



Universidad de Murcia
Facultad de Medicina
Dpto. CC. Sociosanitarias

**Estudio microscópico e inmunocitoquímico en
riñones de pollos sometidos a dieta
hiperlipémica. Efecto de la atorvastatina sobre
el modelo aviario de regresión-progresión**

María de Gracia Adánez Martínez

Murcia, 2006



Universidad de Murcia
Facultad de Medicina
Dpto. CC. Sociosanitarias

**Estudio microscópico e inmunocitoquímico en
riñones de pollos sometidos a dieta hiperlipémica.
Efecto de la atorvastatina sobre el modelo aviario
de regresión-progresión**

**Memoria presentada por Dña. María de Gracia
Adánez Martínez para optar al Grado de Doctor**

Directores:

Dra. Dña. María Teresa Castells Mora

Dr. D. Ignacio Ayala de la Peña

Dr. D. Bartolomé García Pérez

Murcia, 2006

A mis padres

A mi marido

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. D^a. M^a Teresa Castells Mora, mi más vivo agradecimiento. Su entrega, conocimientos, generosidad y amabilidad han hecho de esta Tesis un camino grato de recorrer. La satisfacción de la búsqueda del trabajo bien hecho se ha unido en este caso, al de conocer a una excelente científica y una bellísima persona. Nunca olvidaré su incansable capacidad de trabajo en las muchas horas que disfruté de su compañía.

Al Dr. D. Bartolomé García Pérez, tengo la satisfacción de agradecerle la confianza que depositó en mí al invitarme a participar en un proyecto que es suyo y que con su carisma, entusiasmo, iniciativa y conocimientos ha crecido a lo largo de estos años. Así como por la orientación científica, la animosidad y la ayuda que supo prestarme en todo momento.

Al Dr. D. Ignacio Ayala de la Peña, del que tengo que resaltar la inestimable ayuda prestada en el campo bibliográfico, sus correcciones y aportación de conocimientos, su pronta disponibilidad y amabilidad siempre que lo he necesitado.

A todas las personas que componen el grupo de trabajo y sin cuya colaboración no hubiera sido posible, especialmente al Dr. D. Juan Vicente Ortega y a D^a M^a Teresa Sánchez Polo.

A los miembros del departamento de Ciencias Sociosanitarias, por la iniciación en esta empresa, con los cursos de los programas de doctorado. En especial al Dr. D. Eduardo Osuna Carrillo de Albornoz por haber aceptado ser mi tutor en esta Tesis.

Al personal del departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina, por su agradable acogida y su apoyo para la realización de las técnicas histológicas.

A mis compañeros del Servicio de la Puerta de Urgencias del Hospital Virgen de la Arrixaca, por el apoyo que me han mostrado en la realización de este trabajo.

A mis amigas Magui, Leo, Raquel y Eugenia que siempre mostraron su ilusión en que este proyecto llegara a buen fin.

A Diego Lorenzo Martín, mi cuñado, por su disponibilidad y ayuda para salvar los problemas informáticos que surgían en este trabajo.

A mis padres, con todo mi cariño, porque a lo largo mi vida siempre he encontrado en ellos el apoyo y el estímulo para culminar todos mis proyectos.

A mis hermanas, Mar y Belén, y a mis sobrinos, Ana y Diego que siempre me aportan la necesaria alegría de vivir.

Y por último y especialmente. A Javier, mi marido por todo el amor, paciencia y comprensión, que me ha demostrado durante todo el tiempo que he tenido que dedicar a mi Tesis.

INDICE

	Página
1.- INTRODUCCIÓN.	1
2.-ARTERIOSCLEROSIS Y ENFERMEDAD RENAL	5
2.1.-Lesiones arterioscleróticas	5
2.2.-Patogenia de la arteriosclerosis y de la glomeruloesclerosis	9
2.3.-Semejanza entre arteriosclerosis y glomeruloesclerosis	11
2.4.-Escala de daño glomerular en glomeruloesclerosis	13
2.4.1.-El Nahass et al (1991)	14
2.4.2.-Gassler et al.(1998)	14
2.4.3.-Boffa et al.(2003)	15
2.5.-Trabajos previos de arteriosclerosis en animales intactos	18
2.6.-El pollo como animal de estudio en arteriosclerosis.	19
2.7.-Experiencia en nuestro grupo de trabajo	22
3.-HIPERLIPEMIA Y ENFERMEDAD RENAL	25
3.1.-Breve perfil histórico.	25
3.2.-Mecanismos bioquímicos de la hiperlipemia en la enfermedad renal	26
3.3.-Estudios in Vitro.	32
3.4.-Estudios sobre hiperlipemia y afectación renal en animales	33
3.4.1.-Estudios de progresión en animales sin intervención farmacológica.	33
3.4.2.-Estudios de intervención farmacológica en animales	36
3.5.-Estudios sobre hiperlipemia y afectación renal en humanos.	38
3.6.-El pollo como animal de estudio en riñón graso.	39
3.7.-Breve anatomía comparada entre riñón de aves y mamíferos.	40
4.-ESTATINAS	45
4.1.-Estructura del colesterol	45
4.2.-Mecanismo de acción de las estatinas	47
4.3.-Características y tipos de estatinas	49

4.4.-Efectos de las estatinas sobre la dislipemia	51
4.5.-Otros efectos beneficiosos de las estatinas. Efectos pleiotrópicos	51
4.5.1.-Efectos sobre la función endotelial	54
4.5.2.-Efectos sobre el remodelado vascular.	55
4.5.3.-Efecto sobre la lesión aterosclerótica	56
4.5.4.-Efectos antitrombóticos.	57
4.5.5.-Efectos antiinflamatorios	58
4.5.6.-Efecto inmunomodulador	60
4.5.7.-Efectos sobre la proliferación celular y la apoptosis	61
4.6.-Efectos adversos.	62
4.7.-Seguridad e idoneidad en el uso de las estatinas en los pacientes con insuficiencia renal.	63
4.8.- Estudios de intervención con estatinas en enfermedad renal	67
4.8.1.-Estudios en cultivos celulares	67
4.8.2.-Estudios en animales intactos con estatinas	67
4.8.3.-Estudios en animales con daño e intervención con estatinas en animales.	71
4.8.4.-Estudios en humanos.	73
5.-OBJETIVOS	77
6-MATERIAL Y METODOS.	79
6.1.-Animales y grupos experimentales	79
6.2.-Obtención del material.	81
6.3.-Análisis del plasma.	83
6.4.-Estudio histológico. Microscopía de luz.	83
6.5.-Técnicas inmunocitoquímicas	84
6.6.-Técnicas de microscopía electrónica	86
6.7.-Análisis cuantitativo por análisis de imagen	86
6.7.1.-Valoración de la grasa	87

a y b :Ausencia/presencia y tipo de depósito	87
c: Tamaño y forma del acúmulo graso	88
6.7.2.-Valoración de la inflamación.	88
6.7.3.-Valoración de la fibrosis	88
6.7.4.-Valoración del daño glomerular	89
6.7.4.a.-Análisis semicuantitativo del grado de lesión de los glomérulos	89
6.7.4.b.-Análisis morfométrico de los glomérulos tipo reptiliano y mamífero.	90
6.7.5.-Valoración de marcadores inmunocitoquímicos	90
a.- α -Actina	90
b.-MMP9 y IMP3	93
6.7.6.-Valoración del sistema vascular	93
6.8- Análisis estadístico de los datos	94
7-RESULTADOS	95
7.1.-Resultados analíticos del plasma.	95
7.1.1.-Resultados de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL	95
7.1.2.-Resultados de enzimas hepáticas AST y ALT	96
7.1.3.-Resultados analíticos de marcadores de inflamación.PCR	97
7.2.-Descripción de las características macroscópicas.	98
7.3.-Estudios histológicos	99
7.3.1.-Descripción microscópica cualitativa. Microscopía de luz.	99
7.3.2.-Marcadores inmunocitoquímicos	103
α -actina	103
MMP9	104
IMP3	106
7.3.3.-Microscopia electrónica.	107
7.3.4.-Valoración microscópico-cuantitativa por análisis de	114

imagen.	
7.3.4.a.-Valoración semicuantitativa de grasa	114
Valoración ausencia/presencia de grasa	114
Valoración del tipo de depósito graso	116
Valoración del tamaño y forma de los acúmulos grasos	118
Diámetro máximo de los acúmulos grasos	119
Área del acúmulo graso	120
Forma circular de los acúmulos grasos	121
7.3.4.b.- Valoración de inflamación y fibrosis	122
7.3.1.c.-Valoración semicuantitativa del grado de lesión glomerular.	123
7.3.1.d.-Valoración semicuantitativa del grado de lesión glomerular en los glomérulos tipo reptiliano y mamífero.	127
7.3.1.e.-Análisis morfométrico de los corpúsculos tipo reptiliano y mamífero: Diámetro equivalente, área glomerular.	131
Diámetro equivalente corpúsculos tipo reptiliano	130
Diámetro equivalente, corpúsculos tipo mamífero	131
Área del glomérulo, corpúsculos tipo mamífero	132
Área del glomérulo, corpúsculos tipo mamífero	133
7.3.2.-Valoración de la inmunorreactividad a α -actina (actAxactG)/(CAxCG)	134
actA/CA	135
actAxactG/CA	137
7.3.3.-Inmunorreactividad a la matriz de la metaloproteinasa 9 (MMP9)	139
MMP9 en los túbulos proximales	138
MMP9 en los túbulos distales de la corteza	139
MMP9 en los túbulos distales de la médula	140
7.3.4.-Inmunorreactividad al inhibidor de la matriz de la metaloproteinasa 3. (IMP3)	141

IMP3 en los túbulos proximales	141
IMP3 en los túbulos distales de la corteza	142
IMP3 en los túbulos distales de la médula	143
7.3.5.-Análisis de la valoración del sistema vascular	144
Arterias intralobulares	144
Análisis del diámetro externo de las arterias intralobulares	144
Análisis del diámetro de la luz de las arterias intralobulares	145
Análisis del grosor de la pared de las arterias intralobulares	146
Análisis de la relación pared/luz de las arterias intralobulares	147
Arteriolas renales	148
Análisis del diámetro externo de las arteriolas renales	148
Análisis del diámetro de la luz de las arteriolas renales	150
Análisis del grosor de la pared de las arteriolas renales	151
Análisis de la relación pared/luz de las arterias arteriolas renales	152
8.-DISCUSIÓN	155
8.1.- Resultados analíticos	155
8.1.1-Perfil lipídico	155
8.1.2.-PCR como marcador de proceso inflamatorio	156
8.2.- Valoración de las características microscópicas. Muestras histológicas del riñón	158
8.2.1.-Efectos de la atorvastatina en los depósitos grasos en los distintos grupos experimentales	158
8.2.2.-Inflamación y fibrosis	163
8.2.3.-Daño glomerular	163
8.2.3. a.- Efectos de la atorvastatina sobre el grado de lesión glomerular de los distintos grupos experimentales. Valoración semicuantitativa	163
8.2.3. b.- Valoración cuantitativa de la hipertrofia glomerular en los distintos grupos experimentales	166
8.3.- Análisis de los resultados de los estudios inmunocitoquímicos	170
8.3.1.- Análisis de la inmunorreactividad a α -actina	170

8.3.2.-Análisis de la inmunorreactividad a MMP-9 y IMP-3	173
8.4.-Caracterización de los cambios de la estructura vascular	178
8.4.1.-Análisis de los cambios histológicos en las arterias intralobulares	179
8.4.2.-Análisis de los cambios histológicos de las arteriolas	181
9.-CONCLUSIONES	183
10.-BIBLIOGRAFÍA	187

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABCA1: molécula transportadora unida a ATP

ALT: Aspartato aminotransferasa

Apo B: Apolipoproteína B.

Apo E: Apoproteína E.

AST: Alanino amino transferasa.

α -SMA: Marcadores citoesqueléticos α - actina de músculo liso

CD 36: Linfocitos CD 36.

CK: Creatinin quinasa.

CMLV: Celulas musculares vasculares lisas.

COL: Colesterol.

CYP: Citocromo.

FKLS: Síndrome de hígado y riñon graso.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

HMGCo AR: Hidroximetilglutaril coenzima A reductasa.

IECAS: Inhibidores del enzima de conversión de la angiotensina.

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular.

IL-1 β : Interleukina 1 Beta.

IL-6: Interleukina 6.

IMP-3: Inhibidor de la matriz de la metaloproteinasas 3.

LCAT: Lecitín aminotransferasa

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

Lox-1: Lipoproteína oxidada de baja densidad.

Max: Máximo.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos.

MCS-F: Factor estimulante de colonias de monocitos y macrófagos

MEC: Matriz extracelular.

MIF: Factor inhibidor de macrófagos.

MMP-9: Matriz de Metaloproteinasa 9.

NADPH oxidasa: NicotinamidaAdenina Dinucleótido fosfato oxidasa

NF- κ B- Factor de transcripción.

NO: Oxido nítrico.

PPAR- γ : Factores de transcripción activados por ligandos que pertenecen a las superfamilias de receptores nucleares.(Peroxisoma proliferator-activated receptor)

PCR: Proteína C Reactiva.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

SER: Elemento de Respuesta a Esteroles.

SR-A: Receptor "Scavenger" o basurero A.

SRB-1: Receptor "Scavenger" o basurero B-1

SREBP: Factor de transcripción sensible a esteroles.

TGF-B: Factor transformador de crecimiento intersticial.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TRIG: Triglicéridos.

VCAM-1: Molécula de adhesión de células vasculares.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

VSMC: Células musculares lisas vasculares.
