

MATERIAL Y MÉTODOS



12.1) ANIMALES Y DIETA

Se han utilizado 100 pollos de 21 días de edad de la Raza Leghorn progenitores Broilers.

Hemos empleado dos clases de dietas: A y B.

- Dieta A o normal. Consiste en una dieta simple para engorde-puesta constituida por cereales (maíz y cebada) y harina de soja, variándose su composición cuantitativa en función de su edad.

La proteína bruta de la dieta se disminuyó conforme avanzaba su edad; por el contrario, el extracto etéreo se incrementó paulatinamente. La humedad del pienso se mantuvo constante. El aporte de cenizas fue aumentado progresivamente, acrecentando a su vez la ingesta de calcio y fósforo de la dieta.

Esta mezcla ya iba enriquecida con vitaminas y minerales a razón de 4 Kg/TM de pienso para progenitores Broilers, cuya composición por Kg es: Vitamina A, 3.000.000 U; D₃, 750.000 U; E, 12.500 mg; B₁, 1 gr; B₂, 3,75 gr; B₁₂, 12,5 mg; B₆, 1,25 gr; ácido pantoténico, 5 gr; ácido nicotínico, 12,5 gr; biotina, 75 mg; K₃, 1,5 gr; ácido fólico, 750 mg; manganeso, 30 gr; zinc, 27,5 gr; hierro, 12,5 gr; cobre, 3,75 gr; yodo, 750 mg; selenio, 75 mg; cobalto, 150 mg; molibdeno, 250 mg; excipiente c.s.p., 1000 gr.

- Dieta B hiperlipémica. Pienso estándar más colesterol puro (2% del total de la mezcla) y 20% del total de aceites saturados (aceite de palma crudo).

Utilizando la sustancia en polvo original, la medicación fue preparada semanalmente para su administración oral. Los animales eran pesados semanalmente y tras calcular el peso medio de cada grupo, se preparaba la disolución de atorvastatina adecuada para administrar 3 mg/kg/día de esta sustancia durante el periodo comprendido hasta la siguiente pesada.

La atorvastatina se administró en una sola dosis diaria, diluída en 1 cc de polietilenglicol hasta la 4ª semana de experimentación, y a partir de dicha semana en 2 cc debido a la mayor cantidad de fármaco necesario. La forma de administrarlo era individualmente por vía oral, con una jeringa, a las 8 horas de la mañana, abriéndole directamente el pico a cada pollo y vertiendo todo el contenido en su interior para asegurar la toma completa del fármaco a la dosis requerida.

Para minimizar el efecto placebo en los resultados se administraba la misma cantidad de polietilenglicol a los grupos hiperlipémico y control en las mismas condiciones que al grupo de atorvastatina.

12.2) ETAPAS Y GRUPOS DE ESTUDIO

Se utilizaron 100 pollos de la raza Leghorn, aislados en una habitación con temperatura controlada (dependencias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia).

Previamente a los 7 días se les vacunó de Bronquitis, y a los 14 días de Gumboro y peste.

A los 21 días fueron divididos al azar en dos grupos de 20 pollos en el grupo A y 80 pollos en el grupo B, marcados con una anilla de distinto color según el grupo, en la pata derecha, y grabadas con un número identificativo. A partir de este momento, en el que comienza la fase de intervención, los animales son colocados en compartimentos y sometidos a distintos regímenes de alimentación y medicación en su caso.

Los grupos se denominaron:

Grupo A: Grupo control normal, compuesto por 20 animales. Recibieron una dieta normal durante seis meses.

Grupo B: Grupo control hiperlipémico, compuesto por 80 animales, que fueron sometidos a una primera fase de inducción del hígado graso mediante la administración de dieta hiperlipémica compuesta por pienso estándar más colesterol puro (2% del total de la mezcla) y 20% de total de aceites saturados (aceite de palma crudo) durante tres meses.

A los tres meses de iniciada la dieta, se valoró si se había logrado inducir la lesión hepática en 10 animales del grupo B cogidos al azar, frente a 10 animales sanos del grupo A. Posteriormente el grupo A recibió una dieta estándar durante tres meses más y el grupo B fue dividido en cuatro grupos al azar:

- **Grupo B:** Grupo control hiperlipémico, que recibió una segunda fase de mantenimiento de dieta grasa durante tres meses (n= 10).
- **Grupo C:** Grupo de regresión sólo con dieta, fueron sometidos a una segunda fase de tres meses en los que se le sustituyó la dieta grasa por otra normal (n = 20).
- **Grupo D:** Grupo de regresión y administración de atorvastatina al que en una segunda fase se le sustituyó la dieta grasa por otra normal y se le administró atorvastatina durante los siguientes tres meses (n = 20).
- **Grupo E:** Grupo de progresión y administración de atorvastatina al que en una segunda fase se le mantuvo la dieta grasa y se le administró atorvastatina durante tres meses (n = 20) (Fig. 14).

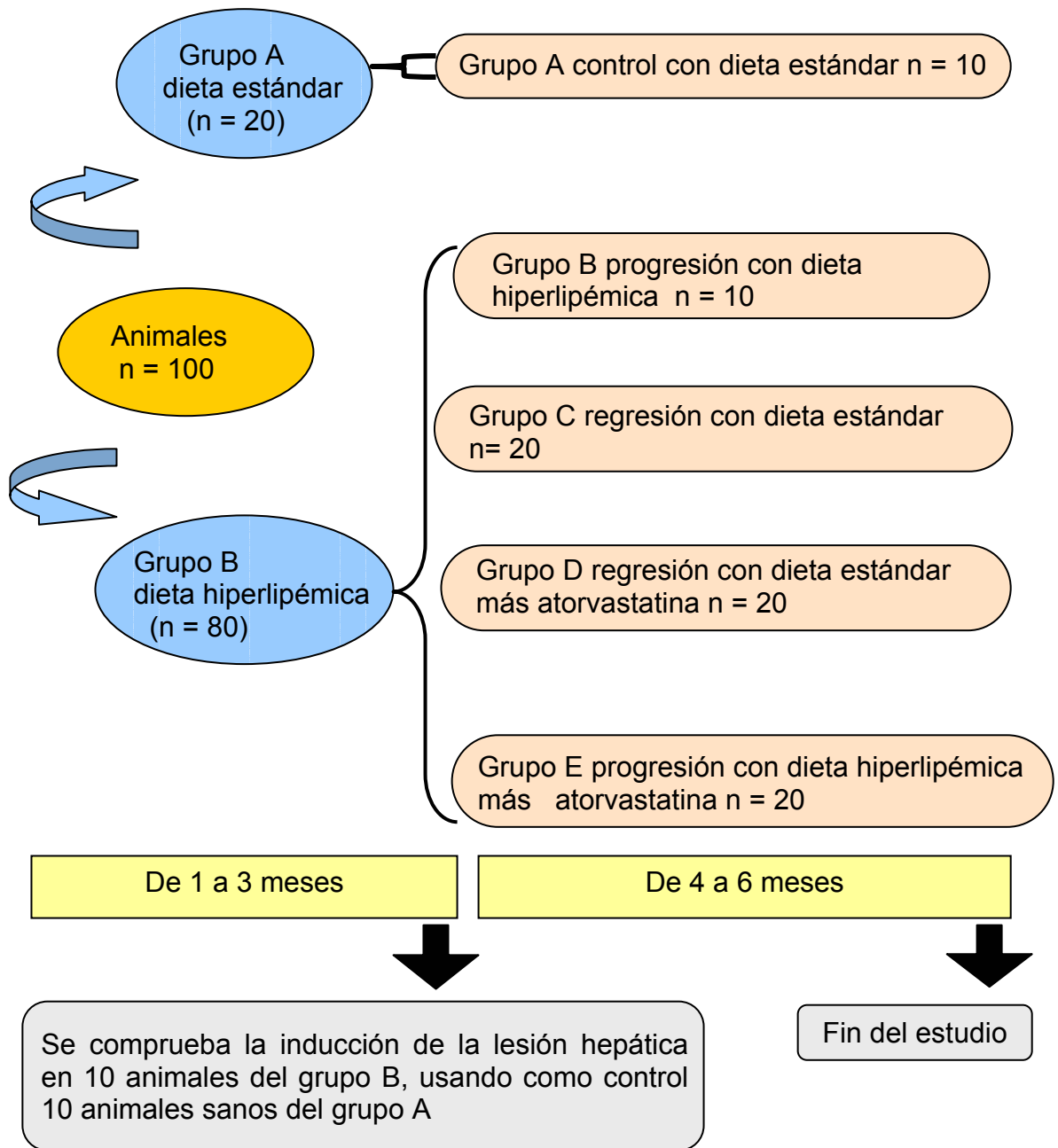


Fig. 14 Representación esquemática de los grupos de estudio

12.3) RECOGIDA DE MUESTRAS

Las analíticas en plasma y el estudio del hígado de los animales se realizaron a los seis meses de haber iniciado el experimento. Previamente los animales permanecían doce horas en ayunas. Se les pesaba y extraía la sangre necesaria para las determinaciones de la bioquímica de la vena axilar y se procedía a centrifugar a 3000 r.p.m. durante 20 minutos, así se extraía el plasma necesario para las determinaciones analíticas.

Tras la obtención de las muestras de sangre se les administraba una dosis de 150 a 200 mg de pentobarbital intraperitoneal para conseguir una rápida anestesia y un sueño profundo que nos permitiera realizar la disección.

Mediante una incisión longitudinal desde el cuello hasta la cloaca se abría longitudinalmente el peritoneo y el esternón. Posteriormente se seccionaba la traquea para producir la parada cardiorrespiratoria y el esófago. Una vez realizado esto se liberaba el hígado y tras su extracción se pesaba y fotografiaba en idénticas condiciones de luz para poder realizar una valoración de sus características macroscópicas.

Todo el proceso de extracción de sangre, anestesia, disección y fijación del material no excedía de 30 minutos.

Tanto las jaulas de los animales como los procedimientos de sacrificio cumplían las normas en materia de bienestar y experimentación animal de acuerdo a la legislación vigente y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

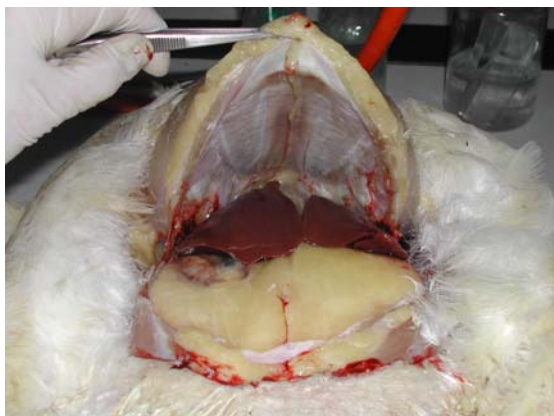


Fig.15 Primeros pasos de disección y acceso al hígado

12.4) VARIABLES OBJETO DE ESTUDIO

a) Parámetros bioquímicos.

- Perfil lipídico, se ha cuantificado el colesterol total sérico, el colesterol HDL, el colesterol LDL y los triglicéridos.
- Enzimas hepáticas, se ha determinado la aspartato aminotransferasa (AST), la alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), lactato deshidrogenasa (LDH), γ - glutamil transpeptidasa (γ GTP).
- Reactantes de fase aguda: proteína C reactiva (PCR) y ferritina.
- Hierro y albúmina.

b) Parámetros morfológicos.

- Análisis macroscópico del hígado.
- Caracterización histológica y valoración morfológica cuantitativa por análisis de imagen
- Valoración inmunocitoquímica.
- Valoración ultraestructural mediante microscopia electrónica.

12.5) TÉCNICAS ANALÍTICAS EN PLASMA

La PCR, albúmina, hierro, ferritina, lípidos y enzimas hepáticos (LDH, AST, ALT, FA) fueron cuantificados por un test color enzimático mediante un procesador automático Hitachi 717 utilizando reactivos de la casa Boehringer Mannheim.

El colesterol se determinó mediante el test-color enzimático por el método CHOD-PAP. Los triglicéridos se determinaron por reacción colorimétrica mediante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y determinación enzimática subsiguiente del glicerol formado. El colesterol HDL se determinó por método colorimétrico similar al colesterol. El colesterol LDL

fue determinado mediante la fórmula de Friedwald, siendo $cLDL = CT - cHDL - (Triglicéridos / 5)$.

Como posible disminución del error de la fórmula también se calculó el colesterol no HDL, siendo $Col\ no\ HDL = CT - CHDL$



Fig. 16. Extracción del suero por centrifugación

12.6) ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL HIGADO

Tras la extracción del hígado se pesaba para hallar la relación con el peso corporal total. Después, se fotografiaba esta víscera en idénticas condiciones de luz, para poder realizar una valoración de sus características macroscópicas. Posteriormente se clasificaron las fotografías atendiendo a los siguientes criterios de evaluación macroscópica: color, rugosidad de la superficie y peso del hígado. Ello nos permitía diferenciar cuatro grados de afectación macroscópica: Grado 0 o normal: corresponde a un hígado de tamaño pequeño, de superficie lisa, brillante y color rojo vino intenso; en el grado I o leve: el hígado es de tonalidad más pálida, superficie ligeramente más granular y menos brillante que el anterior; el grado II o moderado engloba a un hígado de color marrón oscuro mate, de tamaño aumentado con superficie rugosa; y

con el grado III o grave designamos un hígado de tonalidad ocre mate, sin brillo, tumefacto en cuya superficie se distinguen estrías amarillentas (Fig.17). Cuatro observadores independientes y método ciego realizaron la clasificación de cada muestra en los grados de lesión de referencia definidos previamente. Con la totalidad de las observaciones (n = 40 por grupo experimental), se calculó el porcentaje correspondiente a cada grado de lesión, dentro de cada uno de los grupos experimentales y se realizó el análisis estadístico.

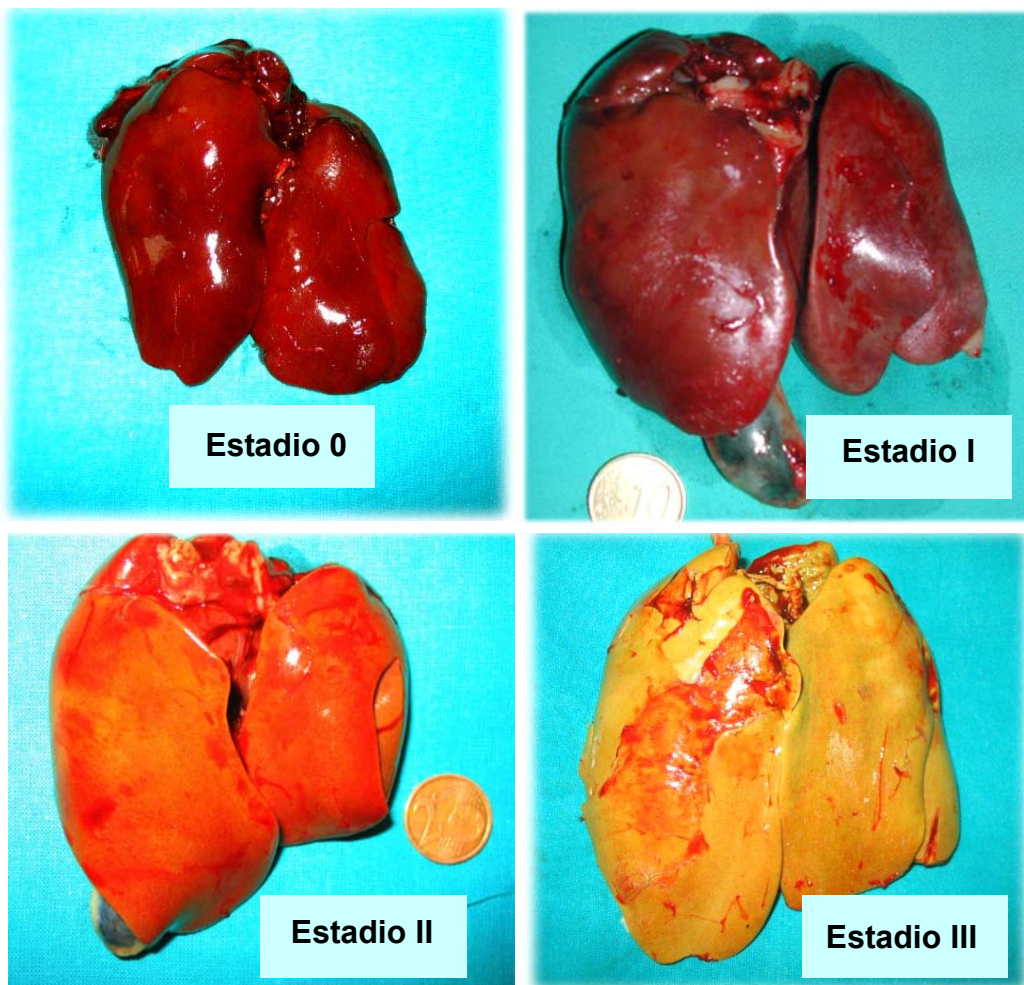


Fig. 17. Estadios de referencia de la valoración macroscópica

12.7) CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA. VALORACIÓN MORFOLÓGICA CUANTITATIVA POR ANÁLISIS DE IMAGEN

Una muestra de hígado por animal tomada siempre de la misma región, borde interno del lóbulo hepático izquierdo, se fijó en formol 10 % tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS) y se procesó para su inclusión en parafina; Se obtuvieron cortes de 5µm, que fueron teñidos con Verhoeff-van Gieson para valorar la presencia de fibrosis y tinción con hematoxilina-eosina con la que se realizó una descripción histológica de los hígados de cada animal. Destacando la presencia de esteatosis micro o macro vacuolar, su distribución en el parénquima hepático, la presencia de infiltrado inflamatorio, la existencia o no de fibrosis o cambios arquitecturales y la existencia de las lesiones hepatocelulares características en la EGHNA tales como balonización, cuerpos acidófilos, macrófagos pigmentados, megamitocondrias, hialina de Mallory o núcleos glucogenados (características todas ellas de la esteatosis hepática).

Para cuantificar la esteatosis y la inflamación utilizamos un equipo de análisis de imagen conectado a un microscopio de luz (Axioskop, Zeiss) y una cámara de vídeo Sony DXC 131-AP, empleando el software MIP 4.5. (Microm Image Processing Software, CID, Consulting Image Digital, Barcelona)

El depósito graso se evalúa de forma semicuantitativa valorando el porcentaje de depósito graso en cada campo por observación directa al microscopio y de forma cuantitativa midiendo este depósito con ayuda de un equipo de análisis de imagen a nivel de la zona centrolobulillar y lobulillar y se describe el tipo de esteatosis predominante contabilizando el número de hepatocitos normales y afectados por macro- y microvacuolas. Para la inflamación se contabiliza el número de focos en campos de observación directa al microscopio, se mide el diámetro máximo y superficie del foco inflamatorio y se valora la densidad inflamatoria por análisis de imagen. Se señala la presencia o ausencia de lipogranulomas, microgranulomas y de infiltración portal. Para la lesión

hepatocelular se considera la frecuencia de hepatocitos balonizados y la presencia de cuerpos acidófilos, macrófagos pigmentados, megamitocondrias, hialina de Mallory y núcleos glucogenados.

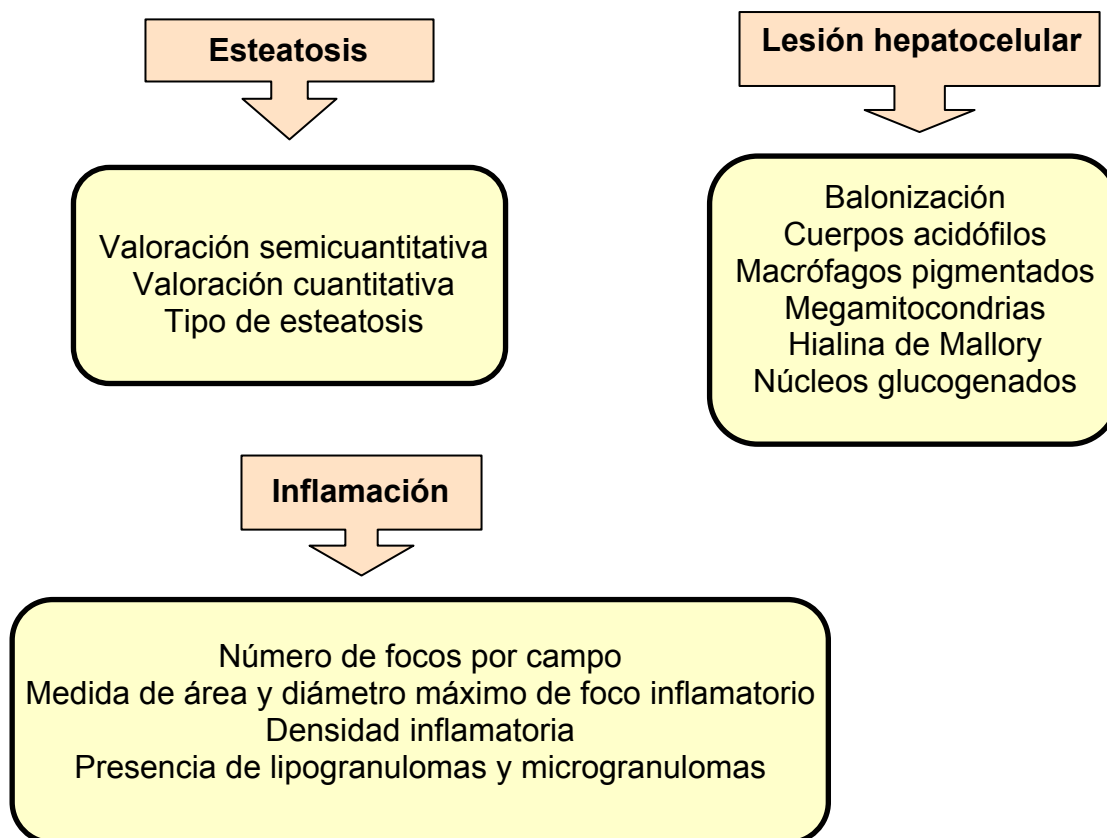


Fig. 18. Resumen de los parámetros histológicos analizados

12.7.1) VALORACIÓN DE LA ESTEATOSIS

A) Evaluación morfológica semicuantitativa

Se evaluó el depósito graso en 10 campos por observación directa al microscopio óptico a 400x en cada uno de los animales, valorando un total de 100 campos por grupo experimental. Los hígados fueron clasificados en cuatro grados de lesión atendiendo al contenido de depósito graso existente en la muestra, según la clasificación histológica de Brunt y col. (1999) adaptada por Angulo (2002) dando la siguiente asignación de puntuación: 0 ó normal, si no hay depósito graso o este es inferior al 5%; 1 o leve, si el contenido graso es inferior al 33 %; 2 o

moderado, si el contenido graso oscila entre un 33-66 %; y 3 o grave, si el contenido de grasa es mayor al 66 %. Finalmente, se calculó el porcentaje de cada grupo experimental que correspondía a cada grado de lesión y se realizó el análisis estadístico.

B) Evaluación morfométrica cuantitativa

Para un análisis más detallado del depósito graso se cuantificó mediante análisis de imagen el porcentaje de área de esteatosis en el parénquima hepático: zona lobulillar y centrolobulillar en 10 campos de observación (áreas cuadradas de 134 μm de lado) obteniendo 100 medidas por grupo experimental y zona (Fig. 19). Se calculó la media y SEM de cada grupo y zona realizándose los test diagnósticos para la comparación entre los grupos y las zonas mediante el análisis estadístico.

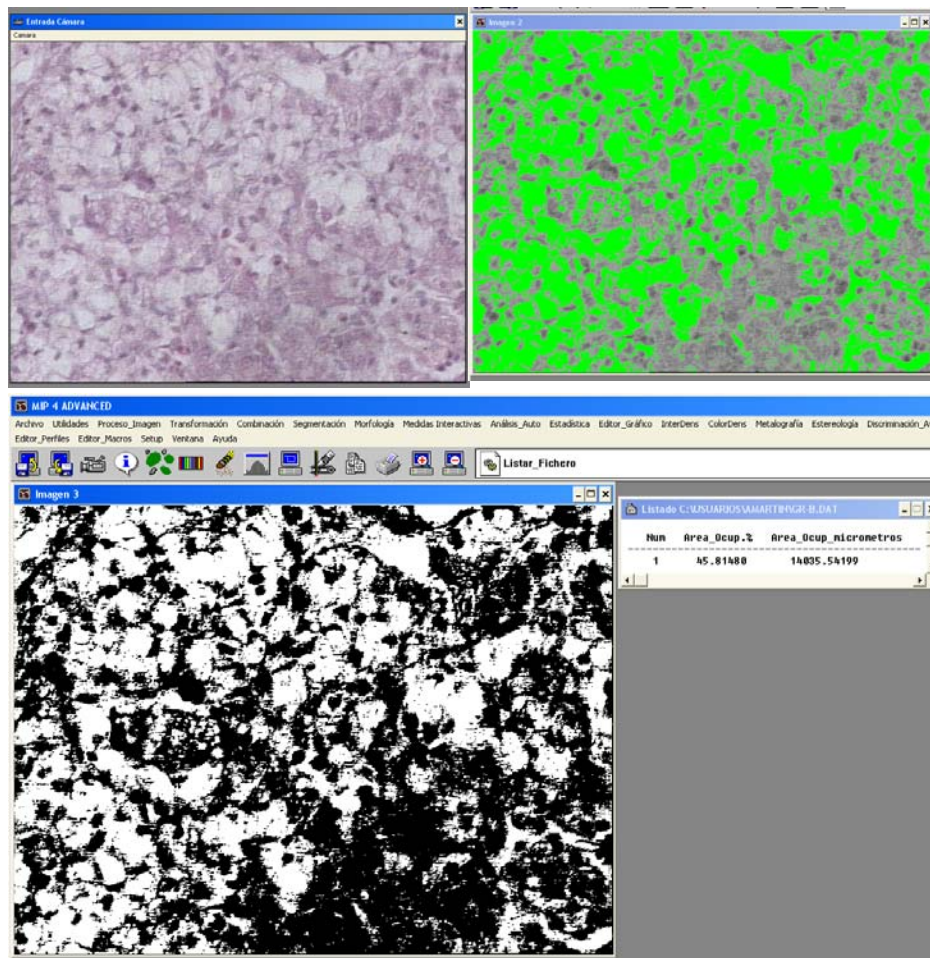


Fig. 19 Cuantificación del porcentaje de grasa mediante análisis de imagen.

C) Descripción y clasificación del tipo de esteatosis

Se realizó una descripción del tipo de esteatosis, diferenciando la esteatosis macrovacuolar y microvacuolar. La primera aparece como una gran vacuola dentro del citoplasma del hepatocito desplazando el núcleo a la periferia, mientras que en la esteatosis microvacuolar el depósito graso se localiza en forma de pequeñas vacuolas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos sin causar desplazamiento del núcleo. Para ello se evaluaron 100 hepatocitos de cada animal, 1000 por grupo experimental. Cada hepatocito se clasificó como no afectado o afectado con presencia de microvacuolas o macrovacuolas (Fig. 20) Finalmente obtuvimos un valor medio y SEM para cada grupo.

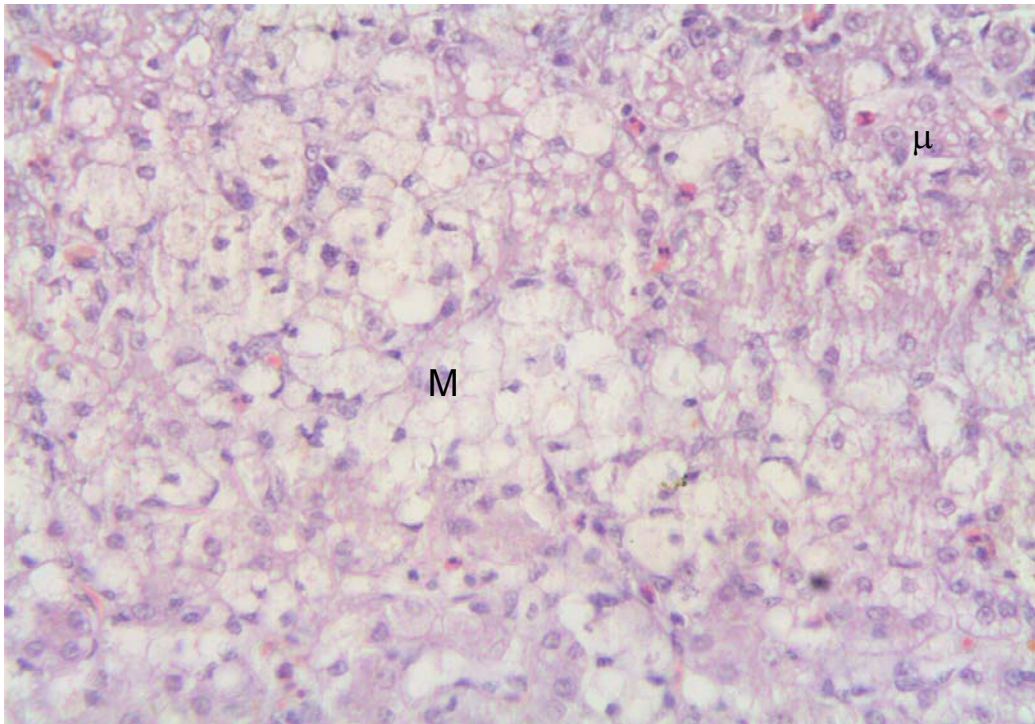


Fig. 20 Tipos de esteatosis micro (μ) y macrovacuolar (M)

12.7.2) VALORACIÓN DE LA INFLAMACIÓN

A) Contaje del número de focos inflamatorios

Se contabilizó el número de focos por observación directa al microscopio en 10 campos de observación por animal 200x, realizando un total de 100 observaciones por grupo experimental (Fig. 21). Este es un parámetro que se incluye tanto en el sistema de gradación de la EHNA de Brunt (1999) como en el NAS (NAFLD Activity Store) (Kleiner y col., 2005). A cada foco se le asignó un valor: 1 si el infiltrado era poco denso, 2 si era moderadamente denso y 3 si este foco era muy denso.

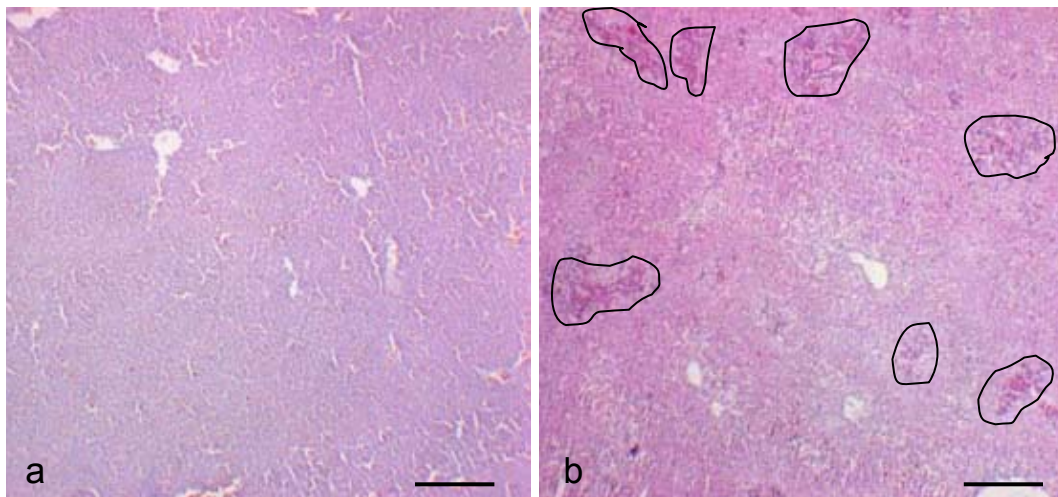


Fig. 21. Campos de observación de valoración de número de focos, a: grupo A, no se observan focos; b: grupo B, 7 focos inflamatorios. Barra: 250 μm .

B) Evaluación morfométrica cuantitativa de los focos inflamatorios

La cuantificación se realizó en un equipo de análisis de imagen conectado a un microscopio de luz (Axioskop, Zeiss) y una cámara de video Sony DXC 151-AP, empleando el software MIP4.5 (Microm Image Processing Software, CID, Consulting Image Digital, Barcelona). Se valoró el área y diámetro máximo de los focos inflamatorios en 10 campos cuadrados de

267 μm de lado de observación por animal, realizando un total de 100 observaciones por grupo experimental (Fig. 22).

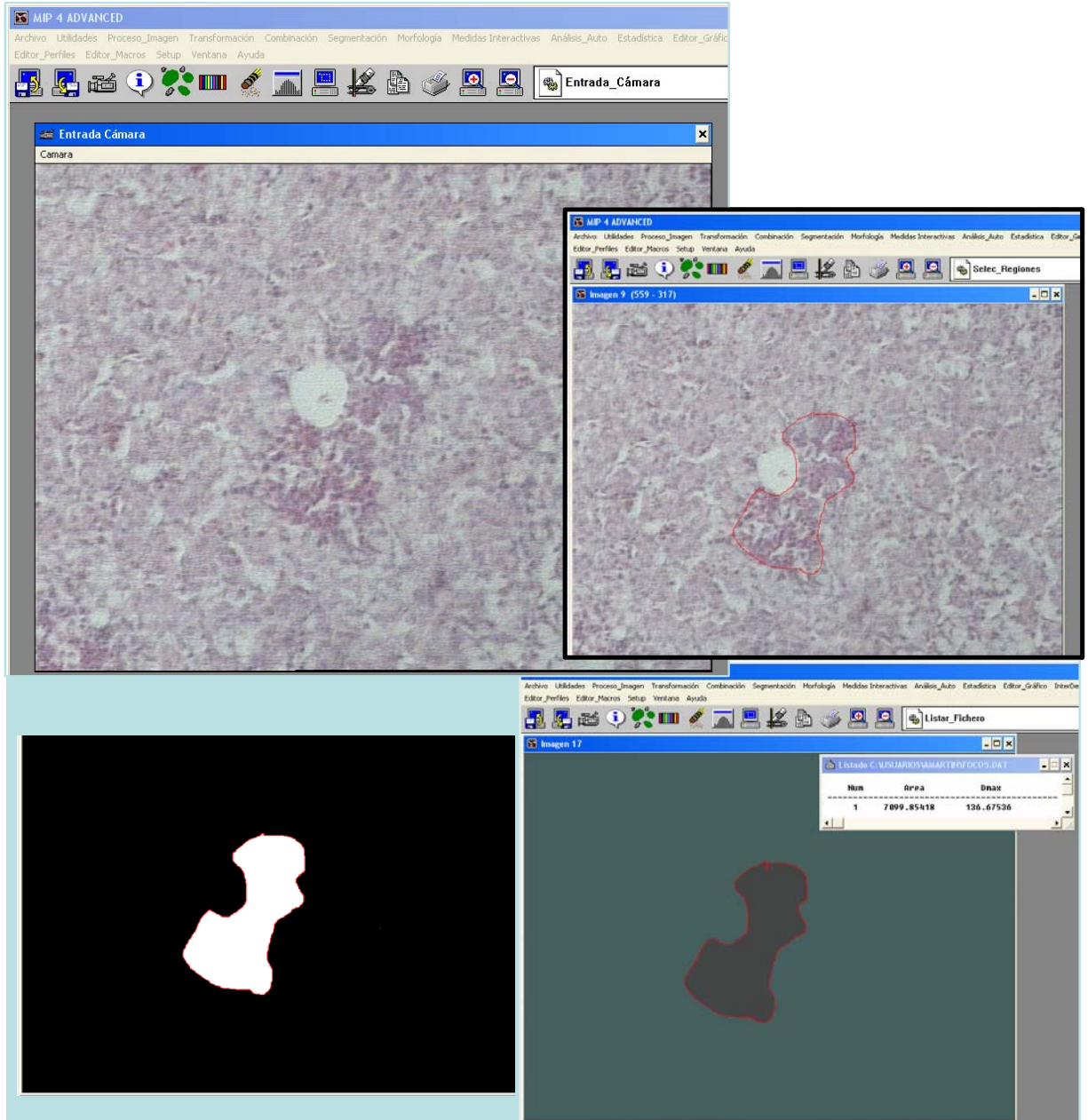


Fig. 22. Proceso de selección y medida del área y diámetro de los focos inflamatorios mediante análisis de imagen

C) Valoración de la densidad inflamatoria

La densidad inflamatoria se obtuvo segmentando por análisis de imagen las áreas correspondientes a células migratorias y dividiendo por el área del campo de referencia. Se valoraron 5 campos cuadrados de 267 μm de lado por animal. Este parámetro es más preciso y detallado del grado de inflamación que el número de focos de forma aislada propuesto en los sistemas de puntuación anteriores, por lo que lo introducimos en nuestra valoración del grado inflamatorio (Fig. 23)

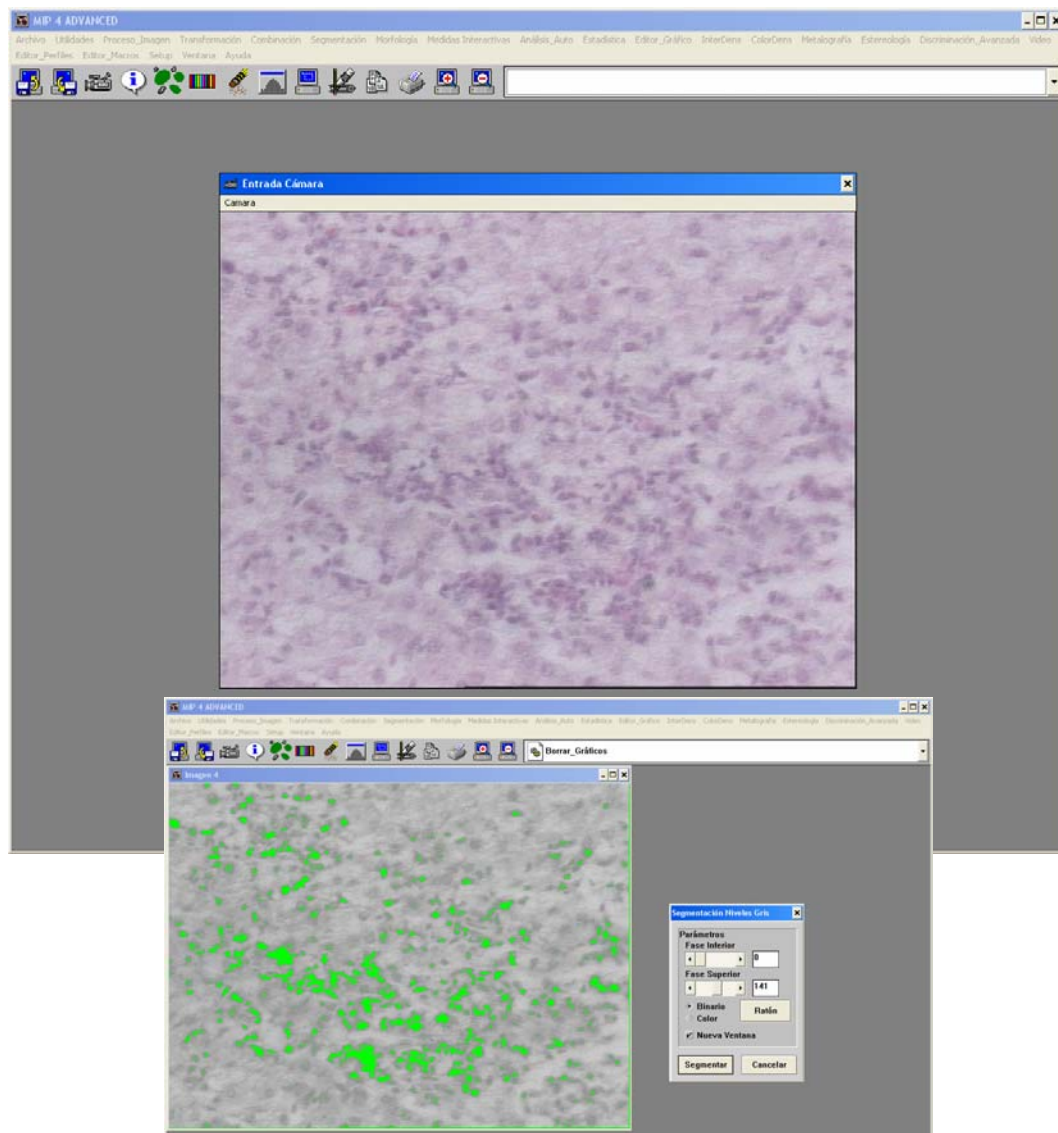


Fig. 23. Proceso de valoración de la densidad de células del foco inflamatorio, mediante análisis de imagen.

D) Presencia de lipogranulomas y microgranuloma

Se definen como una acumulación de histiocitos y de células mononucleares entorno a una célula parenquimatosa con una gran vacuola grasa, es una lesión usual pero no necesaria para el diagnóstico de la EHNA. Se le asigna un valor de 0 si no hay ó 1 si están presentes, siguiendo la clasificación de Kleiners y col., (2005).

12.7.3) VALORACIÓN DE LA LESIÓN HEPATOCELULAR

Siguiendo el sistema de puntuación histológica propuesto para la EGHNA se le asigna un valor de 0 si no existen o es muy poco frecuente y de 1 si su presencia es manifiesta. Se valoraron 5 campos de observación 400x por cada animal buscando las siguientes características.

- **Balonización**: Corresponde a hepatocitos con aumento del volumen, aspecto hinchado, con citoplasma pálido en su mayor parte y condensado en la región perinuclear. Se considera una lesión necesaria para el diagnóstico de EHNA. Esta característica histológica se puntúa de forma diferente, según su presencia en 0 si no hay, 1 si es poco frecuente ó 2 si son muy numerosos.
- **Cuerpos acidófilos** que resultan de la muerte apoptótica de la célula y se ven como pequeños fragmentos de citoplasma refringente eosinófilo en el sinusoide. Lesión usual pero no necesaria para el diagnóstico
- **Macrófagos pigmentados** que corresponden a inclusiones lamelares producidas por el depósito de fosfolípidos dentro de los lisosomas.
- **Megamitocondrias** pueden estar presentes pero no son necesarias para el diagnóstico. Se ven como inclusiones intensamente eosinófilas, redondas o en forma de puro, de tamaño variable que puede igualar al del núcleo.

- **Hialina de Mallory** puede estar presente pero no es necesaria para el diagnóstico. Aparece como una inclusión intracelular en los hepatocitos que a menudo son pálidos y están hinchados. En su forma típica es una masa irregular intensamente eosinófila que corresponde a acumulaciones de filamentos de citoqueratina agregados.
- **Núcleos glucogenados** son usuales pero no necesarios para el diagnóstico. Núcleos hepatocelulares que aparecen vacuolados con contenido en glucógeno.

12.7.4) VALORACIÓN DEL ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD (NAS)

El índice de la actividad de la EGHNA o “NAFLD Activity Score” (NAS) viene definido por la suma de la esteatosis, inflamación lobular y de la balonización. A cada grado de afectación se le asigna un valor que se refleja en la tabla 12. Este índice varía en un rango de 0 a 8. Los casos puntuados de 0 a 2 no son considerados como diagnóstico de esteatohepatitis.

Tabla 12. Valoración del índice de actividad de la EGHNA (NAS)

Característica	Definición	Puntuación
Esteatosis	<5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
Inflamación	No focos	0
	<2 focos por campo 200x	1
	2-4 focos por campo 200x	2

	>4 focos por campo 200x	3
Balonización	Ninguno	0
	Pocas células balonizadas	1
	Muchas células balonizadas	2

Hemos aplicado el NAS a cada una de nuestras muestras tal y como se expone. Hemos obtenido dos valores en primer lugar considerando la evaluación semicuantitativa del depósito graso y luego considerando la medida morfométrica cuantitativa por análisis de imagen tanto de esteatosis como de infiltrado inflamatorio y excluyendo el número de focos.

12.8) TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS

Se realizaron técnicas inmunocitoquímicas para determinar la presencia de matriz de la metaloproteinasa-9 (MMP9) e inhibidor de la matriz de la metaloproteinasa 3 (IMP3).

Tras desparafinar e hidratar, se procede al bloqueo de la peroxidasa endógena con 0.3 % H₂O₂ en PBS. Tras lavados en PBS, las secciones preparadas para incubar con anticuerpos contra MMP9 e IMP3 fueron sometidas al pretratamiento de desenmascaramiento de antígenos manteniéndolas en Tris 10 mmol/l edta 1 mmol/l pH9, durante 20 min a punto de ebullición. Tras dejar enfriar a temperatura ambiente, todas las secciones fueron incubadas en cámara húmeda con suero normal de conejo (NRS, 1:20), 20 min, posteriormente se depositó el correspondiente anticuerpo primario, dejándose toda la noche a 4°C. Tras lavados en PBS, se deja incubar en la segunda capa anticuerpo policlonal de conejo conjugado con peroxidasa, durante 1h a temperatura ambiente. Tras lavar en PBS se procede al revelado de la peroxidasa con 0.05% 3,3'diaminobencidina (DAB) y 0.015% H₂O₂ en PBS durante 7 min. Se

lavan en agua, se contrastan ligeramente con hematoxilina, se deshidratan aclaran y montan en DPX. Los anticuerpos fueron diluidos en PBS con 1% albúmina de suero bovino (BSA) (tabla 13).

Controles: la especificidad de la técnica se realizó por sustitución de la primera capa por PBS en secciones seriadas de las anteriores y teñidas conjuntamente al resto de secciones. No se obtuvo ningún marcaje y estos son los controles de la técnica propiamente dichos.

Hemos empleado los siguientes anticuerpos primarios contra:

- Matriz de la metaloproteinasa 9 (MMP9) Es una gelatinasa y está implicada en la degradación de la matriz extracelular tiene afinidad entre otros por colágeno, gelatina y fibronectina.
- Inhibidor de la matriz de metaloproteasa 3 (IMP3) Inhibe la acción de la metaloproteasa 3, una estromalisina con afinidad para colágeno, gelatina.

Tabla 13. Características de los anticuerpos empleados.

Anticuerpo Primario	Dilución de trabajo	Generado en	Casa comercial
Anti-MMP9	1:40	ratón	Novocastra
Anti- IMP3	1:50	ratón	Novocastra
Anticuerpo secundario		Origen animal	
Anti-Ig ratón	1:100	conejo	DakoCytomation

12.9) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las muestras fueron fijadas en 2% glutaraldehído en PBS durante 2 horas a 4°C y procesadas para su inclusión en la resina LR White. Se obtuvieron secciones semifinas de 1 μm en un ultramicrotomo UC-4 (Leica, Barcelona). Estas secciones fueron teñidas con azul de toluidina al 0.3% en solución acuosa, para conseguir una descripción histológica mas

detallada. A partir de estos cortes semifinos se realizaron secciones ultrafinas que se recogieron con rejillas de cobre cubiertas de formvar y posteriormente se realizó el contraste de las mismas con acetato de uranilo (6 min) y citrato de plomo (3 min) y fueron observadas en el microscopio electrónico Zeiss EM/ 10c.

12.10) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los resultados se analizaron utilizando el paquete informático SPSS v14. Para el cálculo de la significación estadística de las valoraciones macroscópicas y microscópicas semicuantitativas de cada grupo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones dos a dos por la prueba de Mann-Whitney. La significación estadística de los resultados morfométricos cuantitativos y analíticos en plasma se evaluó mediante la prueba Anova y el método de Bonferroni ó Welch y Games-Howell según correspondiera.