

ESTUDIO COMPARATIVO DE DIVERSOS MÉTODOS DE INDUCCIÓN DE ATEROGENESIS EXPERIMENTAL EN EL POLLO

Comparative study of several induction methods of experimental atherogenesis in the chicken
Métodos de inducción de aterogénesis experimental en pollos

Ayala I.^{1*}, García Pérez, B.², Doménech, G.¹, Sánchez Polo, M^{ar}T.², Ortega, J.V.³, Castells, M^a.T.⁴

1. Dpto. Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, s/n, Murcia 30100.
2. Hospital «Virgen de la Arrixaca», El Palmar, Murcia.
3. Hospital «Los Arcos», Santiago de la Ribera, Murcia.
4. Dpto. Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia

* Autor de referencia: iayape@um.es

RESUMEN

Dada la importancia de la arteriosclerosis y sus consecuencias clínicas en las sociedades desarrolladas (primera causa de muerte en Europa y EEUU) resulta interesante disponer de modelos animales en los que reproducir la enfermedad de cara a la investigación básica y aplicada en esta materia. El pollo reproduce espontáneamente y de forma inducida estos procesos, además de otras ventajas como su fácil disponibilidad, precio o similitud de las lesiones con el hombre. El objetivo de este trabajo era estandarizar los métodos de inducción de la aterogénesis en este biomodelo aviar, de cara a plantearnos ensayos con diversos principios activos, para conseguir la regresión de las lesiones arterioscleróticas. En base a las experiencias realizadas, se llega a la conclusión que, para conseguir resultados uniformes mediante el uso del biomodelo de arteriosclerosis del pollo, resulta más conveniente el uso de colesterol puro añadido a una dieta estándar que la mezcla a base de huevo. Por otro lado, debe utilizarse un vehículo como el aceite de palma líquido para facilitar la absorción del colesterol a nivel digestivo, y suministrar la mezcla *ad libitum*.

Palabras clave: inducción aterogénesis experimental, pollo.

ABSTRACT

Atherosclerosis and its consequences continue to be the major cause of death in Europe and the United States. Animals have been used as experimental models in atherosclerosis-related research since the turn of the

past century. The chicken is a good animal model and offers economic and technical advantages over mammalian models. Furthermore, it is able to develop spontaneous and induced atherosclerosis, and there is no essential difference between vascular lesions seen in chickens as a result of cholesterol diet and that of atherosclerosis observed in man. In this work, we examine several induction methods of atherogenesis in the chicken experimental model. It may be concluded that adding cholesterol to a standard diet gives better results, than using an egg-based diet. Palm oil results an excellent mean of increasing the digestive absorption of cholesterol. The atherogenic diet must be administered *ad libitum*.

Key words: experimental atherogenesis induction, chicken.

INTRODUCCIÓN

La arteriosclerosis y sus consecuencias continúan siendo la principal causa de muerte en las sociedades desarrolladas (Sans et al., 1997). Dada la complejidad del desarrollo de la lesión arteriosclerótica en el hombre, resulta interesante experimentar en modelos animales en los que dicho desarrollo sea semejante al de la enfermedad humana (Ayala et al., 2000).

El pollo, al igual que otras especies aviares, es capaz de desarrollar arteriosclerosis aórtica y coronaria de forma natural o espontánea, e inducida por una dieta enriquecida en colesterol, hecho descrito por primera vez de forma detallada por Dauber y Katz (1943).

La enfermedad puede aparecer de forma espontánea, debido a que el pollo presenta hipercolesterolemia de forma natural, con concentraciones plasmáticas de 200 a 350 mg/dl, la mayoría como lipoproteínas de alta densidad (Orta et al., 1994). Las lesiones arteriales aparecen en el segmento abdominal de la aorta, donde son severas y extensas (Weiss, 1959), particularmente en su pared ventral, lo que sugiere influencias hemodinámicas en la patogenia (Texon, 1960). Cuando la lesión es reconocible macroscópicamente, tiene lugar la acumulación de lípidos en la pared arterial (Grollman et al., 1963).

Las alteraciones vasculares observadas en pollos alimentados con dietas aterogénicas afectan principalmente a la aorta torácica y no muestran diferencias esenciales con las descritas en la arteriosclerosis humana (Wong, 1975). Aunque el envejecimiento en el pollo se acompaña

del desarrollo progresivo de arteriosclerosis e hipertensión, ambos procesos son en esta especie independientes y no relacionados patológicamente (Grollman et al., 1963).

La similitud entre las lesiones arteriales de pollos alimentados con dietas aterogénicas y las placas arterioscleróticas humanas, el desarrollo espontáneo de la enfermedad en esta especie, su adecuado tamaño y su fácil disponibilidad y manejo en condiciones experimentales, hacen de este modelo un modelo ideal para llevar a cabo estudios sobre la arteriosclerosis.

Trabajos previos de Valdés (1976) y García Pérez (1992) han conseguido reproducir eficazmente el proceso de arteriosclerosis en la especie que nos ocupa, sometiendo a pollos de 21 días de vida, a una dieta aterogénica *ad libitum*, basada en una mezcla de huevo cocido y picado (a la que se añadía fibra y un suplemento vitamínico-mineral). Posteriormente, Ortega (2002) reprodujo el mismo modelo, ajustando el consumo de huevo a las necesidades nutricionales de los animales y obtuvo lesiones arterioscleróticas, pero en un grado sensiblemente inferior. El objetivo de este trabajo era estandarizar los métodos de inducción de la aterogénesis en este biomodelo aviar, de cara a plantearnos ensayos con diversos principios activos, para conseguir la regresión de las lesiones arterioscleróticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon pollos de la raza White Leghorn (Pollos Pujante, S.A., Murcia, España), en

5 lotes de 10 animales cada uno. Tenían una edad de 21 días, y esas tres primeras semanas de vida se habían alimentado con una dieta estándar de crecimiento y engorde.

Los animales se mantuvieron en las dependencias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia, en salas con temperatura y humedad controlada (aproximadamente 22°C y 45 % respectivamente).

Los procedimientos empleados se desarrollaron cumpliendo la legislación vigente en materia de protección animal, y con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Murcia (España).

Los 5 grupos de animales empleados fueron los siguientes: 1) lote control con dieta estándar de crecimiento; 2) dieta aterogénica a base de huevo; 3) dieta aterogénica con colesterol puro en polvo añadido a pienso estándar (2 %); 4) dieta aterogénica con colesterol puro (2 %) y aceite de palma en polvo (10 %); 5) dieta aterogénica con colesterol puro (2 %) mezclado con aceite de palma líquido (20 %).

Dieta aterogénica a base de huevo

Usamos una dieta a base de huevos hervidos con un corrector vitamínico-mineral y coccidiostático. Basándonos en el método de Siller (1961), y algunos matices propios, la dieta utilizada en nuestra experimentación, estaba compuesta por: huevos hervidos (mezclados 2 sin cáscara y uno con ella). Se añadía un 2 % de moyuelo (aporte de fibra), 0,4 % de sal común y la proporción correspondiente de corrector vitamínico-mineral y coccidiostático (4 Kg/Tn de alimento) (García Pérez et al., 2003).

La dieta se preparaba semanalmente y era refrigerada en pequeñas bolsas para su administración diaria, dos veces al día (mañana y tarde). Se calculaba el consumo de los animales en función de la edad, de tal manera que la cantidad de alimento suministrado aumentaba progresivamente cada semana, con la edad de los animales.

Las dietas aterogénicas con colesterol puro se suministraban *ad libitum*.

Sacrificio y disección de los animales

Los animales de los diversos lotes se sacrificaron a los dos meses de iniciada la dieta aterogénica. Se dejaban 12 horas en ayunas. Antes del sacrificio se les extraía 10-15 cm³ de sangre de la vena del ala. Posteriormente, se centrifugaba a 3.000 revoluciones por minuto, durante 6 minutos, con lo que se obtenía el plasma para las determinaciones analíticas necesarias.

El sacrificio se realizaba incruentamente mediante la administración de 150 mg. de pentobarbital sódico intraperitoneal. Posteriormente, se procedía a la disección del animal, mediante incisión longitudinal desde el cuello a la cloaca. Se liberaba el árbol vascular en bloque junto al corazón. Se realizaba una incisión sagital del ventrículo izquierdo, y una longitudinal de todo el árbol arterial. Las aortas de los animales de cada grupo eran extendidas y fijadas inmediatamente en unos soportes de corcho, e introducidas en formol, para su posterior tinción con Sudán III. El tiempo transcurrido entre la parada cardiorrespiratoria y la obtención de todo el material oscilaba entre los 10 y 15 minutos.

Determinaciones analíticas

Las muestras de plasma fueron procesadas mediante un analizador automático Hitachi-717 (Hitachi Ltd., Madrid, España), y se emplearon reactivos estándar de la casa Boehringer Mannheim (Boehringer, Barcelona, España), para la determinación de lípidos (triglicéridos, colesterol, HDL, LDL) y otros parámetros bioquímicos (urea, glucosa, ácido úrico, ASAT, ALAT, fosfatasa alcalina).

En cuanto a las aortas, eran fijadas en formol al 10 % en tampón fosfato salino, durante dos horas. La tinción con Sudán III se realizaba a las 48 horas del sacrificio de los animales.

Para ello se introducían primero en alcohol 70 % dos horas, y en luego en Sudán III, 24 horas. Luego se lavaban con alcohol 70 % y agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de colesterolemia de los diferentes grupos de animales aparecen en la tabla 1. En el lote de animales con dieta normal (grupo 1, control) los resultados de la bioquímica entran dentro de los parámetros establecidos como normales para esta especie (valores en torno a los 150-200 mg/dl).

En el grupo 2, alimentado con una dieta aterogénica a base de huevo, se aprecian elevaciones de la colesterolemia, pero moderadas, con una media ligeramente inferior a 400 mg/dl. García Pérez (1992) obtuvo elevaciones superiores en los niveles de colesterol en sangre. Los resultados obtenidos por Ortega (2002) resultan más discretos, aunque también rebasan claramente los parámetros normales.

Tampoco se produjeron lesiones ateromatosas en el lote 2, tal y como demuestra la tinción Sudán de las aortas, lo que hace pensar que no se ha llegado a un nivel de saturación suficiente de lípidos en sangre, como para determinar la aparición de placas ateromatosas en la superficie aórtica. García Pérez et al. (2001), pudieron desarrollar en 8 semanas un área del 67 % de lesión sudanófila en la pared de las aortas, pero con valores de colesterolemia en torno a los 600 mg/dl. Ortega (2002) produjo lesiones ateromatosas de menor envergadura, un 22 %, con una

dieta ajustada a los requerimientos nutricionales de los pollos.

Estos resultados hacen pensar que no resulta suficiente una dieta aterogénica suministrada exclusivamente en función de las necesidades nutricionales de los animales a cada edad, sino que es necesario dar una mayor cantidad de alimento, en condiciones ideales, *ad libitum*, para conseguir la aparición de placa, tal y como comprobó García Pérez (1992). De hecho, como sospechábamos también por los resultados de Ortega (2002), una dieta planteada sólo según las necesidades nutricionales, da lugar a una disminución considerable en la aparición de placa. Hay además que tener en cuenta la variabilidad que pueden mostrar los huevos en cuanto a su contenido en colesterol. De hecho, pudimos comprobar niveles bajos en la mezcla de huevos con valores en torno a 0.15-0.2 %, cuando se estima que se requieren niveles más altos (superiores al 0.5 %) para desarrollar arteriosclerosis en los animales (Winsor et al., 1978).

Los lotes 3 y 4, con valores en torno a los 200-400 mg/dl, tampoco presentaron niveles significativamente altos de colesterol en sangre, ni consecuentemente, de placa ateromatosa en las aortas. Esto se debe probablemente a la falta de absorción del colesterol a nivel digestivo, ya que no se empleó un vehículo oleoso como en el lote 5 (el componente en ácidos grasos saturados, es decir el aceite de palma, se añadió en forma de polvo).

El lote 5 (dieta aterogénica a base colesterol puro y aceite de palma líquido) presenta niveles significativamente altos (superando los 1000 mg/

Cuadro 1. Resultados estadísticos de colesterolemia (IC, intervalo confianza)

Colesterolemia (mg/dl)	Grupo 1 n=10	Grupo 2 n=10	Grupo 3 n=10	Grupo 4 n=10	Grupo 5 n=10
Valor medio	125,0	382,3	271,4	317,0	1379,5
Desv. Típica	16,3	33,0	69,5	115,1	523,7
IC 95% mínimo	114,9	361,8	228,3	245,6	1.054,9
IC 95% máximo	135,1	402,8	314,5	388,4	1.704,1

dl) de colesterol en sangre, lo que está indicando, puesto que el porcentaje de colesterol en la dieta es similar al de los lotes 3 y 4, que ha sido el vehículo a base de aceite de palma líquido el que ha facilitado su absorción digestiva. Además, también encontramos claras lesiones arterioscleróticas con la tinción Sudán efectuada sobre las aortas de este grupo de animales (foto).

Podemos concluir que, de cara a conseguir resultados uniformes mediante el uso del biomodelo de arteriosclerosis del pollo, resulta más conveniente el uso de colesterol puro añadido a una dieta estándar que la mezcla a base de huevo. Por otro lado, debe utilizarse un vehículo como el aceite de palma líquido para facilitar la absorción del colesterol a nivel digestivo. La mezcla resultante debe administrarse *ad libitum*.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la Fundación Séneca (Centro de Coordinación de la Investigación, Murcia, España), referencia PI-7/00785/FS/01. Agradecemos la colaboración de la empresa Hijos de Juan Pujante S.A. y Avícola Levantina S.A. y del veterinario de las mismas, Dr. D. Juan Pablo Pérez Ruzafa.

BIBLIOGRAFIA

- Ayala, I., Gutierrez-Panizo, C., De Membiela, F., Montes, A. 2000. El uso de modelos animales en el estudio de la arteriosclerosis humana. *Rev. Exp. Anim.* 10-11(1-2): 53-58.
- Dauber, D.V., Katz, L.N. 1943. Experimental atherosclerosis in the chick. *AMA Arch. Pathol.* 36: 473-92.
- García Pérez B. 1992. Efecto del nifedipino, verapamilo y diltiazem sobre la placa arteriosclerosa inducida experimentalmente en pollos alimentados con huevos. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- García Pérez, B., Ayala, I., Castells, M.T., Madrid, J.F., Ortega, M.R., Ortega, J.V., Ba-
llestá, J., Fernández Pardo, J., Valdés, M. 2003. Planimetric and histological study of the aortae in atherosclerotic chickens treated with nifedipine, verapamil and diltiazem. *Histol. Histopathol.* 18: 1027-1033.
- García Pérez, B., Ortega, J.V., Fernández-Pardo, J., Valdés, M. 2002. Efecto antiaterogénico de la atorvastatina en pollos alimentados con una dieta rica en huevos. *Clín. Invest. Arteriosclerosis* 782: 20-25.
- Grollman, A., Ashworth, C., Suki, W. 1963. Atherosclerosis in the chicken. *Arch. Pathol.* 75: 56-64.
- Orita, S., Masegui, T., Itou, K., Kawada, M., Yanai, T., Ueda, K. 1994. Spontaneous Aortic Arteriosclerosis in Layer Chickens. *J. Comp. Pathol.* 110: 341-347.
- Ortega, J.V. 2002. Efecto de la atorvastatina en pollos aterogénicos alimentados con una dieta rica en huevos. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Sans, S., Kesteloot, H., Kromhout, D. 1997. The burden of cardiovascular disease mortality in Europe. *Eur. Heart J.* 18: 1231-1248.
- Siller, W.G. 1961. The pathology of experimental atherosclerosis in egg-fed fowls. *J. Atheroscl. Res.* 1: 189-204.
- Texon, M. 1960. The hemodynamic concept of atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 5: 291-94.
- Valdés Chavarri, M., Pascual-Leone, A., Oconnor, C. 1976. Verification of the cholesterol hypothesis in atherogenesis with a model of dietary atheromatosis in chicken fed with eggs. Influence of insulin and oral antidiabetics. *Rev. Clin. Esp.* 143(5): 427-35.
- Weiss, H.S. 1959. Variation in appearance, cholesterol concentration and weight of the chicken aorta with age and sex. *J. Gerontol.* 4: 19-25.
- Winsor, D.W., Winsor T. y Maranga, K. 1978. The natural course of arteriosclerosis in Animals and Man. *Angiology* 29: 263-271.
15. Wong, H.Y. 1975. The cockerel as an animal model for atherosclerosis research. *Adv. Exp. Med. Biol.* 63: 381-387.

