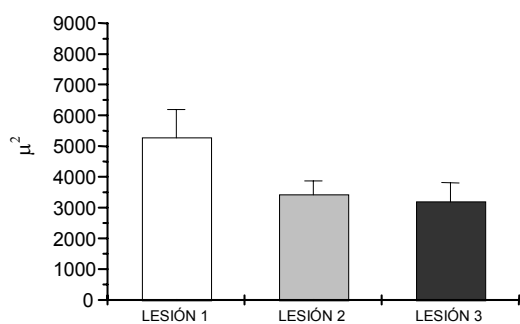


**Figura 57.-** Área de fibrinógeno en íntima.

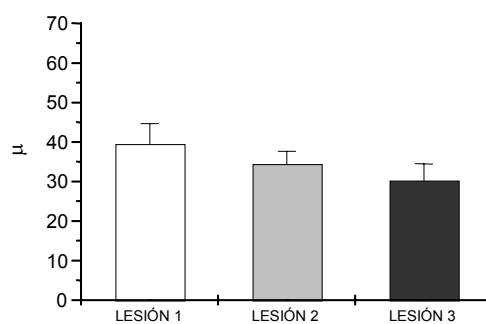


**Figura 58.-** Profundidad de fibrinógeno en íntima.

El área de fibrinógeno que ocupa la capa adventicia muestra una disminución con el grado de lesión de un 39% entre las lesiones 1 y 2, de un 7% entre las 2 y 3 y de un 43% entre la 1 y 3. Esta disminución es significativa entre las lesiones 1 y 2 (figura 59, tabla 9). La profundidad del fibrinógeno en la capa adventicia muestra una tendencia a disminuir al aumentar el grado de lesión arterial. El porcentaje de disminución es de un 18% entre las lesiones 1 y 2, de un 28% entre las lesiones 1 y 3, y de un 12% entre las lesiones 2 y 3. Estas disminuciones sin embargo no alcanzan un grado de significatividad estadística (figura 60, tabla 9). Todas las arterias estudiadas presentan penetración de fibrinógeno tanto en la íntima como en la adventicia (figura 61).



**Figura 59.-** Área de fibrinógeno en adventicia.



**Figura 60.-** Profundidad de fibrinógeno en adventicia.

**Tabla 9.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 57, 58, 59 y 60.

	Área de fibrinógeno en íntima	Profundidad de fibrinógeno en íntima	Área de fibrinógeno en adventicia	Profundidad de fibrinógeno en adventicia
Lesión 1-Lesión 2	NS	NS	*	NS
Lesión 1-Lesión 3	NS	NS	NS	NS
Lesión 2-Lesión 3	NS	NS	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo



**Figura 61.-** Arteria aorta. Tinción inmunohistoquímica de fibrinógeno-fibrina (x100). Izquierda: íntima, derecha adventicia.

### Correlaciones entre parámetros de la pared arterial (r)

#### *Actividad fibrinolítica de las superficies arteriales:*

La actividad fibrinolítica del endotelio muestra una alta correlación positiva con el t-PA en los grados de lesión 2 y 3, con la u-PA en la lesión leve que disminuye en las lesiones 2y3, y una correlación debil y negativa con el PAI en todos los grados de lesión (tabla 10). No hay correlación con el resto de parámetros estudiados.

**Tabla 10.-** Correlaciones de la actividad fibrinolítica de la superficie del endotelio con diversos parámetros tisulares.

<b>Fibrinólisis en Endotelio</b>			
<b>r</b>	<b>LESIÓN1</b>	<b>LESIÓN2</b>	<b>LESIÓN3</b>
t-PA	NC	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
u-PA	<b>0,8</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>
PAI	<b>-0,3</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,3</b>
MMP-9 Inactiva	NC	NC	NC
MMP-9 Activa	NC	NC	NC
MMP-2 Inactiva	NC	NC	NC
MMP-2 Activa	NC	NC	NC
Fibrinógeno Área endotelio	NC	NC	NC
Profundidad endotelio	NC	NC	NC

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.*

La actividad fibrinolítica de la adventicia no muestra correlación con ninguno de los parámetros estudiados.

#### *Capacidad generadora de plasmina de la pared arterial:*

El estudio de la correlación de la capacidad generadora de plasmina de la pared arterial y el resto de parámetros tisulares se muestra en la tabla 11. Se aprecia una correlación significativa y positiva con el t-PA y la u-PA en todos los grado de lesión y una correlación significativa y negativa con el PAI también en todos los grados de lesión.

El estudio de las correlaciones entre la capacidad generadora de plasmina y el sistema de las MMPs no es significativo en ninguno de los grados de lesión. El área y profundidad de fibrinógeno en el endotelio tampoco se correlaciona con la capacidad generadora de plasmina en ninguna de las lesiones. En adventicia el área y la

profundidad del fibrinógeno muestran una correlación positiva con la capacidad generadora de plasmina en las lesiones 2 y 3.

**Tabla 11.-** Correlaciones de la capacidad generadora de plasmina de la pared arterial con diferentes parámetros tisulares.

<b>r</b>	<b>Capacidad Generadora de Plasmina</b>		
	LESIÓN 1	LESION 2	LESION 3
t-PA	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>
u-PA	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
PAI-1	<b>-0,6</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,3</b>
MMP-9 inactiva	NC	NC	NC
MMP-9 activa	-	NC	NC
MMP-2 inactiva	NC	NC	NC
MMP-2 activa	NC	NC	NC
Fibrinógeno			
Área endotelio	NC	NC	NC
Profundidad endotelio	NC	NC	NC
Área adventicia	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>	NC
Profundidad adventicia	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>	NC

Solo se muestra **r** cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

**Activadores e inhibidores de la fibrinolisis:**

El t-PA no presenta correlaciones significativas (tabla 12).

**Tabla 12.-** Correlaciones del t-PA antigénico de la pared arterial con diversos parámetros tisulares.

<b>r</b>	<b>t-PA</b>		
	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
MMP-9 inactiva	NC	NC	NC
MMP-9 activa	-	NC	NC
MMP-2 inactiva	NC	NC	NC
MMP-2 activa	NC	NC	NC

Solo se muestra **r** cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

La u-PA muestra una correlación significativa y positiva con la MMP-9 inactiva y la 2 inactiva en las lesiones 1 y 2 (tabla 13). No muestra ninguna correlación con las MMPs

2 y 9 activas, tampoco muestra correlación con el área o la profundidad de fibrinógeno en endotelio y adventicia.

**Tabla 13.-** Correlaciones de la u-PA de la pared arterial con diversos parámetros tisulares.

<b>r</b>	<b>u-PA</b>		
	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
MMP-9 inactiva	<b>0,7</b>	<b>0,4</b>	NC
MMP-9 activa	-	NC	NC
MMP-2 inactiva	<b>0,7</b>	<b>0,4</b>	NC
MMP-2 activa	NC	NC	NC

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.*

El PAI presenta una correlación significativa y negativa con la MMP-9 inactiva en todos los grados de lesión, con la MMP-9 activa en las lesiones 2 y 3, y con la MMP-2 inactiva en las lesiones 1 y 2 (tabla 14). No muestra ninguna correlación con la MMP 2 activa, tampoco muestra correlación con el área o la profundidad de fibrinógeno en endotelio y adventicia.

**Tabla 14.-** Correlaciones del PAI-1 antigénico de la pared arterial con diversos parámetros tisulares.

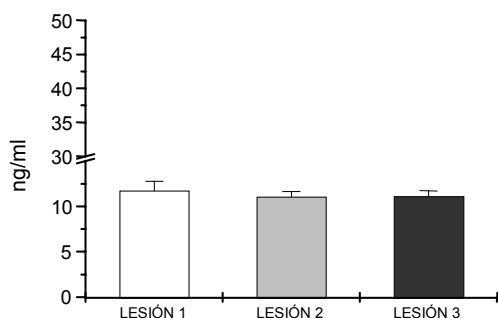
<b>r</b>	<b>PAI</b>		
	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
MMP-9 inactiva	<b>-0,6</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,5</b>
MMP-9 activa	-	<b>-0,9</b>	<b>-0,8</b>
MMP-2 inactiva	<b>-0,7</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,3</b>
MMP-2 activa	NC	NC	NC

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.*

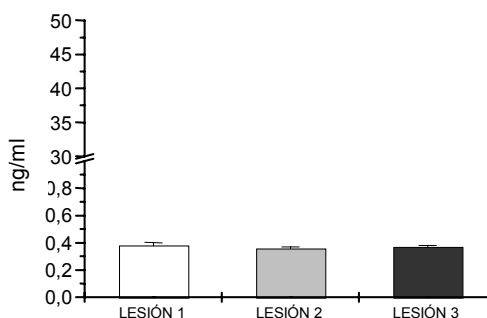
**Estudio plasmático**

**Parámetros fibrinolíticos**

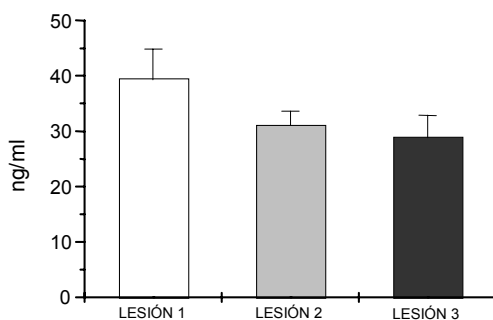
Los niveles plasmáticos de t-PA antigénico (figura 62), de u-PA antigénica (figura 63) y de PAI-1 antigénico (figura 64), no se modifican significativamente con el grado de lesión arterial (tabla 15).



**Figura 62.- t-PA antigénico plasmático.**



**Figura 63.- u-PA antigénica plasmática.**



**Figura 64.- PAI-1 antigénico plasmático.**

**Tabla 15.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 62, 63 y 64.

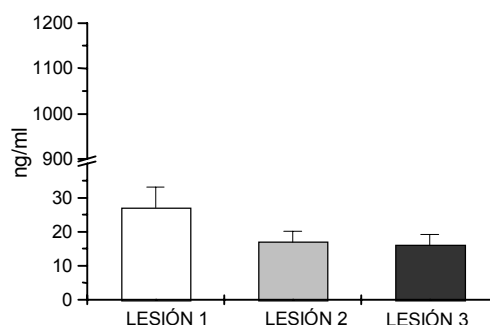
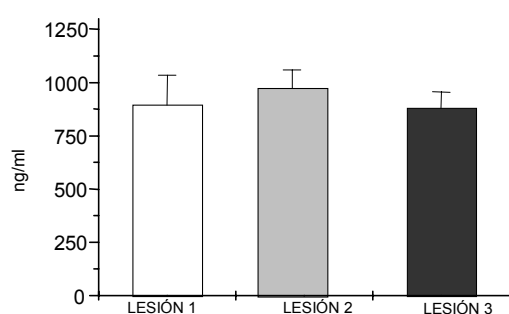
	t-PA	u-PA	PAI
Lesión 1-Lesión 2	NS	NS	NS
Lesión 1-Lesión 3	NS	NS	NS
Lesión 2-Lesión 3	NS	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

### DD, FPA y fibrinógeno

Los niveles plasmáticos del dímero-D no experimentan modificaciones significativas con el grado de lesión arterial (figura 65, tabla 16).

El FPA plasmático disminuye en las lesiones 2 y 3 con respecto a la 1, esta disminución es significativa en ambos casos. Si embargo los niveles de FPA están por encima de los valores normales (<5 ng/ml) en los tres grados de lesión (figura 66, tabla 16).



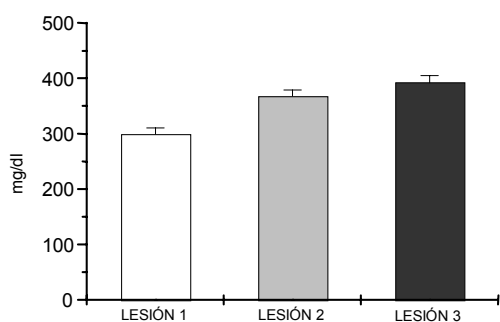
**Figura 65.-** Niveles plasmáticos de dímero-D **Figura 66.-** Niveles plasmáticos de FPA.

Los valores plasmáticos del fibrinógeno medidos por el método de von-Clauss experimentan un incremento significativo con el grado de lesión. Siendo este incremento de un 23% en la lesión 2 y de un 32% en la lesión 3 con respecto a la 1 en ambos casos. El porcentaje de pacientes dentro del grupo de lesión 1 con hiperfibrinogenemia (valores superiores a 300 mg/dl) es de un 45%, en el grupo de lesión 2 de un 78 % y en el grupo de lesión 3 de un 89 % (figura 67, tabla 16).

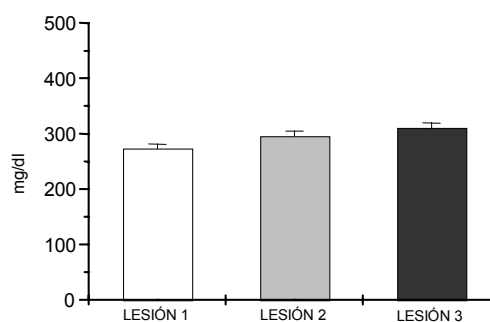
Los niveles de fibrinógeno antigénico están también ligeramente incrementados con el grado de lesión aunque en ningún caso este incremento llega a ser significativo. El porcentaje de pacientes con hiperfibrinogenemia en la lesión 1 es un 35%, en la lesión 2 de un 36 % y en la lesión 3 de un 61 % (figura 68, tabla 16).

El índice vc/Ag se incrementa con el grado de lesión y el incremento es significativo entre las lesiones 1 y 2 (incremento del 15%) y entre las lesiones 1 y 3 (incremento del 16%) (figura 69, tabla 16).

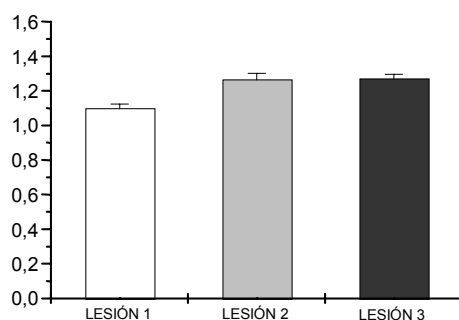




**Figura 67.-** Fibrinógeno plasmático von-Clauss.



**Figura 68.-** Fibrinógeno plasmático Antigénico.



**Figura 69.-** Índice fibrinógeno von-Clauss/ antigénico.

**Tabla 16.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 65, 66, 67, 68 y 69.

	DD	FPA	VC	AG	INDICE
Lesión 1-Lesión 2	NS	*	*	NS	*
Lesión 1-Lesión 3	NS	*	*	NS	*
Lesión 2-Lesión 3	NS	NS	NS	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

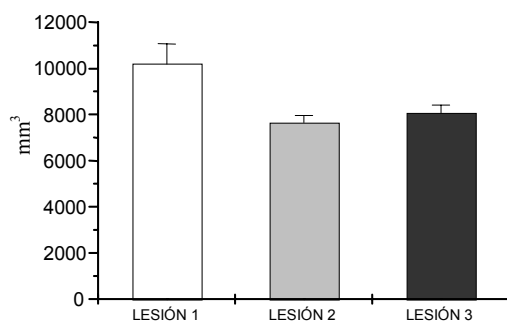
### Células blancas

Los leucocitos circulantes disminuyen significativamente con el grado de lesión siendo esta disminución significativa entre las lesiones 1 y 2, y las lesiones 1 y 3 (figura 70, tabla 17).

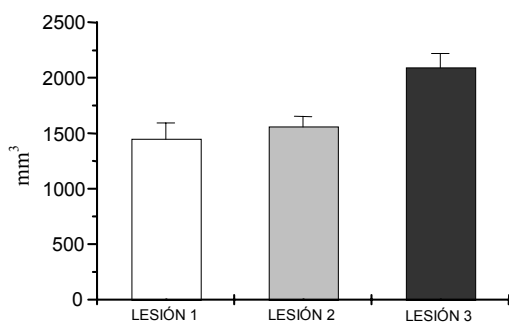
Los linfocitos experimentan un incremento significativo con el grado de lesión tanto entre las lesiones 1 y 2 como entre las lesiones 1 y 3 (figura 71, tabla 17).

Los monocitos sufren una ligera disminución con el grado de lesión aunque no se alcanza la significatividad estadística (figura 72, tabla 17).

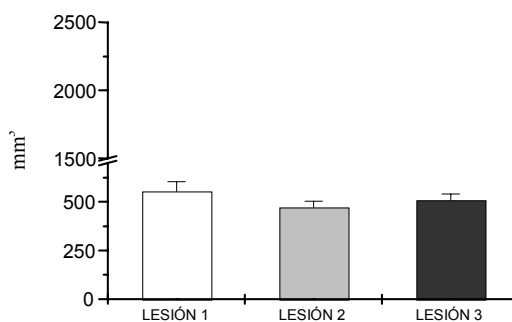
El porcentaje de linfocitos y de monocitos está ligeramente incrementado aunque de forma no significativa (figuras 73 y 74, tabla 17).



**Figura 70.-** Leucocitos circulantes.



**Figura 71.-** Linfocitos circulantes.



**Figura 72.-** Monocitos circulantes.

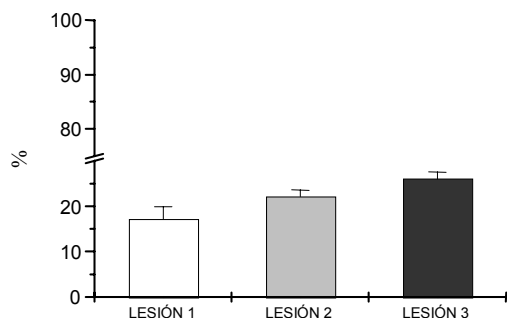


Figura 73.- %Linfocitos circulantes.

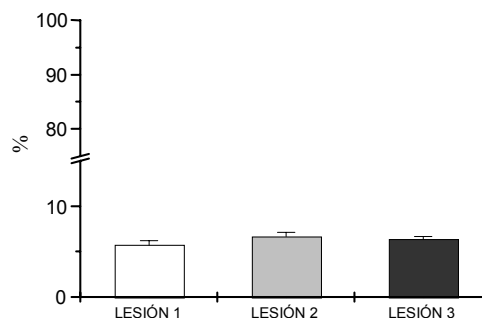


Figura 74.- %Monocitos circulantes.

Tabla 17.- Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 70, 71, 72, 73 y 74.

	Leucocitos	Linfocitos	Monocitos	%Linfocitos	%Monocitos
Lesión 1-Lesión 2	*	NS	NS	NS	NS
Lesión 1-Lesión 3	*	*	NS	*	NS
Lesión 2-Lesión 3	NS	*	NS	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

### Correlaciones entre Parámetros Plasmáticos

#### Activadores e inhibidores de la fibrinolisis:

Al estudiar la correlación entre las concentraciones plasmáticas de t-PA antigénico y el resto de parámetros plasmáticos, encontramos una correlación significativa y positiva entre este parámetro y la u-PA en todos los grados de lesión. También encontramos una correlación significativa y positiva del t-PA con los monocitos en las lesiones 2 y 3, y del t-PA con el dímero D en la lesión 1 (tabla 18).

Tabla 18.- Estudio de las correlaciones del t-PA antigénico plasmático.

r	t-PA		
	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
u-PA	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
Monocitos	NC	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
Dímero D	<b>0,5</b>	NS	NS

Solo se muestra **r** cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

El estudio de la correlación entre el activador u-PA y los parámetros plasmáticos muestra una correlación significativa y positiva de este parámetro con el nº y % de linfocitos en la lesión 3 (tabla 19).

**Tabla 19.-** Estudio de las correlaciones de la u-PA antigénica plasmática.

<b>r</b>	<b>u-PA</b>		
	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
Linfocitos	NC	NC	<b>0,4</b>
%Linfocitos	NC	NC	<b>0,4</b>

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.*

El estudio de las correlaciones de las concentraciones plasmáticas del inhibidor PAI con el resto de parámetros plasmáticos muestra una correlación significativa y positiva con el t-PA en todos los grados de lesión, con la u-PA en las lesiones 2 y 3, y una debil correlación con el FPA también en las lesiones 2 y 3. Así como un correlación significativa y negativa con el dímero D en las lesiones 2 y 3 (tabla 20).

**Tabla 20.-** Estudio de las correlaciones del PAI antigénico plasmático.

<b>r</b>	<b>PAI-1</b>		
	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
t-PA	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>
u-PA	NS	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>
Dímero-D	NS	<b>-0,4</b>	<b>-0,2</b>
FPA	NS	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NS = No Correlaciona.*

**DD, FPA y fibrinógeno:**

El estudio de las correlaciones del dímero D pone de manifiesto una correlación significativa y positiva de este parámetro con el fibrinógeno von-Clauss y con el fibrinógeno antigénico en las lesiones 3, y una correlación significativa y positiva con el nº de leucocitos en la lesión 1 (tabla 21).

**Tabla 21.-** Estudio de las correlaciones del dímero D plasmático.

<b>Dímero-D</b>			
<b>r</b>	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
Fibrinógeno von-Clauss	NS	NS	<b>0,3</b>
Fibrinógeno AG	NS	NS	NS
Leucocitos	<b>0,7</b>	NS	NS
Monocitos	NS	NS	NS

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.*

El fibrinógeno von-Clauss y antigénico muestran una correlación significativa y negativa con el % de linfocitos en las lesiones 2 y 3, y una correlación significativa y positiva con la u-PA en la lesión 2 y con el nº de monocitos en la lesión 3 (tabla 22).

**Tabla 22.-** Estudio de las correlaciones del fibrinógeno von-Clauss y antigénico plasmático.

<b>r</b>	<b>Fibrinógeno von-Clauss</b>			<b>Fibrinógeno Antigénico</b>		
	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
t-PA	NC	NC	NC	NC	NC	NC
u-PA	NC	<b>0,3</b>	NC	NC	<b>0,2</b>	NC
PAI	NC	NC	NC	NC	NC	NC
%Linfocitos	NC	<b>-0,5</b>	<b>-0,4</b>	NC	<b>-0,4</b>	<b>-0,5</b>
Monocitos	NC	NC	<b>0,4</b>	NC	NC	<b>0,3</b>

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.*

La correlación entre el fibrinógeno von-Clauss y el fibrinógeno antigénico es significativa y positiva en todos los grados de lesión (tabla 23).

**Tabla 23.-** Estudio de las correlaciones del fibrinógeno von-Clauss.

<b>Fibrinógeno von-Clauss</b>			
<b>R</b>	LESIÓN 1	LESIÓN 2	LESIÓN 3
Fibrinógeno Antigénico	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.*

### Factores de riesgo

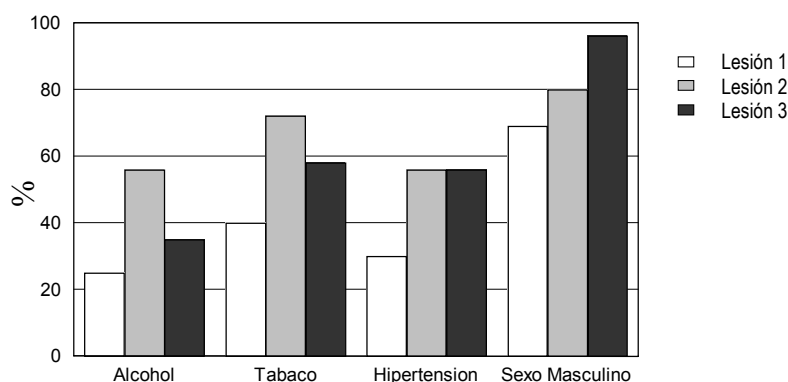
Los pacientes incluidos en el grupo de lesión 1 tienen una edad media de  $62 \pm 17$  años, un 31% son mujeres y un 69% son hombres.

En el grupo de lesión 1 hay un 40% de pacientes con el hábito tabáquico, un 25% consumidores de alcohol ( $>80$  gr/día) y un 30% de hipertensos (figura 75). Un 10% tienen los tres factores sumados.

Los pacientes del grupo de lesión 2 tienen una edad media de  $67 \pm 10$  años, un 20% son mujeres y un 80% hombres.

En el grupo de lesión 2 hay un 72% de pacientes con el hábito tabáquico, un 56% consumidores de alcohol ( $>80$  gr/día) y un 56% de hipertensos (figura 75). Un 22% tienen los tres factores sumados.

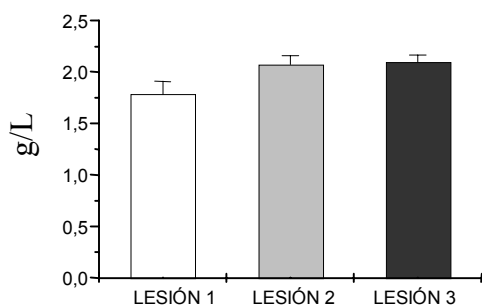
En el grupo de lesión 3 la edad media es de  $66 \pm 9$  años, un 4% son mujeres y un 96% hombres. En el grupo de lesión 3 hay un 58% de pacientes con el hábito tabáquico, un 35% consumidores de alcohol ( $>80$  gr/día) y un 56% de hipertensos (figura 75). Un 9% tienen los tres factores sumados.



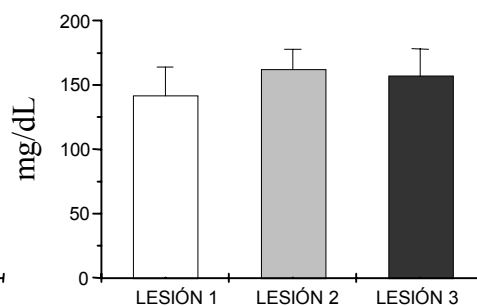
**Figura 75.-** Distribución de los factores de riesgo por grupo de lesión.

Los parámetros de variación continua en los tres grados de lesión muestran las siguientes características:

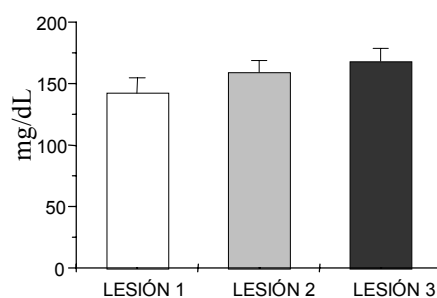
Los niveles de colesterol plasmático y TAG están ligeramente incrementados con el grado de lesión, los de glucosa en sangre se incrementan de forma significativa con el grado de lesión arterial (figuras 76, 77 y 78, tabla 24).



**Figura 76.-** Colesterol plasmático.



**Figura 77.-** TAG plasmáticos.



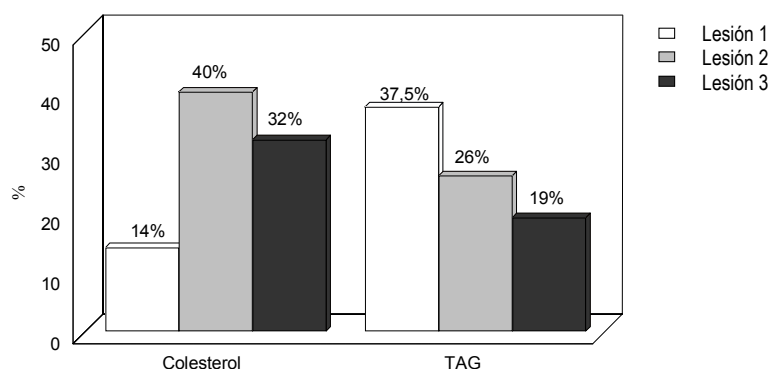
**Figura 78.-** Glucemia en sangre.

**Tabla 24.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 76, 77 y 78.

	Colesterol	TAG	Glucemia
Lesión 1-Lesión 2	NS	NS	*
Lesión 1-Lesión 3	NS	NS	*
Lesión 2-Lesión 3	NS	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

En la figura 79 se muestra el porcentaje de pacientes que en cada lesión tienen el colesterol mayor de 2,2 g/L y los triglicéridos mayores de 1,85 mg/dL.



**Figura 79.-** Porcentaje de pacientes con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.

Como se aprecia en la figura 79 el mayor número de pacientes con hipertrigliceridemia se encuentra en el grupo de lesión 1, mientras que la hipercolesterolemia se observa en la lesión 2 y 3 en mayor proporción.

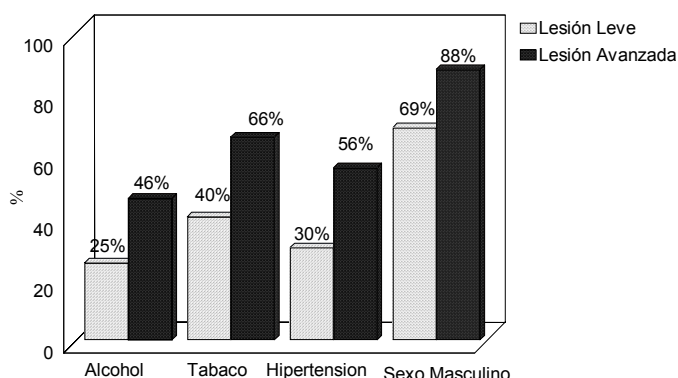
Para llevar a cabo el estudio de la incidencia de los factores de riesgo sobre la evolución de la lesión arterial, estudiaremos las diferencias entre la lesión leve (grupo 1) y las lesiones avanzadas (lesiones 2 y 3).

En la lesión leve encontramos un 40 % de pacientes fumadores y en la lesión avanzada un 66%. Esta diferencia al aplicar una Chi-Square es estadísticamente significativa con una  $p < 0,02$  (figura 80).

En la lesión leve también vemos un 25% de pacientes que consumen alcohol (>80 gr/día) y en la lesión avanzada un 46%. Esta diferencia al aplicar una Chi-Square es estadísticamente significativa con una  $p < 0,05$  (figura 80).

Los pacientes hipertensos en la lesión leve son un 30% y en la avanzada un 56%. Esta diferencia al aplicar una Chi-Square es estadísticamente significativa con una  $p < 0,03$  (figura 80).

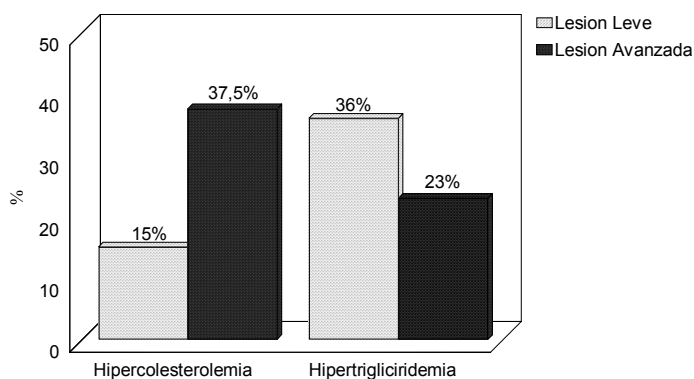




**Figura 80.-** Distribución de los factores de riesgo entre lesión leve y lesión avanzada.

El porcentaje de pacientes que sufren hipercolesterolemia en la lesión leve es de un 15 % y en la lesión avanzada de un 37,5%. Esta diferencia al aplicar una Chi-Square es estadísticamente significativa con una  $p < 0,04$  (figura 81).

En la lesión leve hay un 36% de pacientes con hipertrigliciridemia y en la avanzada un 23%. Esta diferencia no muestra diferencias estadísticamente significativas (figura 81).



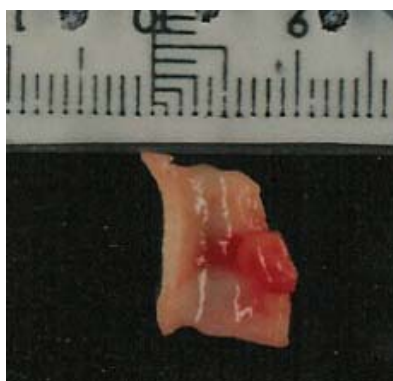
**Figura 81.-** Porcentaje de pacientes con hipercolesterolemia e hipertrigliciridemia.

**SECTORES ARTERIALES: CARÓTIDA, AORTA Y FEMORAL****Estudio histológico****Clasificación de las muestras**

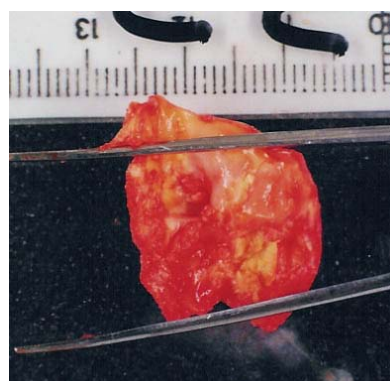
En la segunda parte del estudio las muestras se clasifican además de por el grado de lesión por el sector arterial del que proceden: carótida, aorta o femoral.

Se ha valorado el grado de lesión que presentan las arterias recibidas en la unidad por las técnicas histológicas descritas en el apartado de material y métodos.

Una vez valorado el grado de lesión se han clasificado las arterias según el sector arterial del que proceden: carótida N=40 (Carótida Lesión 1 N=6, Carótida Lesión 2 N=14, Carótida Lesión 3 N=20), aorta N=37 (Aorta Lesión 1 N=7, Aorta Lesión 2 N=17, Aorta Lesión 3 N=12) o femoral N=49 (Femoral Lesión 1 N=9, Femoral Lesión 2 N=28, Femoral Lesión 3 N=12). Figuras 82, 83, 84 y 85.



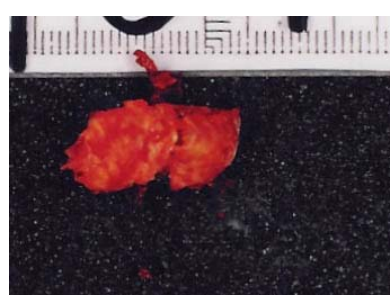
*Figura 82.-* Femoral lesión 1, endotelio.



*Figura 83.-* Carótida lesión 3, endotelio.



*Figura 84.-* Aorta lesión 3, endotelio.



*Figura 85.-* Carótida lesión 2, adventicia.

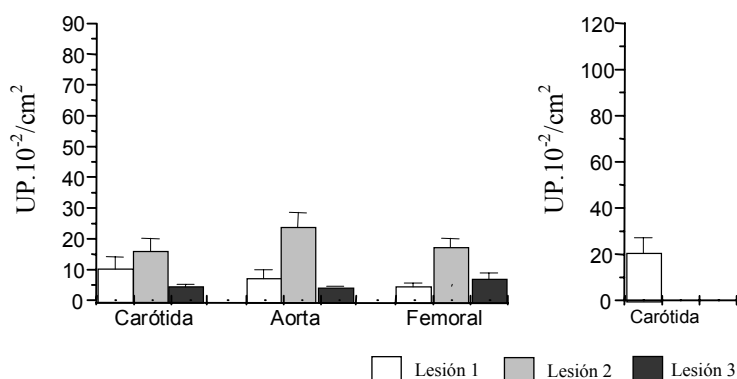
## Estudio bioquímico

### Parámetros fibrinolíticos

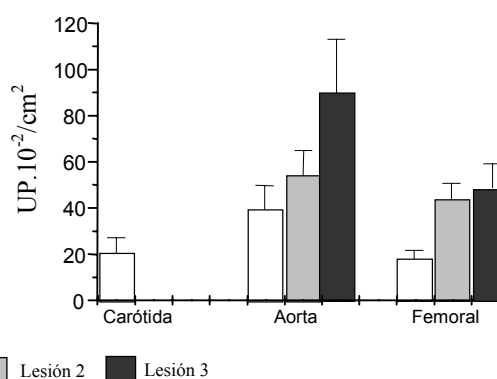
#### *Actividad Fibrinolítica de la Pared Arterial:*

La actividad de superficie del endotelio se muestra en la figura 86. Ninguno de los grupos de lesión estudiados presenta diferencias significativas entre los sectores arteriales carótida, aorta o femoral. Sin embargo, en la lesión 2 esta actividad está incrementada respecto a las lesiones 1 y 3. Tampoco se observan diferencias significativas en un mismo sector con diferentes grados de lesión.

La actividad fibrinolítica de la adventicia se representa en la figura 87. No hay diferencias significativas entre sectores de un mismo grupo de lesión, ni en un mismo sector con diferentes grados de lesión, aunque dentro de cada sector al aumentar la lesión se incrementa la actividad de superficie. En este apartado hay que resaltar dos puntos importantes el primero de ellos es que en el sector arterial carótida en los grupos de lesión 2 y 3 no hay valores de la actividad de la adventicia porque las muestras proceden de intervenciones quirúrgicas por endarterectomía en las que esta capa no se extrae. El segundo punto a destacar es que en todas las lesiones, la actividad de la adventicia de la aorta es superior a la de los otros sectores estudiados.



**Figura 86.-** Actividad fibrinolítica de la superficie del endotelio.



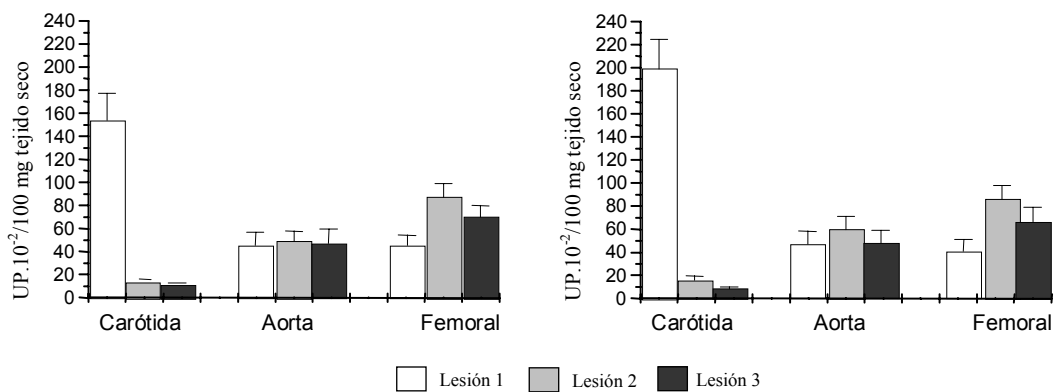
**Figura 87.-** Actividad fibrinolítica de la superficie de la adventicia.

El estudio estadístico de los datos de las figuras 86 y 87 no muestra diferencias significativas entre ninguno de los parámetros estudiados.

**Capacidad Generadora de Plasmina por la Pared Arterial:**

La capacidad generadora de plasmina de las arterias a los 10 y 120 minutos de incubación se representa en las figuras 88 y 89 respectivamente. Se puede observar que en la lesión 1 los valores de la actividad fibrinolítica de carótida son significativamente mayores que los de aorta y femoral a los 10 y 120 minutos. En el grupo de lesión 2 tanto a los 10 como a los 120 minutos, los valores mas altos corresponden a la arteria femoral que difiere de aorta y carótida significativamente, en este grupo de lesión los valores de carótida son también significativamente menores que los de aorta. En el grupo de lesión 3 el valor mas elevado sigue perteneciendo al grupo de femorales tanto a los 10 como a los 120 minutos. En este grupo de lesión los valores de aorta y femoral están incrementados respecto a los de carótida de forma significativa en los dos tiempos estudiados (tabla 25).

Si estudiamos como el grado de lesión influye en cada sector arterial vemos que la actividad fibrinolítica de carótida disminuye significativamente en las lesiones 2 y 3 con respecto a la lesión 1. El resto de sectores no se modifica de forma significativa (tabla 26).



**Figura 88.-** Capacidad Generadora de Plasmina a los 10 minutos de la incubación.

**Figura 89.-** Capacidad Generadora de Plasmina a los 120 minutos de la incubación.

**Tabla 25.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 88 y 89.

		CGP 10	CGP 120
Lesión 1	Carótida-Aorta	*	*
	Aorta-Femoral	NS	NS
	Carótida-Femoral	*	*
Lesión 2	Carótida-Aorta	*	*
	Aorta-Femoral	*	NS
	Carótida-Femoral	*	*
Lesión 3	Carótida-Aorta	*	*
	Aorta-Femoral	NS	NS
	Carótida-Femoral	*	*

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

**Tabla 26.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 88 y 89.

		CGP 10	CGP 120
Sector	Carótida1-Carótida2	*	*
	Carótida1-Carótida3	*	*
	Carótida2-Carótida3	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

No hay diferencias significativas entre arterias aorta ni femoral con diferentes grados de lesión.

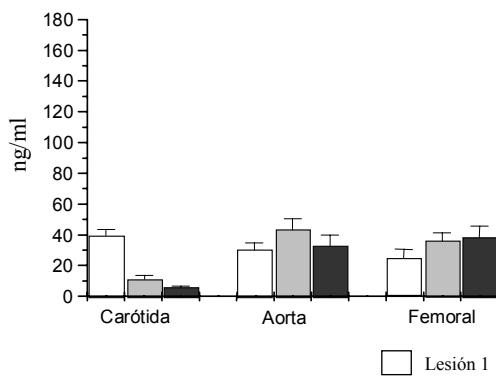
#### **Activadores e inhibidores de la fibrinólisis:**

Los niveles antigénicos del activador de la fibrinólisis t-PA se estudian en la figura 90. En el grupo de lesión 1 no hay diferencias significativas entre los tres sectores arteriales estudiados. En el grupo de lesión 2 los niveles de t-PA de carótida son significativamente menores con respecto a los de aorta y de femoral, e igual ocurre en la lesión 3 (tabla 27). Cuando se estudia un mismo sector con diferentes grados de lesión se observan diferencias significativas solo en carótida donde se aprecia que los niveles de t-PA disminuyen significativamente en las lesiones 2 y 3 con respecto a la 1 (tabla 28).

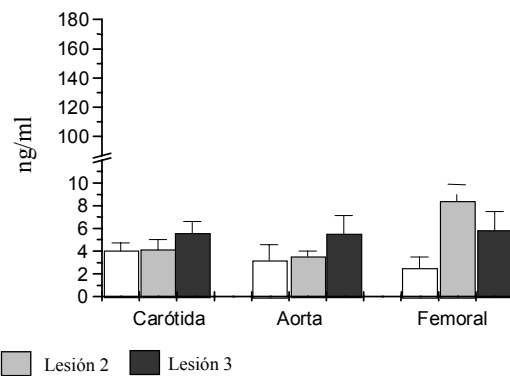
El estudio de los niveles tisulares del activador de la fibrinólisis u-PA por grado de lesión en cada sector arterial se describen en la figura 91. En el grupo de lesión 1 no se observan diferencias significativas entre los sectores estudiados. En el grupo de lesión 2 los niveles de u-PA en arteria femoral están incrementados significativamente con respecto a los de carótida y aorta. En el grupo de lesión 3 no se observan diferencias entre los tres sectores arteriales (tabla 27). Tampoco hay diferencias significativas al estudiar cada sector con diferentes grados de lesión (tabla 28).

Los niveles tisulares del inhibidor de la fibrinólisis PAI se estudia en la figura 92.

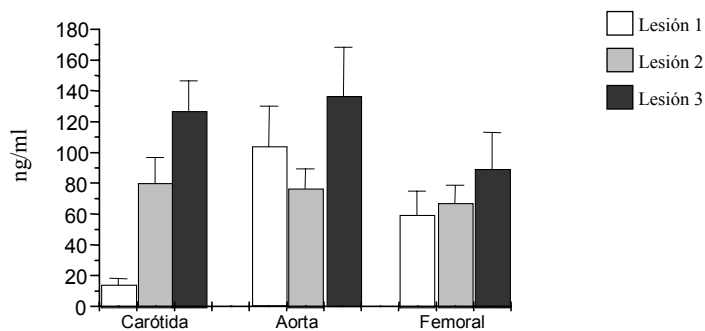
En el estudio de las diferencias entre sectores por grado de lesión se observa que en la lesión 1 los niveles de PAI son significativamente menores en carótida con respecto a aorta. En el resto de lesiones no hay diferencias entre sectores arteriales (tabla 27). Si estudiamos la influencia de la lesión en cada sector vemos que en carótida los niveles de PAI son significativamente menores en la lesión 1 con respecto a la 2 y la 3 (tabla 28).



**Figura 90.-** t-PA antigénico tisular.



**Figura 91.-** u-PA tisular.



**Figura 92.-** PAI antigénico tisular.

**Tabla 27.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 90, 91 y 92.

		t-PA	u-PA	PAI
Lesión 1	Carótida-Aorta	NS	NS	*
	Aorta-Femoral	NS	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	NS	NS
Lesión 2	Carótida-Aorta	*	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	*	NS
	Carótida-Femoral	*	*	NS
Lesión 3	Carótida-Aorta	*	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS	NS
	Carótida-Femoral	*	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

**Tabla 28.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 90, 91 y 92.

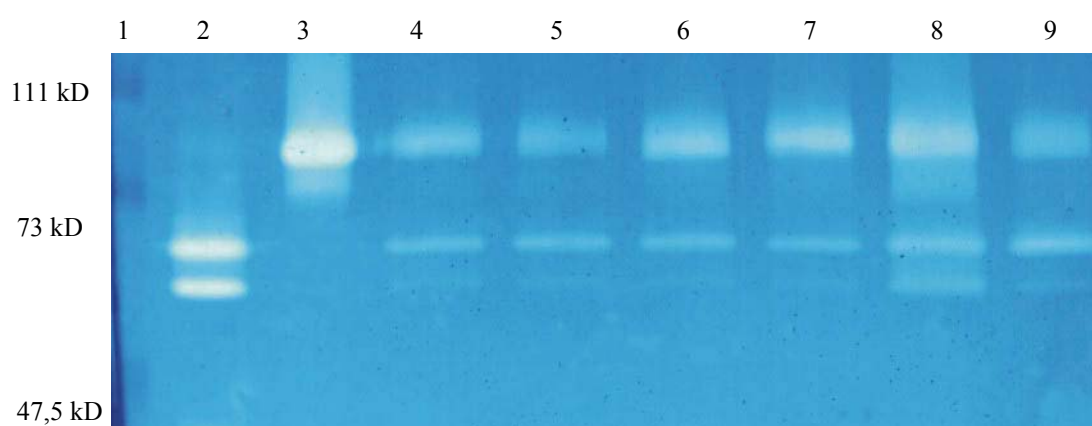
		t-PA	u-PA	PAI
Sector	Carótida1-Carótida2	*	NS	NS
	Carótida1-Carótida3	*	NS	*
	Carótida2-Carótida3	NS	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

### Identificación de la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas

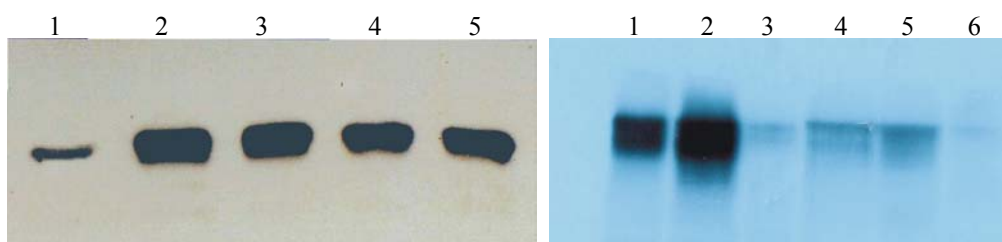
En las muestras de arteria hemos encontrado metaloproteasas con actividad gelatinolítica con pesos moleculares de 92, 88, 72 y 66 KD, compatibles con las formas inactivas y activas de la MMP-9 y la MMP-2 respectivamente, como se muestra en la figura 93. Estas bandas de lisis desaparecen en los geles de electroforesis incubados con fenantrolina, un inhibidor específico de la acción de las metaloproteasas (no se muestra el zimograma).

En las figuras 94 y 95 se muestra la identificación de dichas metaloproteasas por Western blot.



**Figura 93.-** Zimografía de gelatina.

1: Pesos moleculares; 2: Estándar MMP-2; 3: Estándar MMP-9; 4: Femoral lesión 3; 5: Aorta lesión 1; 6: Carótida lesión 3; 7: Carótida lesión 2; 8: Aorta lesión 3; 9: Femoral lesión 2.



**Figura 94.-** Fotografía de placa autoradiográfica de Western blot MMP-9.

1: Femoral lesión 1; 2: Estándar MMP-9; 3: Carótida lesión 3; 4: Aorta lesión 3; 5: Carótida lesión 2.

**Figura 95.-** Placa autoradiográfica de Western blot MMP-2.

1: Femoral lesión 3; 2: Estándar MMP-2; 3: Aorta lesión 1; 4: Carótida lesión 2; 5: Aorta lesión 2; 6: Carótida lesión 1.

### Valoración de la actividad gelatinolítica:

La evolución por sector de la actividad gelatinolítica de la MMP-9 inactiva y la MMP-9 activa se muestran en las figuras 96 y 97 respectivamente.

El porcentaje de MMP-9 activa presente en cada sector arterial se representa en la figura 98.



La MMP-9 inactiva no presenta diferencias significativas entre sectores por grupos de lesión, ni al comparar un mismo sector con diferentes grados de lesión (tablas 29 y 30), y se encuentra en el 100 % de las muestras estudiadas.

La MMP-9 activa no esta presente en ningún sector arterial perteneciente al grupo de lesión 1, en la lesión 2 aparece solo en arterias carótidas y en la lesión 3 en carótidas y aortas pero no se observa en femorales en ningún grupo de lesión (tabla 29).

El porcentaje de activación de esta MMP en carótida en la lesión 3 es superior al de lesión 2 y prácticamente igual al que presenta la aorta (figura 98).

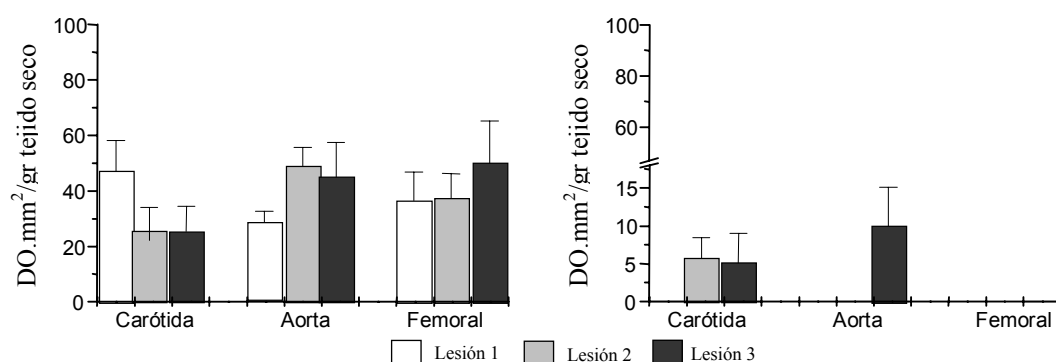


Figura 96.- MMP-9 inactiva.

Figura 97.- MMP-9 activa.

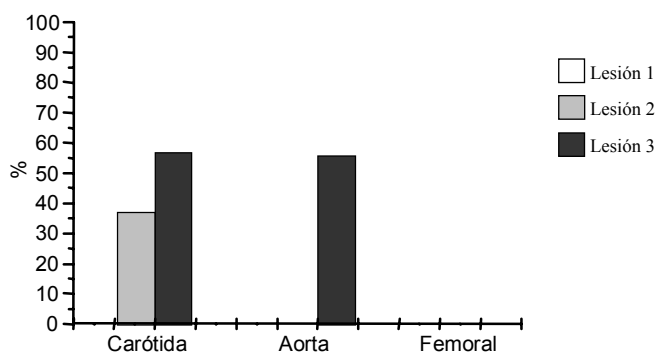


Figura 98.- % de muestras que presentan la MMP-9 activa.

La actividad gelatinolítica de la MMP-2 inactiva en cada sector arterial según el grado de lesión se representa en la figura 99, la de la MMP-2 activa en la figura 100 y el porcentaje de formas activas de la MMP-2 en la figura 101.

La MMP-2 inactiva en el grupo de lesión 1 esta significativamente incrementada en carótida con respecto a aorta y femoral, en los grupos de lesión 2 y 3 no se observan diferencias significativas entre los sectores arteriales estudiados (tabla 29). En todos los grupos de lesión el valor más bajo corresponde a aorta. Esta MMP está presente en el 100% de las muestras estudiadas.

Si se estudia la influencia del grado de lesión en los diferentes sectores arteriales se aprecia que en carótidas con lesión 1 la MMP-2 inactiva esta significativamente incrementada con respecto al mismo sector con lesiones 2 y 3 (tabla 30).

La MMP-2 activa en la lesión 1 no esta presente en arteria carótida y si aparece en las lesiones 2 y 3, no observándose mas diferencias significativas dentro de cada lesión, ni al realizar el estudio por sector (tabla 29).

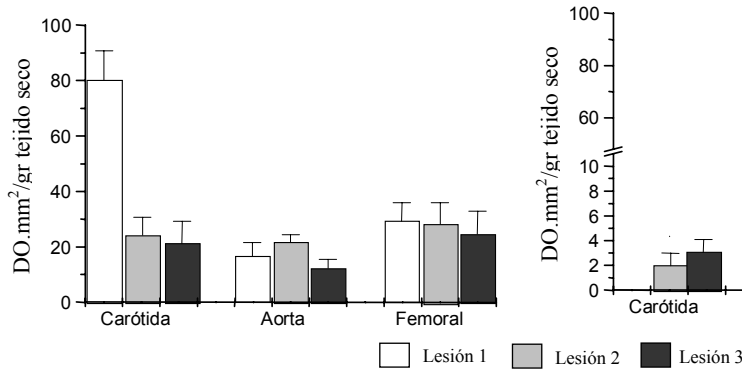


Figura 99.- MMP-2 inactiva.

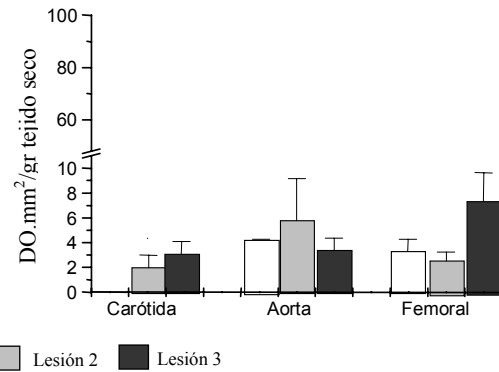


Figura 100.- MMP-2 activa.

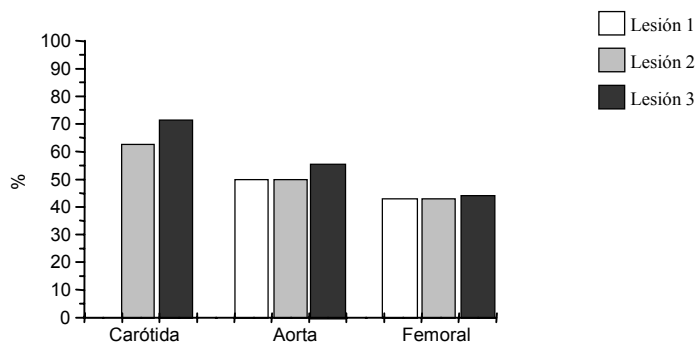


Figura 101.- % de muestras que presentan la MMP-2 activa.

**Tabla 29.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 96 y 99.

		MMP-9 inactiva	MMP-2 inactiva
Lesión 1	Carótida-Aorta	NS	*
	Aorta-Femoral	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	*
Lesión 2	Carótida-Aorta	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	NS
Lesión 3	Carótida-Aorta	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

**Tabla 30.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 96 y 99.

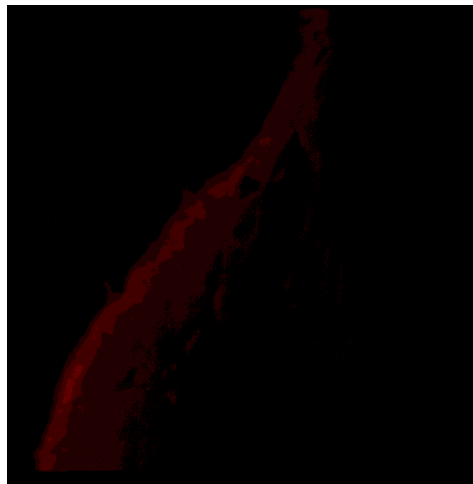
		MMP-9 inactiva	MMP-2 inactiva
Carótida	Lesión 1-Lesión 2	NS	*
	Lesión 1-Lesión 3	NS	*
	Lesión 2-Lesión 3	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

No hay diferencias significativas entre arterias aorta ni femoral con diferentes grados de lesión.

### **Fibrinógeno en pared arterial**

En el estudio de la distribución de fibrinógeno en la pared arterial observamos que el 100% de las muestras presentan infiltración de fibrinógeno tanto en íntima como en adventicia. En la figura 102 se muestran el área y la penetración de fibrinógeno-fibrina en íntima de una arteria carótida con lesión 2.

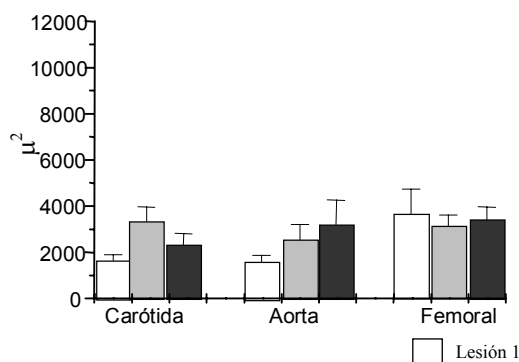


**Figura 102.-** Arteria carótida con lesión 2. Tinción inmunohistoquímica de fibrinógeno-fibrina. Endotelio (x100).

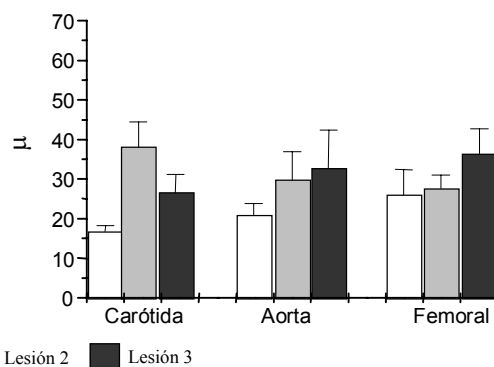
El área de fibrinógeno que recubre el endotelio no muestra diferencias significativas entre sectores por grupos de lesión, aunque en aorta parece que hay ligero incremento al ir evolucionando la lesión (figura 103). La profundidad del fibrinógeno en este área tampoco muestra diferencias significativas entre sectores al realizar el estudio por grupos de lesión, aunque hay un incremento de esta profundidad que no llega a ser significativo al evolucionar la lesión (figura 104).

En adventicia el área que ocupa el fibrinógeno disminuye al aumentar la lesión, aunque no hay diferencias estadísticas significativas (figura 105).

La misma tendencia se observa con la profundidad del fibrinógeno en adventicia aunque tampoco es significativa (figura 106). En las lesiones 2 y 3 no disponemos de datos de carótida por ser muestras obtenidas de intervenciones quirúrgicas por endarterectomía.



**Figura 103.-** Área de fibrinógeno en íntima.



**Figura 104.-** Profundidad de fibrinógeno en íntima.

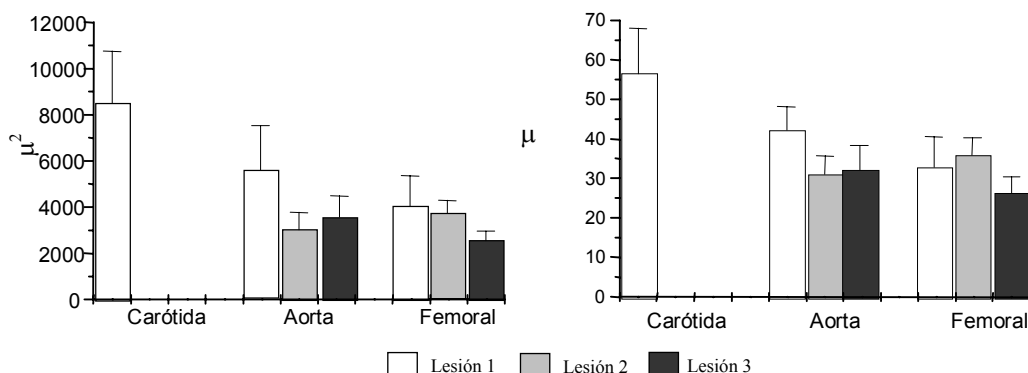


Figura 105.- Área de fibrinógeno en adventicia.

Figura 106.- Profundidad de fibrinógeno en adventicia.

El estudio estadístico de los datos de las figuras 103, 104, 105 y 106 no muestra diferencias significativas entre ninguno de los parámetros estudiados.

### Correlaciones de parámetros de la pared arterial

#### Actividad fibrinolítica de la pared arterial:

Tabla 31.- Correlaciones de la actividad fibrinolítica del endotelio con diversos parámetros tisulares.

r	Endotelio								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Capacidad generadora de plasmina	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	NC	NC	NC	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>
t-PA	NC	NC	NC	NC	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	NC	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>
u-PA	<b>0,4</b>	<b>0,9</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
PAI-1	<b>-0,3</b>	<b>-0,4</b>	<b>-0,4</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,4</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,3</b>
MMP-9 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
MMP-9 activa	-	-	-	NC	-	-	NC	NC	-
MMP-2 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-2 activa	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Fibrinógeno Área endotelio	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Profundidad endotelio	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Área adventicia	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
Profundidad adventicia	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC

Solo se muestra r cuando p ≤ 0,05; NC = No Correlaciona.

**Tabla 32.-** Correlaciones de la fibrinólisis de la adventicia con diversos parámetros tisulares.

r	Adventicia								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Capacidad generadora de plasmina	NC	<b>0,7</b>	NC	-	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	-	<b>0,8</b>	<b>0,5</b>
t-PA	NC	NC	NC	-	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	-	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>
u-PA	NC	<b>0,9</b>	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
PAI-1	NC	NC	NC	-	<b>-0,5</b>	<b>-0,3</b>	-	<b>-0,5</b>	<b>-0,3</b>
MMP-9 inactiva	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
MMP-9 activa	-	-	-	-	-	-	-	NC	-
MMP-2 inactiva	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
MMP-2 activa	-	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
Área endotelio	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
Profundidad endotelio	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
Área adventicia	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
Profundidad adventicia	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

**Capacidad generadora de plasmina de la pared arterial:**

**Tabla 33.-** Correlaciones de la capacidad generadora de plasmina con diversos parámetros tisulares.

r	Capacidad generadora de plasmina								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
t-PA	<b>0,3</b>	NC	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,5</b>
u-PA	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	NC	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	NC	<b>0,4</b>	NC	NC
PAI-1	<b>-0,3</b>	<b>-0,8</b>	<b>-0,8</b>	<b>-0,4</b>	<b>-0,4</b>	<b>-0,4</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,3</b>
MMP-9 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-9 activa	-	-	-	NC	-	-	NC	NC	-
MMP-2 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-2 activa	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Fibrinógeno									
Área endotelio	NC	NC	<b>0,7</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Profundidad endotelio	NC	NC	<b>0,7</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Área adventicia	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
Profundidad adventicia	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

**Activadores e inhibidores de la fibrinólisis:**

**Tabla 34.-** Correlaciones del t-PA de la pared arterial con diversos parámetros tisulares.

r	t-PA								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Área endotelio	NC	<b>-0,9</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Profundidad endotelio	NC	<b>-0,6</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Área adventicia	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Profundidad adventicia	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-9 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-9 activa	-	-	-	NC	-	-	NC	NC	-
MMP-2 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-2 activa	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

En el estudio de correlaciones vemos que la u-PA tisular muestra una correlación significativa y positiva con la MMP-9 inactiva y con la MMP-2 inactiva en arterias femorales con un grado de lesión 2, y con la MMP-9 inactiva en femorales con lesión 3 (tabla 35).

**Tabla 35.-** Correlaciones de la u-PA de la pared arterial con diversos parámetros tisulares.

r	u-PA								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Área endotelio	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Profundidad endotelio	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Área adventicia	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Profundidad adventicia	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-9 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>	NC	NC	<b>0,7</b>
MMP-9 activa	-	-	-	NC	-	-	NC	<b>0,9</b>	-
MMP-2 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>	NC	<b>0,7</b>	NC
MMP-2 activa	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

El PAI-1 antigénico tisular se correlaciona de forma significativa y negativa con la MMP-9 activa en arterias carótidas con lesiones 2 y 3, y con la MMP-9 inactiva en carótidas con lesión 3 (tabla 36).

**Tabla 36.-** Correlaciones del PAI-1 antigénico de la pared arterial con diversos parámetros tisulares.

r	PAI								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Área endotelio	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>	NC	NC	<b>0,5</b>	NC
Profundidad endotelio	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Área adventicia	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Profundidad adventicia	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-9 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>-0,7</b>	NC	NC
MMP-9 activa	-	-	-	<b>-0,9</b>	-	-	<b>-0,9</b>	NC	-
MMP-2 inactiva	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP-2 activa	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.



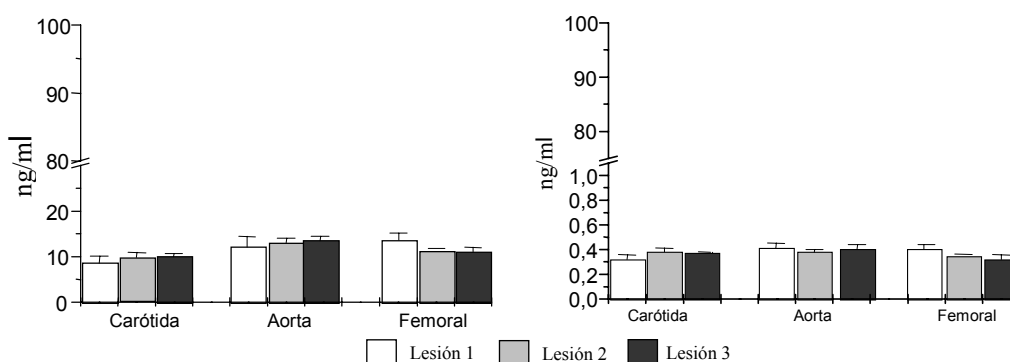
## Estudio plasmático

### Parámetros fibrinolíticos

La concentración plasmática del t-PA antigénico plasmático se muestra en la figura 107. Se observa que los niveles de este parámetro están más incrementados en aorta y femoral que en carótida en todos los grados de lesión. Las diferencias entre carótida y femoral se hacen significativas en el grado de lesión 2 (tabla 37). Por otra parte los niveles plasmáticos del t-PA se encuentran por encima del valor normal máximo (12ng/ml) en aorta en los tres grados de lesión y en femoral en la lesión 1, manteniéndose dentro del rango normal (1-12ng/ml) en carótida.

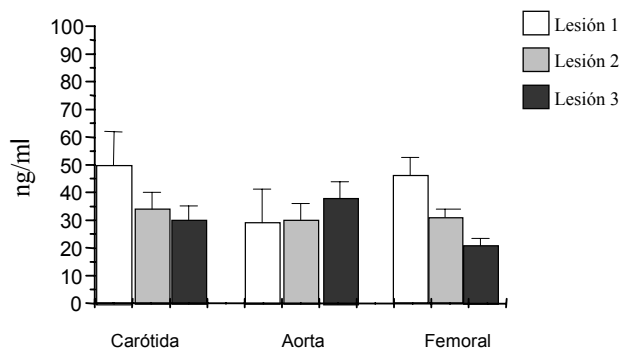
Los niveles plasmáticos del activador u-PA se muestran en la figura 108. La u-PA no muestra diferencias significativas entre los tres sectores estudiados ni dentro de cada sector por el grado de lesión, manteniéndose en todos los casos los niveles dentro del rango normal (1 ng/ml) (tablas 37 y 38).

Los niveles plasmáticos del PAI se representan en la figura 109, en la que se aprecia que no hay diferencias significativas entre los tres sectores estudiados, sin embargo se observa que en la lesión 1 en carótida estos niveles están por encima de los valores normales al igual que en femoral (4-43 ng/ml). La disminución que se observa en el grupo de arterias de femoral en la lesión 1 con respecto a las de las lesiones 2 y 3 es estadísticamente significativa (tablas 37 y 38).



**Figura 107.-** t-PA antigénico plasmático.

**Figura 108.-** u-PA antigénica plasmático.



**Figura 109.-** PAI-1 antigénico plasmático.

**Tabla 37.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 107, 108 y 109.

		t-PA	u-PA	PAI-1
Lesión 1	Carótida-Aorta	NS	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	NS	NS
Lesión 2	Carótida-Aorta	*	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	NS	NS
Lesión 3	Carótida-Aorta	*	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

**Tabla 38.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 107, 108 y 109.

		t-PA	u-PA	PAI
Sector	Femoral 1-Femoral 2	NS	NS	*
	Femoral 1-Femoral 3	NS	NS	*
	Femoral 2-Femoral 3	NS	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

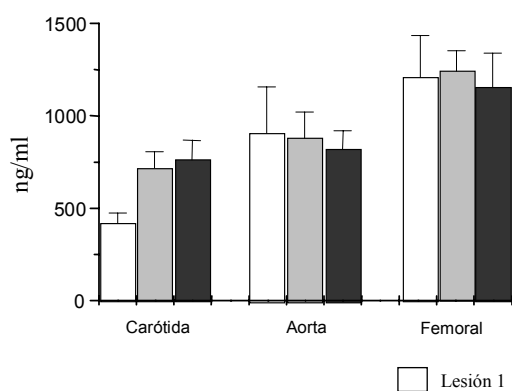
No hay diferencias significativas entre arterias carótida y aorta con diferentes grados de lesión.

### DD, FPA y fibrinógeno

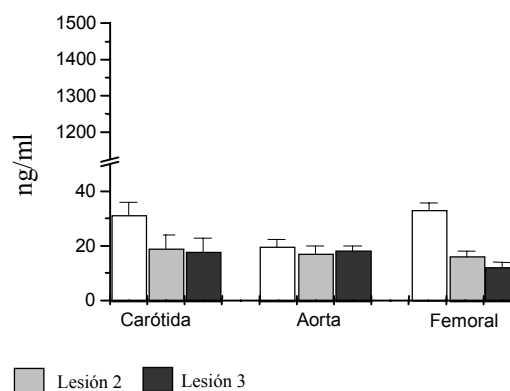
La concentración plasmática de dímero D, se representa en la figura 110. Los niveles de Dímero D presentan diferencias significativas entre sectores arteriales en el grupo de lesión 1 donde los valores de femoral y aorta están significativamente incrementado con respecto a los de carótida. En el grupo de lesión 2 los niveles plasmáticos de dímero D en carótida son significativamente menores con respecto a los de femoral. En la lesión 3 también hay diferencias significativas entre carótida y femoral, siendo los valores de carótida inferiores (tabla 39). También podemos apreciar que ya en la lesión 1 los valores de dímero D en femoral están por encima de los valores máximos no patológicos (<100 ng/ml) y se mantienen por encima de este nivel hasta la lesión 3. El estudio por sector y con diferente grado de lesión de este parámetro muestra diferencias significativas entre carótida 1 y carótida 3, estando los valores en este ultimo grupo significativamente incrementados (tabla 40).

Los niveles plasmáticos de FPA se representan en la figura 111, en la que se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre sectores arteriales por grupos de lesión. Sin embargo los niveles plasmáticos de este parámetro se encuentran incrementados con respecto al valor máximo considerado no patológico (<5 ng/ml) en todas las lesiones estudiadas (tabla 39).

Las arterias carótida y femoral muestra diferencias significativas si se estudian individualmente por grupo de lesión entre las lesiones 1-2, y 1-3 (tabla 40).



**Figura 110.-** Dímero D plasmático.



**Figura 111.-** FPA plasmático.

**Tabla 39.-** Significatividad del análisis de la varianza entre grupos de lesión de los datos de las figuras 110 y 111.

		Dímero D	FPA
Lesión 1	Carótida-Aorta	*	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS
	Carótida-Femoral	*	NS
Lesión 2	Carótida-Aorta	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS
	Carótida-Femoral	*	NS
Lesión 3	Carótida-Aorta	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

**Tabla 40.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 110 y 111.

		Dímero D	FPA
Sector	Carótida 1-Carótida 2	NS	*
	Carótida 1-Carótida 3	*	*
	Carótida 2-Carótida 3	NS	NS
	Femoral 1-Femoral 2	NS	*
	Femoral 1-Femoral 3	NS	*
	Femoral 2-Femoral 3	NS	NS

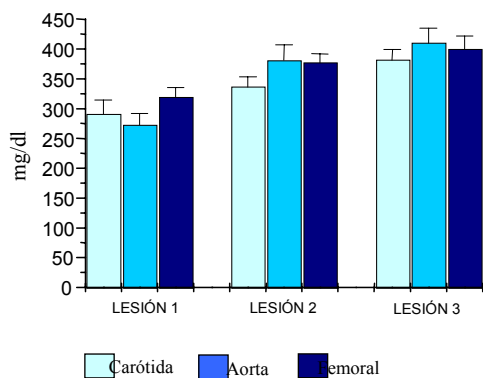
\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

No hay diferencias significativas en arteria aorta con diferentes grados de lesión.

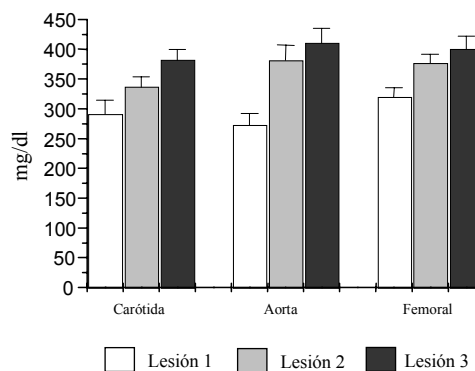
En la figura 112, se muestra la evolución de los niveles de fibrinógeno von-Clauss según el grado de lesión agrupando los datos por sector. En la figura 113, se muestra por sector la evolución de los niveles de fibrinógeno al aumentar la lesión.

Los niveles de fibrinógeno medidos por el método von-Clauss están incrementados en los tres sectores arteriales al aumentar el grado de lesión, pero no presentan diferencias significativas entre los sectores estudiados.

Sin embargo al estudiar dentro de cada sector los niveles plasmáticos de fibrinógeno según el grado de lesión se observan diferencias estadísticamente significativas entre carótidas con lesiones 1 y 2, y lesiones 1 y 3, y entre aortas con lesión 1, 2 y 3. En el grupo de femorales se observa que los niveles de fibrinógeno en todos los casos están por encima del valor máximo normal (300 mg/dl) y también hay diferencias significativas entre las lesiones 1 y 2 y las lesiones 1 y 3 (tabla 41).



**Figura 112.-** Fibrinógeno plasmático von-Clauss, agrupados por lesión.



**Figura 113.-** Niveles de Fibrinógeno plasmático von-Clauss.

**Tabla 41.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 112 y 113.

<i>Fibrinógeno von-Clauss</i>		
CARÓTIDA	Lesión 1-Lesión 2	*
	Lesión 1-Lesión 3	*
AORTA	Lesión 1-Lesión 2	*
	Lesión 1-Lesión 3	*
FEMORAL	Lesión 1-Lesión 2	*
	Lesión 1- Lesión 3	*

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

En la tabla 42, se muestra el porcentaje de pacientes con hiperfibrinogenemia según el grado de lesión y el sector arterial, y en la tabla 43 el % de incremento de los niveles de fibrinógeno plasmático por sector según grado de lesión.

**Tabla 42.-** % de pacientes con hiperfibrinogenemia, según grado de lesión y sector arterial.

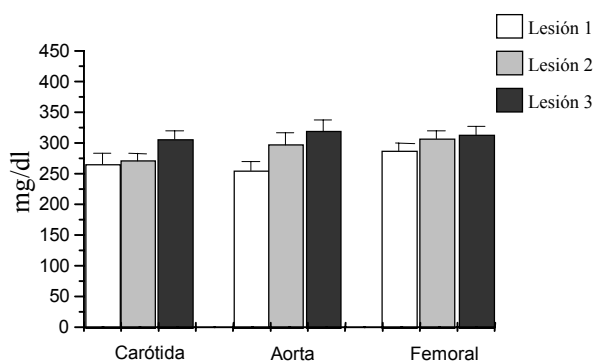
<b>% Pacientes con hiperfibrinogenemia</b>		
LESIÓN 1	Carótida	33
	Aorta	20
	Femoral	67
LESIÓN 2	Carótida	64
	Aorta	85
	Femoral	82
LESIÓN 3	Carótida	81
	Aorta	92
	Femoral	100

**Tabla 43.-** % de incremento de los niveles de fibrinógeno plasmático por sector según grado de lesión.

<b>% de incremento del fibrinógeno</b>		
CARÓTIDA	Lesión 1-Lesión 2	15
	Lesión 1-Lesión 3	30
AORTA	Lesión 1-Lesión 2	37
	Lesión 1-Lesión 3	47
FEMORAL	Lesión 1-Lesión 2	18
	Lesión 1- Lesión 3	25

Los niveles plasmáticos de fibrinógeno antigénico se representan en la figura 114, se observa que se incrementan con el grado de lesión y aunque no presentan diferencias significativas entre sectores en aorta y femoral siempre son mas elevados que en carótida.

En la lesión 2 tanto en aorta como en femoral estos niveles se encuentran por encima del valor normal y en el grado de lesión 3 en los tres sectores arteriales los niveles están por encima del valor máximo normal. En la tabla 44, se muestra el % de pacientes con hiperfibrinogenemia, por sector arterial según el grado de lesión.

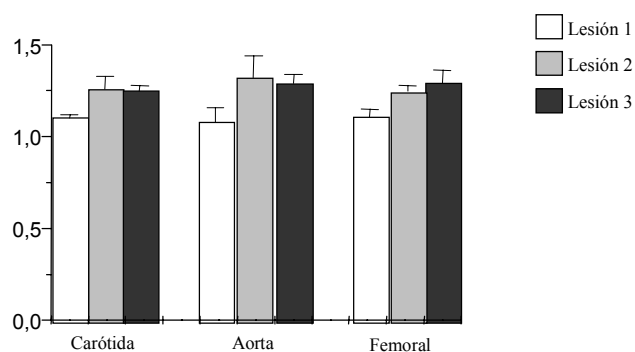


**Figura 114.-** Fibrinógeno plasmático antigénico.

**Tabla 44.-** % de pacientes con hiperfibrinogenemia en cada sector arterial.

%Pacientes con hiperfibrinogenemia		
LESIÓN 1	Carótida	33
	Aorta	55
	Femoral	55
LESIÓN 2	Carótida	21
	Aorta	43
	Femoral	43
LESIÓN 3	Carótida	62
	Aorta	67
	Femoral	67

El estudio del índice entre el fibrinógeno von-Clauss y el antigénico pone de manifiesto que el valor de este se incrementa con el grado de lesión, estando en todos los grupos por encima del valor normal ( $\leq 1$ ) (figura 115). Aunque no hay diferencias significativas entre sectores.

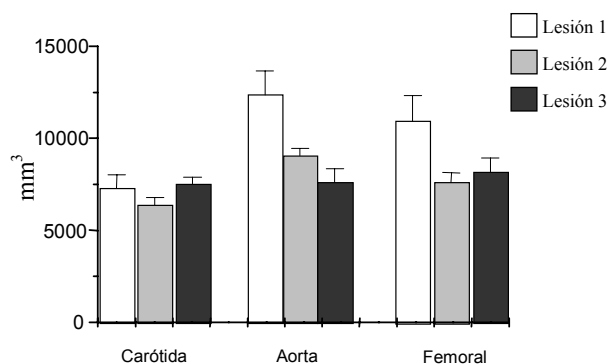


**Figura 115.-** Índice fibrinógeno vonWillebrand/fibrinógeno antigénico.

### Células blancas

Los niveles de leucocitos circulantes se representan en la figura 116. Los leucocitos en el grupo de lesión 1 presentan diferencias significativas entre los tres sectores arteriales siendo los valores más bajos los de carótida. En el grupo de lesión 2 también hay diferencias significativas entre carótida y aorta. En el grupo de lesión 3, no hay diferencias significativas entre sectores (tabla 45).

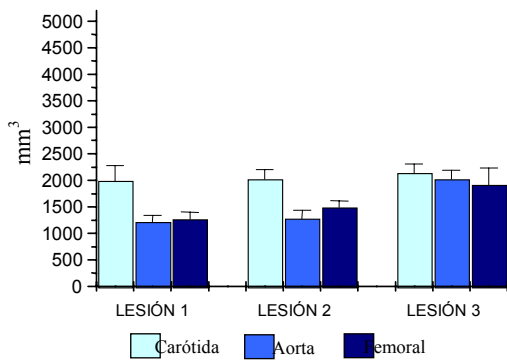
En el grupo de lesión 1 los valores de leucocitos en aorta y femoral están por encima del valor máximo considerado no patológico ( $4,5E3-11,5E3$ ). También se observan diferencias significativas entre los grados de lesión en una misma arteria siendo estas diferencias significativas entre aorta del grupo 1 y aorta del grupo 2 y femoral del grupo 1 y femoral del grupo 2 (tabla 46).



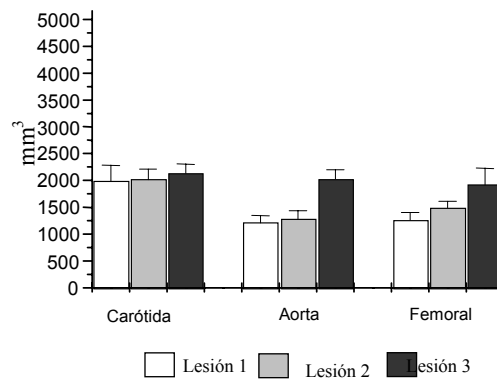
**Figura 116.-** Leucocitos circulantes.



Los niveles de linfocitos circulantes se representan en la figura 117. El número de linfocitos en el grupo de lesión 1 esta significativamente incrementado en carótida con respecto a aorta y femoral manteniéndose la misma tendencia en el grupo de lesión 2, no encontrándose diferencias significativas en el grupo de lesión 3 (tabla 45). Al estudiar la evolución del número de linfocitos por sector arterial (figura 118) vemos que los valores del en aorta se incrementan significativamente en la lesión 3 respecto a la 1 y 2 (tabla 46). En todos los casos los valores se mantienen dentro de los limites normales (900-5175 mm<sup>3</sup>) aunque son ligeramente bajos.

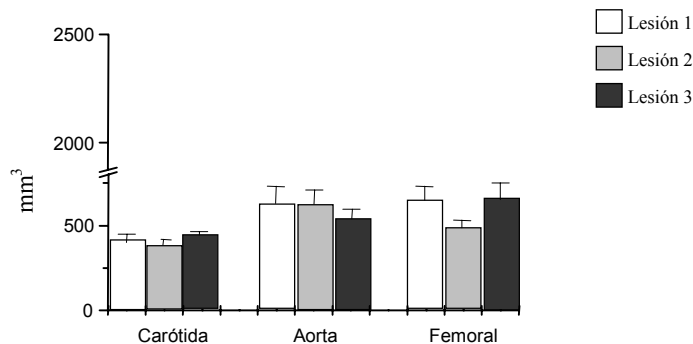


**Figura 117.-** Linfocitos circulantes, agrupados por lesión.



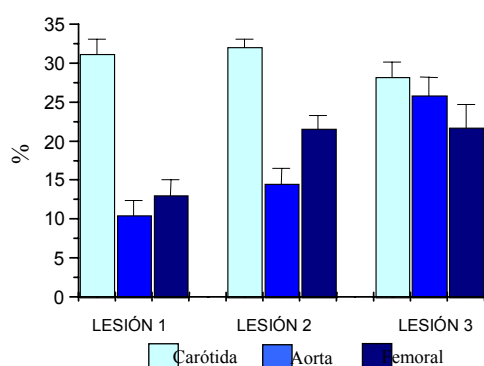
**Figura 118.-** Linfocitos circulantes.

Los monocitos circulantes se representan en la figura 119. El número de monocitos en todos los grupos de lesión se observa que es inferior en carótida. En el grupo de lesión 2 las diferencias entre carótida y aorta se hacen significativas y en el de lesión 3 lo hacen los valores de carótida y femoral (tabla 45). En el grupo de lesión 3 además los valores de femoral están incrementados por encima del valor máximo no patológico (45-800 mm<sup>3</sup>). No se observan diferencias significativas al realizar el estudio por sector con diferentes grados de lesión (tabla 46).

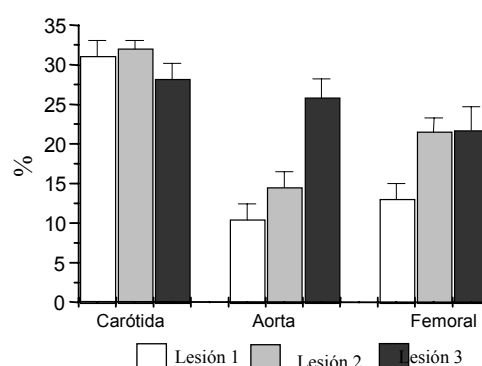


**Figura 119.-** Monocitos circulantes.

El porcentaje de linfocitos circulantes se representan en la figura 120. En todos los grupos de lesión se observa que el % de linfocitos es mayor en carótida. En el grupo de lesión 3 aunque los valores de aorta y femoral tienden a aumentar, los de carótida continúan incrementados de forma significativa (tabla 45). En todos los grupos de lesión los valores de carótida se mantienen dentro de los límites de la normalidad (20-45 %) y los de femoral por debajo de estos límites. Por sector arterial (figura 121) vemos que el porcentaje de linfocitos en aorta en las lesiones 1 y 2 es significativamente menor que en la lesión 3, y en femoral en la lesión 1 es significativamente menor que en la 3 (tabla 46).

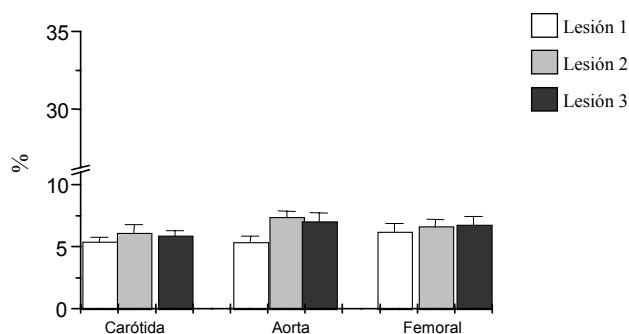


**Figura 120.-** % Linfocitos circulantes.



**Figura 121.-** % Linfocitos circulantes, agrupados por sector arterial.  
L1: Lesión 1. L2: Lesión 2. L3: Lesión 3.

El porcentaje de monocitos se muestra en la figura 122. No se observan diferencias significativas dentro de los grupos de lesión entre sectores arteriales ni entre estos por grupo de lesión (tablas 45 y 46). Sin embargo cabe destacar que los niveles en aorta con lesión 2 y lesión 3 están en el límite superior considerado normal (0,2-7%) y lo sobrepasan en la lesión 2.



**Figura 122.-** % Monocitos circulantes.

**Tabla 45.-** Significatividad del análisis de la varianza de los datos de las figuras 116, 117, 118, 119, 120, 121 y 122.

		Leucocitos	Linfocitos	Monocitos	%Linfocitos	%Monocitos
Lesión 1	Carótida-Aorta	*	*	NS	*	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS	NS	NS	NS
	Carótida-Femoral	*	*	NS	*	NS
Lesión 2	Carótida-Aorta	*	*	*	*	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS	NS	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	*	NS	*	NS
Lesión 3	Carótida-Aorta	NS	NS	NS	NS	NS
	Aorta-Femoral	NS	NS	NS	NS	NS
	Carótida-Femoral	NS	NS	*	NS	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

**Tabla 46.-** Significatividad del análisis de la varianza según el sector arterial de los datos de las figuras 116, 117, 118, 119, 120, 121 y 122.

		Leucocitos	Linfocitos	Monocitos	%Linfocitos	%Monocitos
CARÓTIDA	Lesión 1-Lesión 2	NS	NS	NS	NS	NS
	Lesión 1-Lesión 3	NS	NS	NS	NS	NS
AORTA	Lesión 1-Lesión 2	*	NS	NS	NS	NS
	Lesión 1-Lesión 3	*	*	NS	*	NS
	Lesión 2- Lesión 3	NS	*	NS	*	NS
FEMORAL	Lesión 1-Lesión 2	*	NS	NS	NS	NS
	Lesión 1- Lesión 3	NS	NS	NS	*	NS

\* =  $p < 0,05$ ; NS = No significativo

**Correlaciones entre parámetros plasmáticos**

**Activadores e inhibidores de la fibrinolisis:**

El t-PA antigénico plasmático presenta una correlación significativa y positiva con el dímero D en aortas con lesión 1, y una correlación positiva y significativa con los monocitos en carótidas con lesión 2 y 3, y femorales con lesión 3 (tabla 47).

**Tabla 47.-** Estudio de las correlaciones del t-PA antigénico plasmático con otros parámetros plasmáticos.

r	t-PA								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Dímero D	NC	<b>0,9</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Monocitos	NC	NC	NC	<b>0,7</b>	NC	NC	<b>0,5</b>	NC	<b>0,4</b>

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

La u-PA plasmática se correlaciona de forma significativa y positiva con el nº de linfocitos y el % de estos en aortas y femorales con lesión 3 (tabla 48).

**Tabla 48.-** Estudio de las correlaciones de la u-PA antigénica plasmática con otros parámetros plasmáticos.

r	u-PA								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Linfocitos	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>
%Linfocitos	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

El PAI-1 antigénico plasmático se correlaciona de forma significativa y positiva con el t-PA plasmático en aortas y femorales en todos los grados de lesión y en carótidas con lesión 3. También muestra una correlación significativa y negativa con el dímero D en femorales con lesión 3, y positiva con el FPA en carótidas y aortas con lesión 2 (tabla 49).

**Tabla 49.-** Estudio de las correlaciones del PAI antigénico plasmático con otros parámetros plasmáticos.

r	PAI								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
t-PA	NC	<b>0,9</b>	<b>0,6</b>	NC	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	
Dímero D	NC	NC	NC	NC	NC	<b>-0,5</b>	NC	NC	<b>-0,5</b>
FPA	NC	NC	NC	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	NC	NC	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

**DD, FPA y Fibrinógeno:**

El dímero D muestra una correlación significativa y positiva con el fibrinógeno von-Clauss y el fibrinógeno antigénico en carótidas con lesión 3, y con los leucocitos en aortas y femorales con lesión 1 (tabla 50).

**Tabla 50.-** Estudio de las correlaciones del Dímero D plasmático con otros parámetros plasmáticos.

r	Dímero D								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Fibrinógeno Von-Clauss	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>	NC	NC
Fibrinógeno antigénico	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,4</b>	NC	NC
Leucocitos	NC	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Monocitos	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

El fibrinógeno von-Clauss se correlaciona de forma significativa y positiva con el nº y % de monocitos en femorales con lesión 3, y de forma negativa con el % de linfocitos en carótida en todos los grados de lesión y en femorales con lesión 2y 3 (tabla 51).

**Tabla 51.-** Estudio de las correlaciones del Fibrinógeno von-Clauss plasmático con otros parámetros plasmáticos.

r	Fibrinógeno von-Clauss								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Monocitos	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,7</b>
%Monocitos	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,7</b>
%Linfocitos	<b>-0,9</b>	-0,9	NC	<b>-0,8</b>	NC	<b>-0,6</b>	<b>-0,6</b>	NC	<b>-0,5</b>

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

El fibrinógeno antigénico se correlaciona de forma significativa y positiva con el n° de monocitos en femorales con lesión 3 y de forma negativa con el % de linfocitos en carótidas con todos los grados de lesión y en femorales con lesiones 2 y 3 (tabla 52).

**Tabla 52.-** Estudio de las correlaciones del Fibrinógeno antigénico plasmático con otros parámetros plasmáticos.

<b>r</b>	<b>Fibrinógeno antigénico</b>								
	<b>LESIÓN 1</b>			<b>LESIÓN 2</b>			<b>LESIÓN 3</b>		
	<b>CARÓTIDA</b>	<b>AORTA</b>	<b>FEMORAL</b>	<b>CARÓTIDA</b>	<b>AORTA</b>	<b>FEMORAL</b>	<b>CARÓTIDA</b>	<b>AORTA</b>	<b>FEMORAL</b>
Monocitos	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>
%Linfocitos	<b>-0,9</b>	NC	NC	<b>-0,8</b>	NC	<b>-0,5</b>	<b>-0,6</b>	NC	<b>-0,5</b>

*Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.*

**Correlaciones entre parámetros plasmáticos y tisulares**

Las correlaciones entre el PAI-1 plasmático con los parámetros de la pared arterial, se muestran en la tabla 53.

**Tabla 53.-** Estudio de las correlaciones del PAI-1 plasmático con parámetros de la pared arterial, según el sector arterial y el grado de lesión.

r	PAI-1 PLASMÁTICO								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
<b>PAI-1 tisular</b>	NC	<b>0,9</b>	NC	NC	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
<b>Fibrinógeno</b>									
<b>Área</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>Endotelio</b>									
<b>Profundidad</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>Área</b>	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
<b>Adventicia</b>	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
<b>Profundidad</b>	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
<b>Adventicia</b>									
<b>Capacidad</b>									
<b>Generadora de Plasmina</b>	<b>-0,7</b>	<b>-0,9</b>	NC	NC	NC	NC	<b>-0,4</b>	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

Las correlaciones entre el fibrinogeno von-Clauss y los parámetros de la pared arterial, se muestran en la tabla 54.

**Tabla 54.-** Estudio de las correlaciones del fibrinógeno von-Clauss plasmático con los parámetros de la pared arterial, según el sector arterial y el grado de lesión.

r	Fibrinógeno von-Clauss plasmático								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
<b>Fibrinógeno</b>									
<b>Área</b>	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>	NC	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	NC
<b>Endotelio</b>									
<b>Profundidad</b>	NC	NC	NC	NC	<b>0,6</b>	NC	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	NC
<b>Endotelio</b>									
<b>Área</b>	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
<b>Adventicia</b>	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
<b>Profundidad</b>	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
<b>Adventicia</b>									
<b>Capacidad</b>									
<b>Generadora de Plasmina</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Solo se muestra r cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.

El estudio de correlaciones entre el fibrinógeno antigénico plasmático y los parámetros de la pared arterial, se muestran en la tabla 55.

**Tabla 55.-** Estudio de las correlaciones del fibrinógeno antigénico plasmático con los parámetros de la pared arterial, según el sector arterial y el grado de lesión.

r	Fibrinógeno antigénico plasmático								
	LESIÓN 1			LESIÓN 2			LESIÓN 3		
	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA	AORTA	FEMORAL
Fibrinógeno									
Área Endotelio	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>	NC	NC
Profundidad Endotelio	NC	NC	NC	NC	NC	NC	<b>0,5</b>	NC	NC
Área Adventicia	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
Profundidad Adventicia	NC	NC	NC	-	NC	NC	-	NC	NC
Capacidad Generadora de Plasmina	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

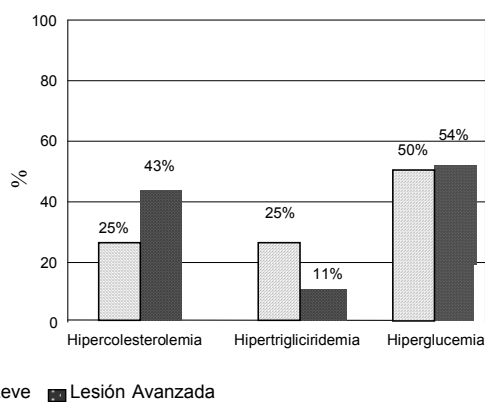
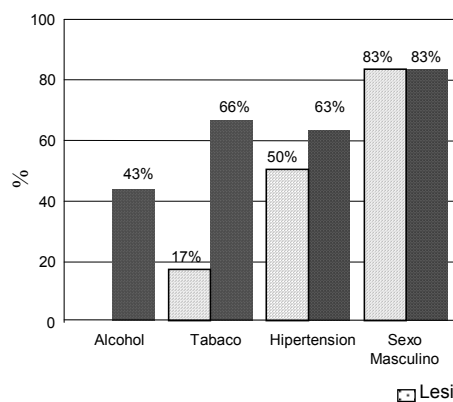
Solo se muestra **r** cuando  $p \leq 0,05$ ; NC = No Correlaciona.



**Factores de riesgo**

**Arteria carótida**

Los pacientes con patología leve a nivel de arteria carótida, presentan una media de edad de 71±7 años, un 83 % son hombres y un 17 % mujeres, no hay pacientes que declaren consumir alcohol (>80 gr/día), un 17% presentan el habito tabaquico, un 50 % son hipertensos. Los niveles de triglicéridos y colesterol son de 125±54 g/dL y de 192±54 g/dL respectivamente. La glucemia es de 121±21 mg/dL. Los pacientes que presentan una lesión avanzada tienen una media de edad de 67±7 años, un 83 % son hombres y un 17 % mujeres, un 43% consume alcohol, un 66 % presentan el habito tabaquico, un 63% son hipertensos. Los niveles de triglicéridos y colesterol son de 128±42 g/dL y de 218±38 g/dL respectivamente. La glucemia es de 132±39mg/dL (figura 123). En las tablas 56 y 57 se observa que el incremento en el consumo de alcohol y de tabaco es significativo estadísticamente. El % de pacientes con niveles elevados de colesterol (>220 g/dL) trigliceridos (>185 g/dL) y glucosa (>120 mg/dL) se representan en la figura 124.



**Figura 123.-** Factores de riesgo en carótida.

**Figura 124.-** Factores de riesgo en carótida.

**Tabla 56.-** Diferencias significativas de los factores de riesgo en carótida en la evolución de la lesión.

Lesión Leve-Lesión Avanzada	
Alcohol	<b>0,04</b>
Tabaco	<b>0,02</b>
Hipertensión	NS
Sexo Masculino	NS

**Tabla 57.-** Diferencias significativas de los factores de riesgo en carótida en la evolución de la lesión.

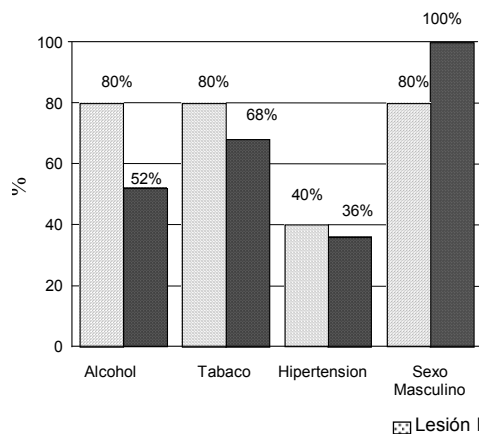
Lesión Leve-Lesión Avanzada	
Colesterol	NS
TAG	NS
Glucemia	NS
Edad	NS

NS = No significativo

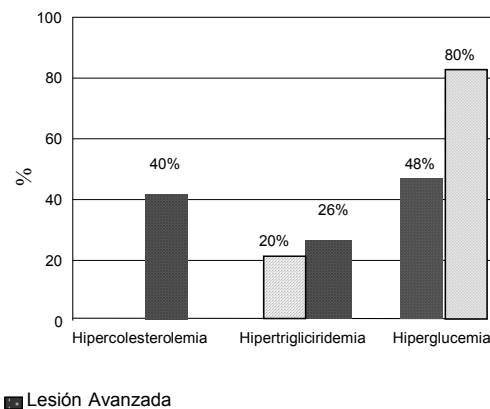
**Arteria aorta**

Los pacientes con patología leve a nivel de arteria aorta, presentan una media de edad de 43±20 años, un 80 % son hombres y un 20 % mujeres, un 80% pacientes declaran consumir alcohol (>80 gr/día), un 80% presentan el habito tabaquico, un 40 % son hipertensos. Los niveles de triglicéridos y colesterol son de 109±95 g/dL y de 144±34 g/dL respectivamente. La glucemia es de 139±53 mg/dL.

Los pacientes que presentan una lesión avanzada tienen una media de edad de 65±9 años, un 100 % son hombres, un 52% consume alcohol, un 68 % presentan el habito tabaquico, un 36% son hipertensos. Los niveles de triglicéridos y colesterol son de 164±94 g/dL y de 212 ± 58 g/dL respectivamente. La glucemia es de 232±140 mg/dL (figuras 125). En las tablas 58 y 59 se observa que el incremento de colesterol, la glucemia, la edad y el sexo masculino es significativo estadísticamente El % de pacientes con niveles elevados de colesterol (>220 g/dL) trigliceridos (>185 g/dL) y glucosa (>120 mg/dL) se representan en la figura 126.



**Figura 125.-** Factores de riesgo en aorta.



**Figura 126.-** Factores de riesgo en aorta.

**Tabla 58.-** Diferencias significativas de los factores de riesgo en aorta en la evolución de la lesión. Estudió estadístico por Chi-Square.

Lesión Leve-Lesión Avanzada	
Alcohol	NS
Tabaco	NS
Hipertensión	NS
Sexo Masculino	<b>0,02</b>

**Tabla 59.-** Diferencias significativas de los factores de riesgo en aorta en la evolución de la lesión. Estudió estadístico por t-Student.

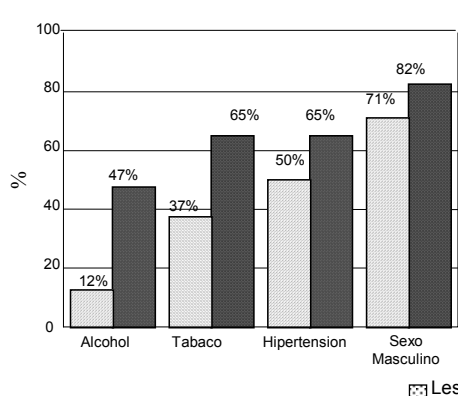
Lesión Leve-Lesión Avanzada	
Colesterol	<b>0,07</b>
TAG	NS
Glucemia	<b>0,01</b>
Edad	<b>0,000</b>

NS = No significativo

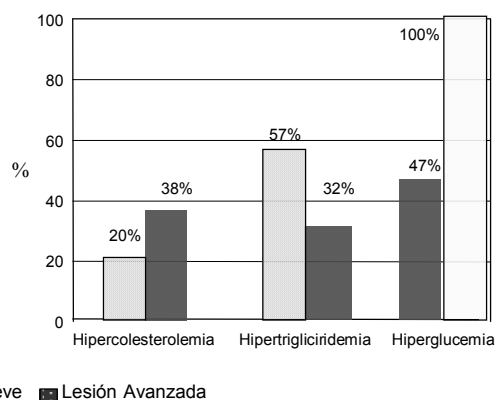
**Arteria femoral**

Los pacientes con patología leve a nivel de arteria femoral, presentan una media de edad de 68±15 años, un 71 % son hombres y un 29 % mujeres, un 12% de pacientes declaran consumir alcohol (>80 mg/día), un 37% presentan el habito tabaquico, un 50 % son hipertensos. Los niveles de triglicéridos y colesterol son de 174±98 g/dL y de 201±56 g/dL respectivamente. La glucemia es de 150±63mg/dL.

Los pacientes que presentan una lesión avanzada tienen una media de edad de 68±12 años, un 82 % son hombres y un 18 % mujeres, un 47% consume alcohol, un 65 % presentan el habito tabaquico, un 65% son hipertensos. Los niveles de triglicéridos y colesterol son de 182±143 g/dL y de 199±57 g/dL respectivamente. La glucemia es de 220±142mg/dL (figuras 127). En las tablas 60 y 61 se observa que el incremento en el consumo de alcohol y la glucemia son significativos estadísticamente. El % de pacientes con niveles elevados de colesterol (>220 g/dL) trigliceridos (>185 g/dL) y glucosa (>120 mg/dL) se representan en la figura 128.



**Figura 127.-** Factores de riesgo en femoral.



**Figura 128.-** Factores de riesgo en femoral.

**Tabla 60.-** Diferencias significativas de los factores de riesgo en femoral en la evolución de la lesión. Estudió estadístico por Chi-Square.

Lesión Leve-Lesión Avanzada	
Alcohol	<b>0,05</b>
Tabaco	NS
Hipertensión	NS
Sexo Masculino	NS

**Tabla 61.-** Diferencias significativas de los factores de riesgo en femoral en la evolución de la lesión. Estudió estadístico por Chi-Square.

Lesión Leve-Lesión Avanzada	
Colesterol	NS
TAG	NS
Glucemia	<b>0,02</b>
Edad	NS

NS = No significativo

**Diferencias entre los factores de riesgo de carótida, aorta y femoral**

En las tablas 62 y 63, se muestra el estudio estadístico de los factores de riesgo entre los tres sectores estudiados.

**Tabla 62.-** Diferencias estadísticas de los factores de riesgo en la lesión inicial de carótida aorta y femoral. Estudio estadístico por Chi-Square para todos los parámetros excepto la edad (ANOVA).

Lesión inicial	Hipercolesterolemia	Tabaco	Hipertensión	Alcohol	Hiperglucemia	Hipertrigliciridemia	Edad
Carótida-Aorta	+/0	<b>0,01</b>	NS	0/+++	NS	NS	<b>0,01</b>
Carótida-Femoral	NS	<b>0,01</b>	NS	0/+	NS	NS	NS
Aorta-Femoral	0/+	<b>0,01</b>	NS	<b>0,005</b>	NS	NS	<b>0,01</b>

NS = No significativo





**Tabla 63.-** Diferencias estadísticas de los factores de riesgo en la lesión avanzada de carótida aorta y femoral. Estudio estadístico por Chi-Square para todos los parámetros excepto la edad (ANOVA).

Lesión avanzada	Hipercolesterolemia	Tabaco	Hipertensión	Alcohol	Hiperglucemia	Hipertrigliciridemia	Edad
Carótida-Aorta	NS	NS	NS	NS	<b>0,05</b>	NS	NS
Carótida-Femoral	NS	NS	NS	NS	<b>0,05</b>	NS	NS
Aorta-Femoral	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS = No significativo

**Diferencias entre carótida, aorta y femoral**

En la tabla 64 se representan todos los parámetros de los tres sectores arteriales estudiados, y se resaltan en color las diferencias estadísticas significativas entre ellos.

-  Diferencias significativas entre carótida lesión 1 y aorta y/o femoral con lesión 1.
-  Diferencias significativas entre carótida lesión 3 y aorta y/o femoral lesión 3.
-  Diferencias significativas entre aorta lesión 1 y femoral lesión 1.
-  Diferencias significativas entre aorta lesión 3 y femoral lesión 3.

- 0 No aparece ningún caso.
- + 30-50%.
- ++ 50-75%.
- +++ 75-100%.
- Carótida sin adventicia.

**Tabla 64.-** Diferencias entre parámetros estudiados de los tres sectores arteriales en las lesiones 1 y 3.

Parámetros	Carótida		Aorta		Femoral	
	Lesión 1	Lesión 3	Lesión 1	Lesión 3	Lesión 1	Lesión 3
<b>TEJIDO</b>						
Endotelio	+	+	+	+	+	+
Adventicia	+	-	++	+++	+	++
CGP	+++	+	+	++	+	++
t-PA	++	+	++	+++	++	+++
u-PA	+	++	+	++	+	++
PAI	+	++++	+++	+++	++	+++
MMP-9 inactiva	+++	++	++	+++	++	+++
MMP-9 activa	0	++	0	++	0	0
MMP-2 inactiva	+++	+	+	+	+	+
MMP-2 activa	-	+++	+++	+++	++	++
Area fibrinogeno endotelio	+	++	+	++	++	++
Profundidad fibrinogeno endotelio	+	++	+	++	+	++
Area fibrinogeno adventicia	+++	-	+++	++	++	++
Profundidad fibrinogeno adventicia	+++	-	+++	++	++	++
<b>PLASMA</b>						
t-PA	+	+	+	+++	+	+
u-PA	+	+	+	+	+	+
PAI	+++	++	++	++	+++	++
Dimero D	+	++	++	++	+++	+++
FPA	+++	++	+++	+++	+++	++
Fibrinogeno VC	++	+++	++	+++	++	+++
Fibrinogeno AG	+	++	++	++	++	++
Leucocitos	+	++	+++	++	+++	++
Linfocitos	++	++	+	++	+	++
Monocitos	+	+	++	++	++	++
<b>FACTORES DE RIESGO</b>						
Colesterol	+	++	0	0	+	++
Tabaco	+	+++	+++	+++	++	+++
Hipertensión	++	++	++	++	++	++
Alcohol	0	+++	+++	+++	+	++
Glucemia	++	++	++	+++	++	+++
TAG	+	+	+	+	++	+
Edad	+++	+++	+	+++	+++	+++