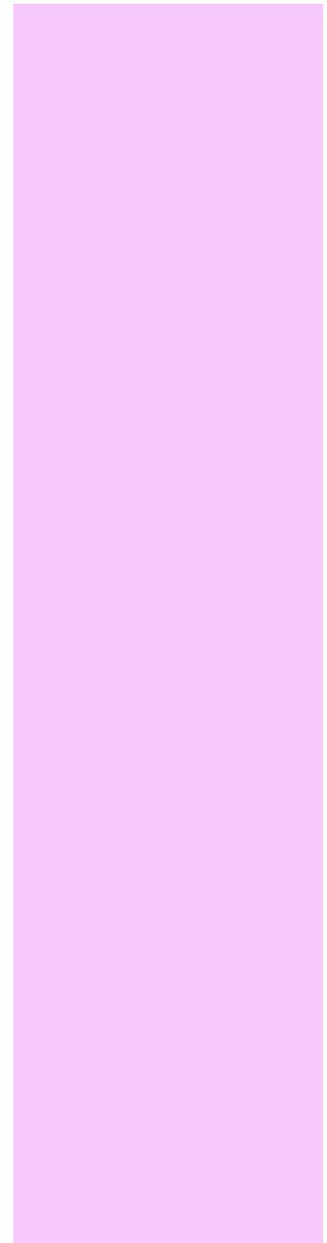
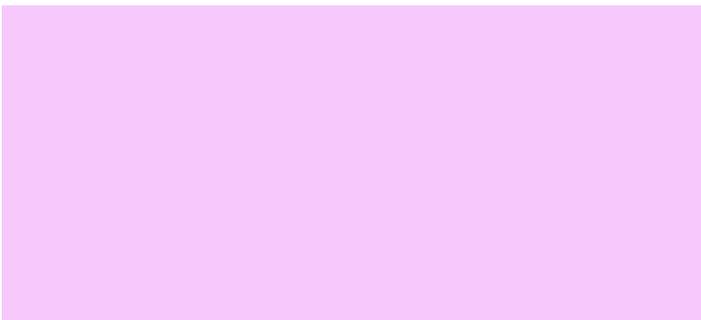


RESULTADOS



13.1) RESULTADOS BIOQUÍMICOS

- **Perfil lipídico**

La tabla 14 y la figura 24 representan los valores analíticos del plasma de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos en los cinco grupos experimentales. Es de destacar los altos niveles de colesterol y triglicéridos en el grupo B, frente a los bajos niveles del control sano, grupo A. Ambos niveles disminuyen en los grupos de supresión de dieta hiperlipémica y/o tratamiento con atorvastatina. Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tras la prueba de Anova y Bonferroni en los niveles de colesterol y triglicéridos plasmático del grupo B respecto a los demás grupos.

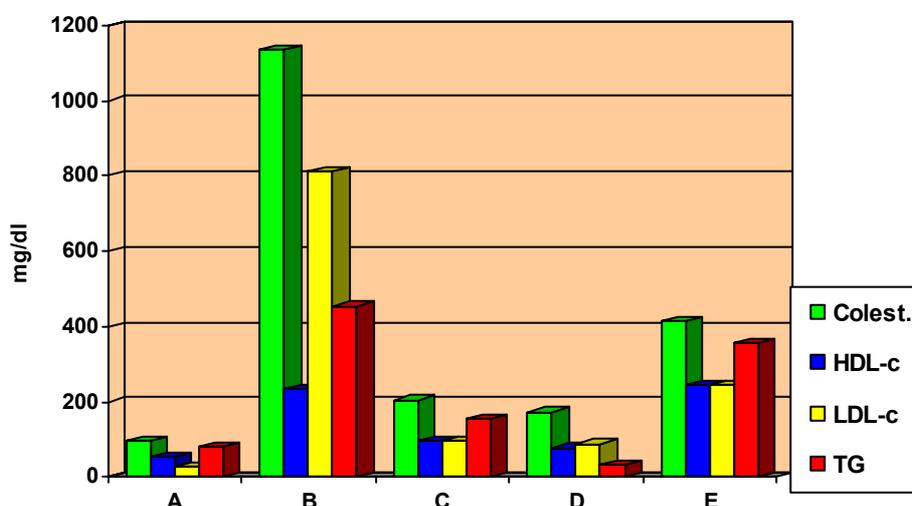
Tabla 14. Perfil lipídico en plasma

Grupo	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	HDL-colesterol (mg/dl)	LDL-colesterol (mg/dl)
A	95,11±5,93	79,55±33,49	53,11±8,42	26,00±2,78
B	1136,00±196,2*	454,00±165,9*	233,80±33,74*	811,3±162,35*
C	204,20±40,87	153,40±90,92	95,40±20,24	95,00±27,79
D	172,40±44,68	31,60±7,24	77,60±26,40	88,50±19,29
E	413,75±83,80	356,88±130,32	242,88±70,96	242,80±70,93

Los valores se expresan como media \pm error estándar, $n=10$ por grupo experimental. Prueba de Anova y Bonferroni. *: Diferencia significativa entre el grupo B y los demás grupos ($p < 0,05$). No se encuentran diferencias significativas en las demás comparaciones.

HDL: high density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein.

Fig 24. Perfil lipídico en plasma



● **Pruebas de función hepática**

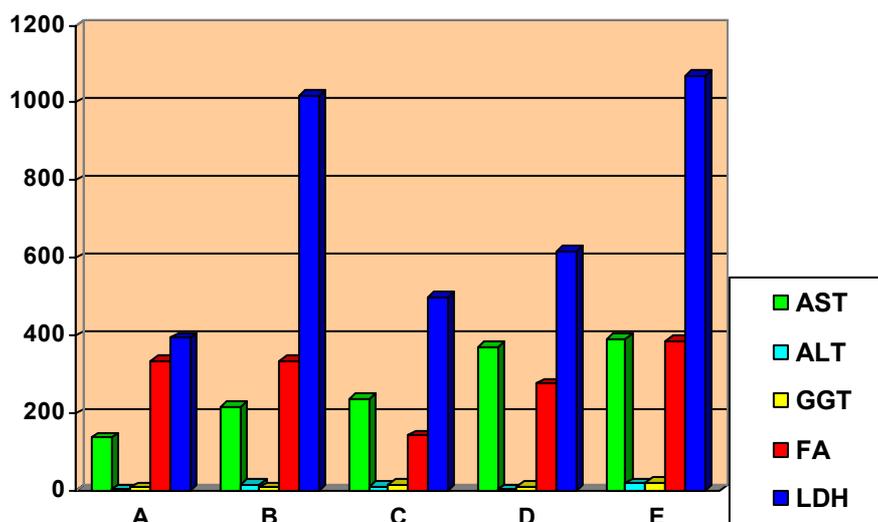
La tabla 15 y la figura 25 representan los valores analíticos en plasma de AST, ALT, GGT, FA y LDH por grupo experimental. Tras realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

Tabla 15. Resultado de las pruebas de función hepática

Grupo experimental	AST (UI/l)	ALT (UI/l)	GGT (UI/l)	FA (UI/l)	LDH (UI/l)
A	136,22±41,04	2,88±0,59	8,88 ±2,96	336,33±138,66	393,77±138,87
B	217,60±57,20	17,10±6,74	8,40±3,62	335,00±60,27	1018,60±214,7
C	237,10±48,80	11,10±4,46	16,66±3,84	142,40±50,20	499,40±109,61
D	371,50±158,20	4,10±1,08	12,30±2,12	275,20±66,91	617,90±182,08
E	392,38±66,40	18,25±6,06	20,75±8,76	385,38±131,80	1069,1±2240,5

Los valores se expresan como media ± error estándar, n=10 por grupo experimental. Las pruebas de Anova y Bonferroni no encuentran diferencias significativas en las comparaciones. AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: γ-glutamilttransferasa; FA: fosatasa alcalina; LDH: lactato deshidrogenada. UI: unidades internacionales.

Fig 25. Pruebas de función hepática



- **Otras determinaciones bioquímicas.**

Se analizaron otras variables como albúmina, hierro y ferritina sin mostrar diferencias significativas en las poblaciones de estudio. Solo la PCR fue significativamente menor en el grupo A (Tabla 16).

Tabla 16. Otras determinaciones analíticas e plasma

Grupos	Albúmina [•]	Fe [•]	Ferritina [▲]	PCR (REU/ml) [•]
A	1,26±0,03	124±27,4	36±27	1,10±0,27*
B	1,43±0,09	109±39,4	37±10	2,74±0,25
C	1,59±0,07	100±33,5	6±1	2,56±0,90
D	1,46±0,12	75±25	20±10	2,01±0,83
E	1,50±0,09	169±44,7	5±1	2,11±0,50

Los valores se expresan como media±error estándar; n=10 por grupo experimental. Las pruebas de [•]Anova y Bonferroni [▲]Welch y Games-Howell no encuentran diferencias significativas entre las comparaciones, excepto en el análisis de PCR ^{*} existen diferencias significativas p<0,05 entre el grupo A y los demás grupos. Fe: hierro, PCR: proteína C reactiva.

13.2) ANÁLISIS MACROSCÓPICO

En primer lugar tras la extracción del hígado se realizó una valoración del peso de los hígados respecto al peso corporal total; al final del estudio que se refleja en la tabla 17, tras el análisis estadístico no se encontraron diferencias entre los grupos.

Tabla 17. Peso corporal total y hepático al final del estudio.

	Grupos experimentales				
	A	B	C	D	E
Peso corporal 6 meses (gr)	4268±187	4700±200	4655±168	4410±181	4485±363
Peso del hígado (gr)	93±7	153±12	110±6	112±8	147±15
Peso del hígado(gr)/100g del peso corporal	2,23±0,22	3,26±0,24	2,40±0,17	2,72±0,32	4,01±0,85

Los resultados se expresan como media ± error estandar para n=10 por grupo experimental. Tras las pruebas de Games-Howell no se encuentran diferencias significativas entre los grupos

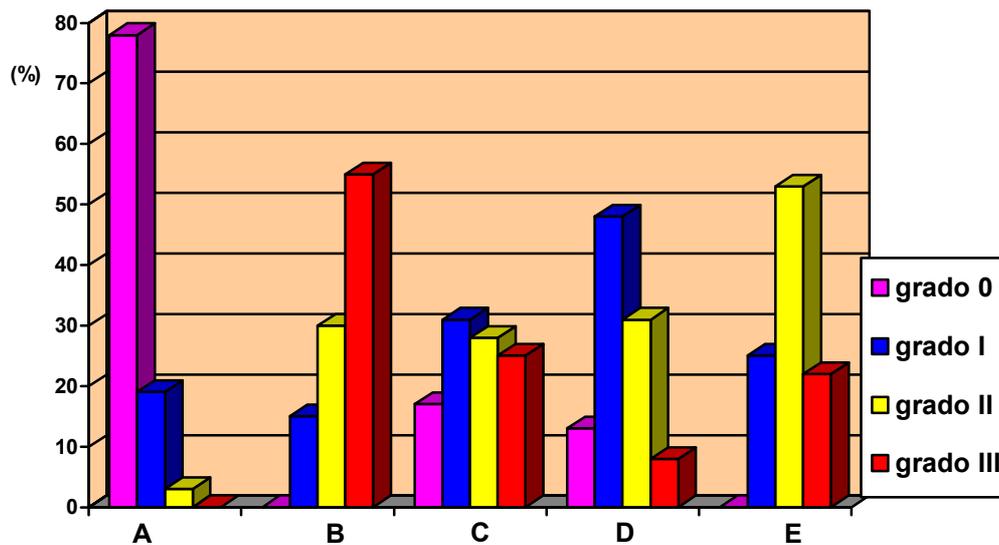
En la tabla 18 y la figura 26 se expresa el porcentaje de cada grado de lesión macroscópico encontrado en los diferentes grupos experimentales, tras la clasificación de las fotografías de cada muestra (Fig.27). Por orden ascendente de gravedad, al grupo A se le asignó mayoritariamente un grado de lesión 0 (78 %), seguido del grupo D definido por la mayoría de observaciones (48 %) como grado I o leve, en el grupo C se observa una mayor dispersión con porcentajes similares entre los grados de lesión I-II-III. El grupo E es mayoritariamente considerado como grado moderado o II (53 %) y el grupo B, con mayor porcentaje de grado de lesión III (55 %), se consideró el más afectado. Tras el análisis estadístico por la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones por Mann-Whitney, se observaron diferencias significativas ($p < 0,000$) entre el grupo A control y el resto de los grupos (B,C,D,E). También existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo B y los grupos C ($p < 0,001$) y D ($p < 0,000$); sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos B y E, los grupos C y D y los grupos C y E.

Al comparar el grupo de progresión B y el grupo de progresión más atorvastatina E, observamos que el B es definido mayoritariamente con grado de lesión III o grave en un 55%, respecto a un 22 % en el grupo E. De forma similar ocurre al comparar el grupo de regresión C y el de regresión más atorvastatina D, destacando un 48 % de lesión leve en D frente a un 31 % en C y un 8 % de lesión grave en D frente al 25 % del C. Existe una tendencia a disminuir el grado de lesión sin que llegue a ser estadísticamente significativa en los grupos tratados con atorvastatina D-E al compararlos con los no tratados C-B.

Tabla 18. Resultados de la valoración macroscópica

Grupos	Grado 0	Grado I	Grado II	Grado III
A^a	78	19	3	0
B^b	0	15	30	55
C^{c,d}	17	31	28	25
D^c	13	48	31	8
E^{b,d}	0	25	53	22

Correspondencia de los grados de lesión en cada grupo experimental. Datos expresados como % de observaciones en cada grado de lesión por grupo experimental. Para cada grupo n=40. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de parejas por la prueba de Mann-Whitney. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) entre los grupos.

Fig 26. Resultados de la valoración Macroscópica

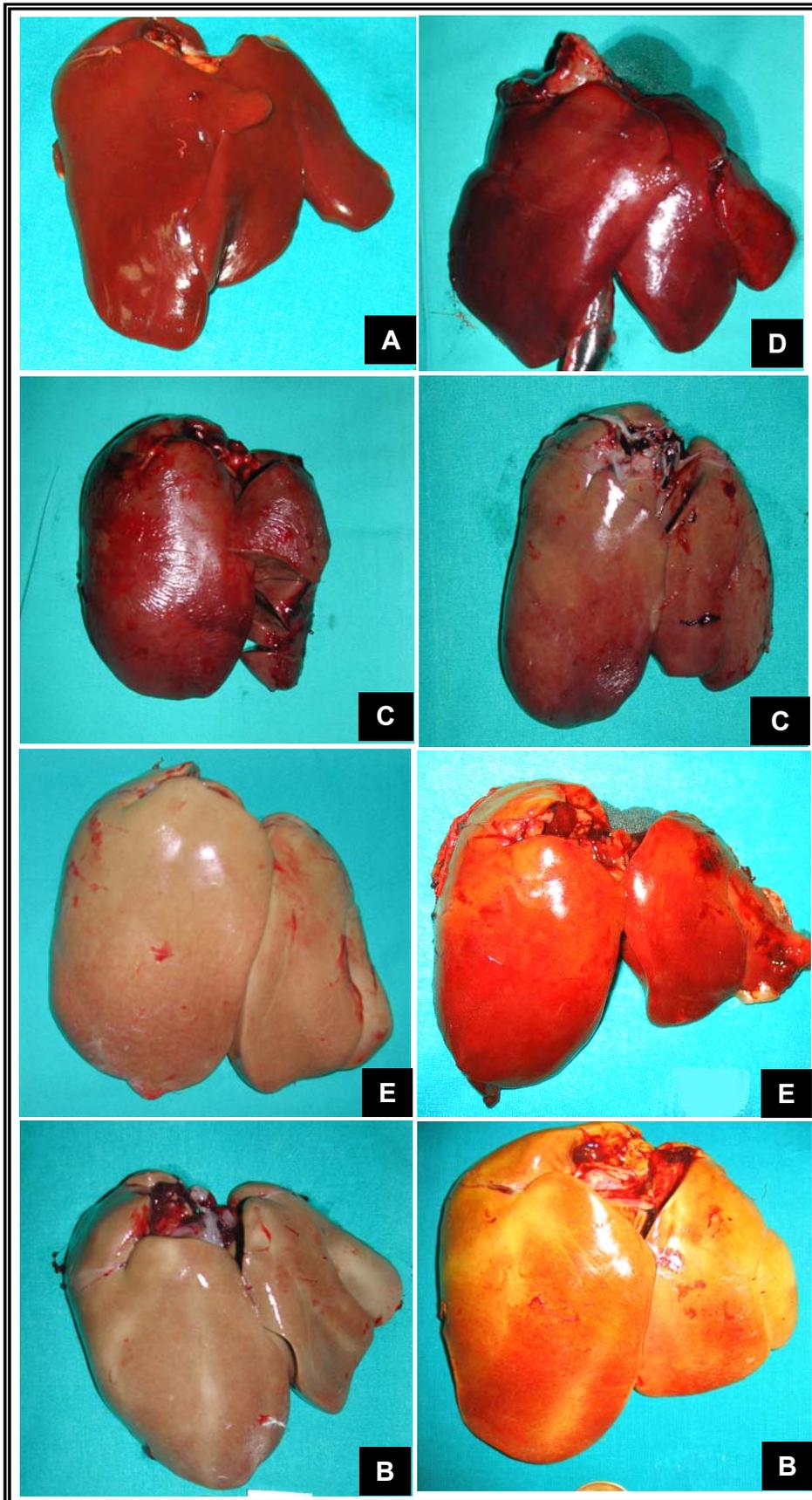


Fig.27.- Representa el grado de afectación hepática macroscópica de los distintos grupos experimentales. Las letras indican el grupo experimental. A) Hígado sano del grupo A con grado de lesión 0, D) hígado del grupo D con grado de afectación I, C) hígado del grupo C con grado de afectación II. E) hígado del grupo E con grado de afectación III (izda) y con grado de afectación II (dcha). B) hígados del grupo B con grado de afectación III.

13.3) CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA. VALORACIÓN MORFOLÓGICA CUANTITATIVA.

Este estudio histológico atiende principalmente a la evaluación de la esteatosis, la inflamación y la balonización, características histológicas obligatorias para el diagnóstico de la enfermedad y que además permiten estimar el grado de la lesión hepática. Estas características histológicas se han valorado individualmente en cada uno de los grupos de experimentación. Son lesiones potencialmente reversibles, ello junto a su reproducibilidad permite evaluar los cambios histológicos después de una intervención, en ensayos terapéuticos. La suma ponderada de cada una de estas características histológicas configura el “NAFLD Activity Score” (NAS). Hemos determinado este índice en cada uno de los grupos al final del estudio, con ello pretendemos ofrecer una visión global del grado de afectación de cada grupo y valorar el efecto de la atorvastatina sobre el grado de actividad de la enfermedad.

13.3.1) DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL

En la valoración inicial de las muestras teñidas con hematoxilina-eosina, observamos las siguientes características histológicas.

Las muestras del grupo B eran las más afectadas con abundantes depósitos grasos predominantemente de tipo macrovacuolar, también mostraban numerosos focos densos de células migratorias tanto en el parénquima hepático como en los espacios portales. Era habitual la presencia de numerosos lipogranulomas y numerosos hepatocitos balonizados. En un segundo nivel de afectación se encuentran las muestras del grupo E. En ellas también destacaba la esteatosis de tipo mayoritariamente macrovacuolar y microvacuolar en menor grado, los

focos de inflamación eran más aislados y de menor densidad, aunque también se observaban lipogranulomas e infiltración portal y menor cantidad de hepatocitos balonizados. En el grupo C la esteatosis formaba pequeños acúmulos grasos confluentes, dispersos en el parénquima y habitualmente rodeados de células migratorias. Los depósitos grasos en el grupo D los encontramos de forma mas aislada en el parénquima y destaca su menor tamaño, también era menor la presencia de células inflamatorias. Tanto en el grupo C como en D se distinguían pocos hepatocitos balonizados. Mientras que en el grupo A no existía en ninguna de las muestras esteatosis ni inflamación, demostrando que se trataba de muestras controles sanas. Mediante la tinción de Verhoeff-van Gieson no se evidenció la presencia de fibrosis en los diversos grupos experimentales

13.3.2) RESULTADOS DE LA VALORACIÓN DE LA ESTEATOSIS

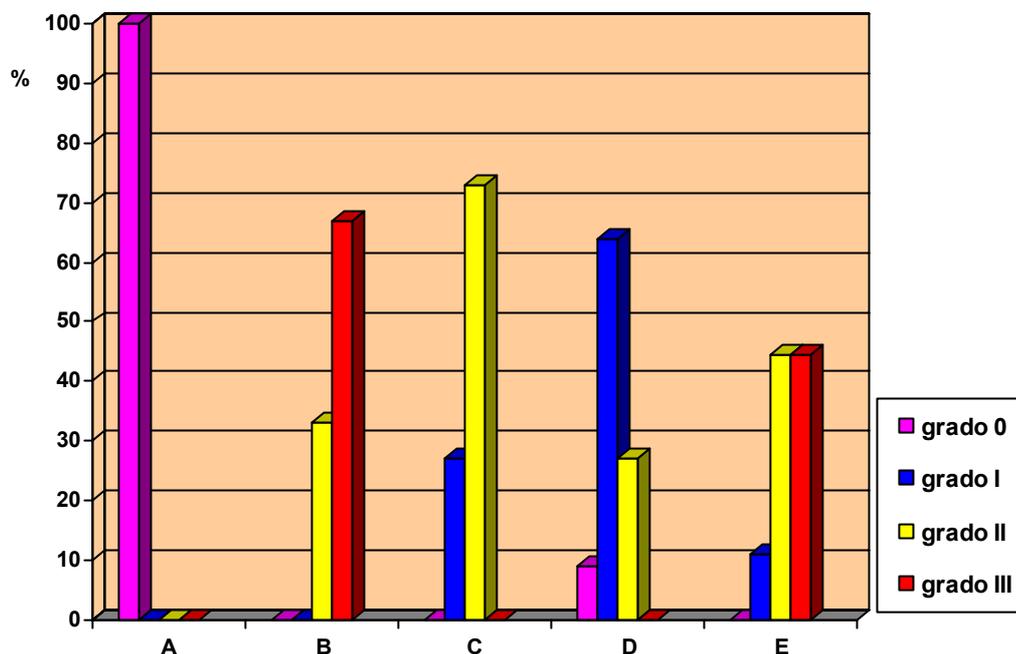
A) Valoración semicuantitativa

Tras el estudio histológico detallado de cada una de las muestras, se realizó una clasificación de los grados de lesión observados a nivel microscópico, según los criterios propuestos por Brunt (1999) y adaptados por Kleiner y col. (2005). En la tabla 19 y la figura 28 se muestran los porcentajes de los grados de lesión microscópica en cada grupo experimental.

Tabla 19. Valoración semicuantitativa del depósito graso

Grupos	Grado 0	Grado I	Grado II	Grado III
A^a	100	0	0	0
B^b	0	0	33	67
C^{c*}	0	27	72	0
D^d	9	63	27	0
E^{b*}	0	11,1	44,4	44,4

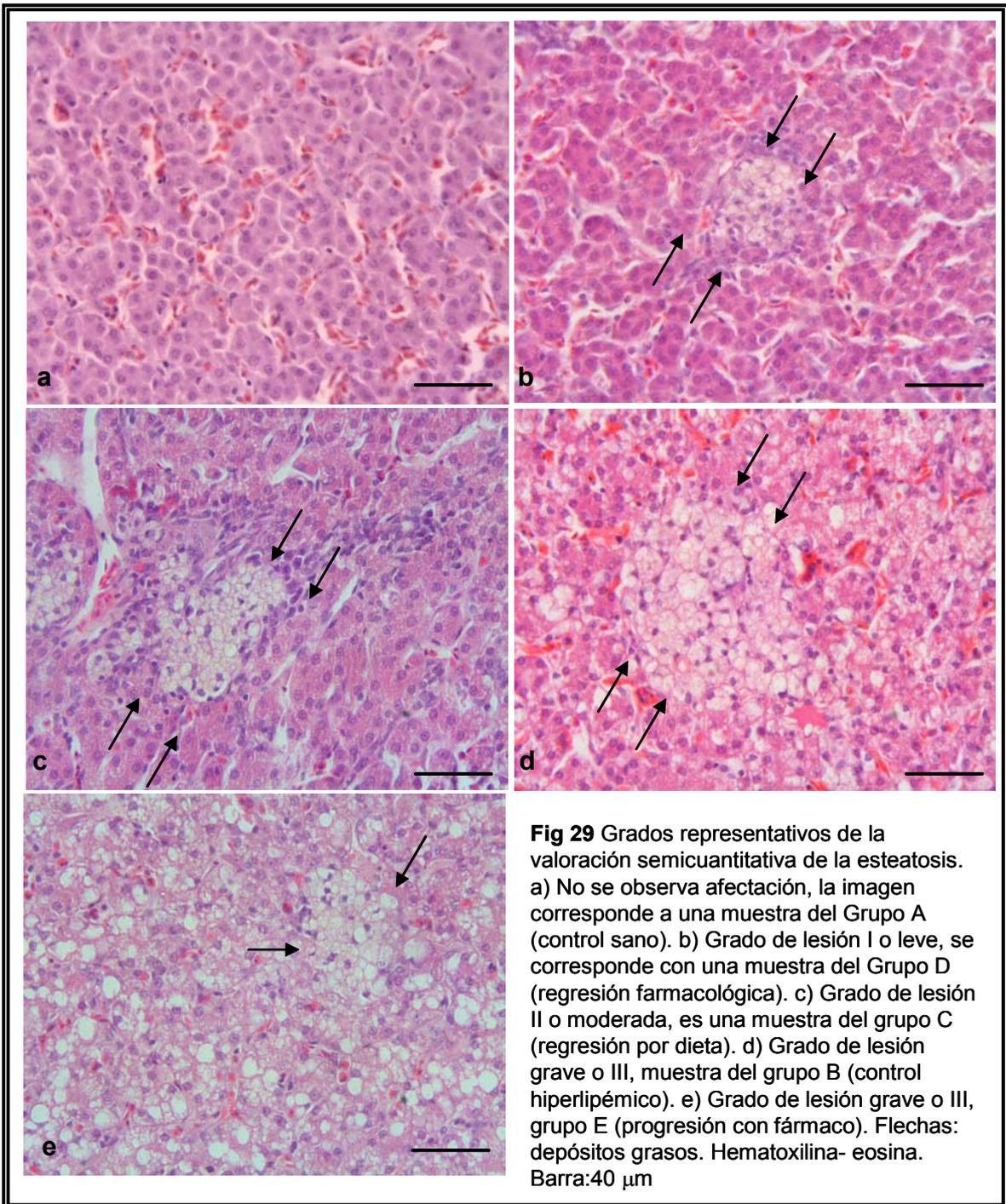
Correspondencia de los grados de lesión en cada grupo experimental. Datos expresados como porcentaje (%) de la distribución de las frecuencias en los grados de lesión en cada grupo experimental. Para cada grupo n=100. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de parejas por la prueba de Mann-Whitney. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos a excepción de $*p < 0,06$.

Fig 28. Valoración semicuantitativa del depósito graso

Por orden de afectación, observamos que todas las muestras del grupo experimental A son normales, grado de lesión 0, seguidas del grupo D con un 63 % de grado I, las muestras del grupo C fueron clasificadas en un 72 % con grado II, el grupo E se distribuye con igual proporción en los grados II-III y el grupo B tiene el mayor porcentaje de afectados (66 % grado III).

Tras el análisis estadístico se observaron diferencias significativas ($p < 0,000$) entre el grupo A y el resto de los grupos (B, C, D y E). También se observaron diferencias significativas entre el resto de combinaciones de los grupos excepto entre el grupo B y E, donde no se observaron diferencias ($p < 0,48$).

Se confirma a nivel histológico que el grupo D tratado con atorvastatina tiene un menor grado de lesión, respecto al grupo C no tratado, confirmando de forma más precisa la primera aproximación de la valoración macroscópica. La figura 29 muestra cortes representativos de la esteatosis de cada uno de los grupos experimentales.



B) Valoración morfométrica cuantitativa de la esteatosis

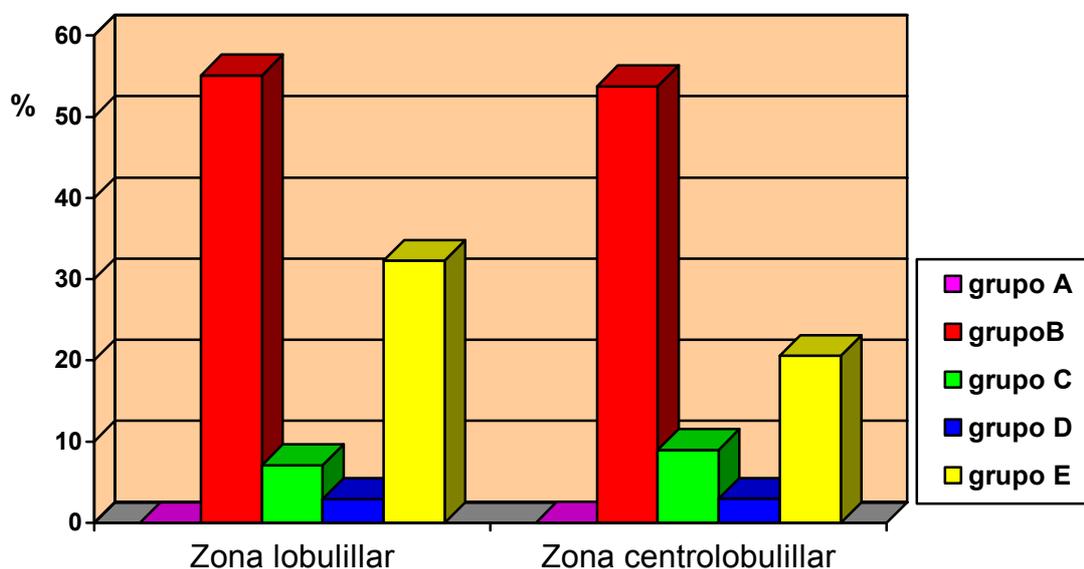
En la tabla 20 y la figura 30 se expresa el porcentaje de depósito graso en las zonas lobulillar y centrolobulillar de cada grupo experimental.

Tabla 20. Valoración cuantitativa del depósito graso

Grupos	Depósito graso lobulillar (%)	Depósito graso centrolobulillar (%)
A	0,0 ± 0,0 ^a	0,01 ± 0,01 ^a
B	55,11 ± 1,21 ^b	53,76 ± 2,10 ^b
C	7,10 ± 0,51 ^c	8,99 ± 0,51 ^c
D	2,92 ± 0,31 ^d	2,98 ± 0,38 ^d
E	32,30 ± 1,03 ^e	20,55 ± 1,29 ^e

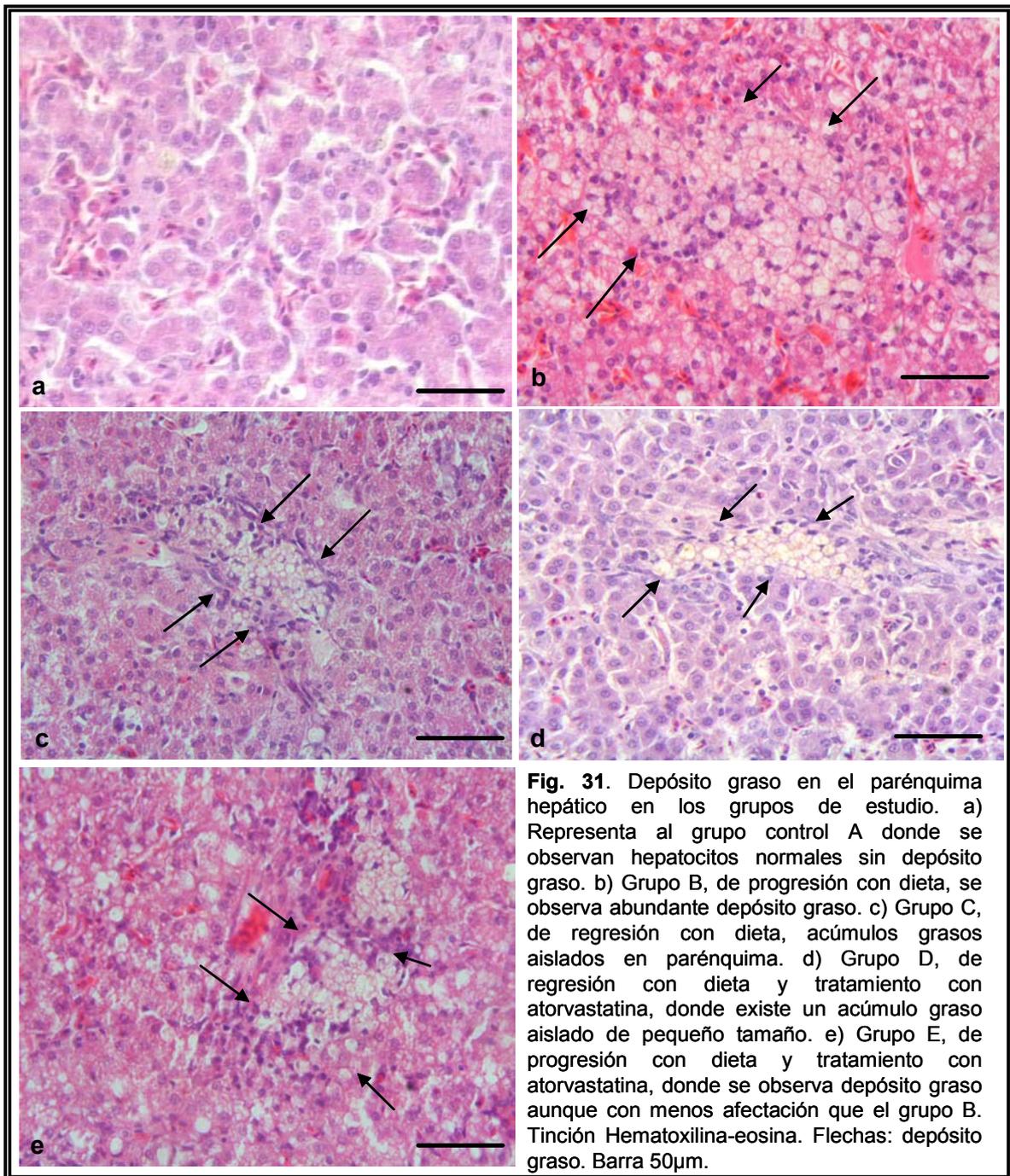
Valores expresados como media ± error estandar, n=100 por grupo experimental. Pruebas de Anova y Bonferroni. Para cada valor las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos.

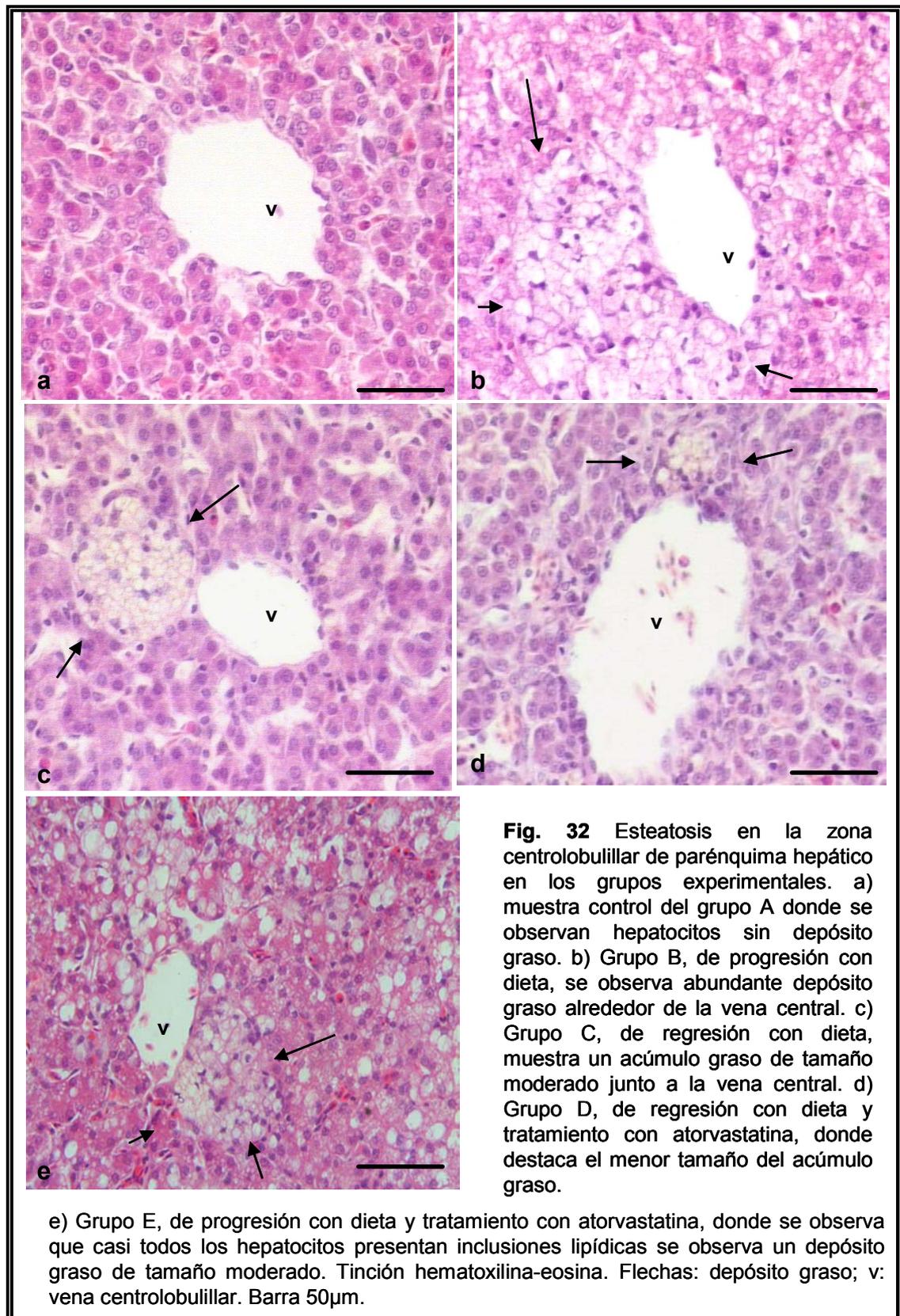
Fig. 30. Valoración cuantitativa del depósito graso



Se observa un mayor grado de afectación en el grupo B, seguido de los grupos E, C, D y A en este último no se apreció depósito graso. Tras realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas

($p < 0,005$) entre todos los grupos experimentales. Se confirma que el depósito graso es menor en los grupos E y D tratados con atorvastatina respecto a los grupos B y C no tratados. No se observaron diferencias entre la localización lobulillar y centrolobulillar dentro de cada grupo experimental. Las figuras. 31 y 32 muestran el depósito graso lobulillar y centrolobulillar en los grupos experimentales.





C) Valoración del tipo de esteatosis

En la tabla 21 se compara el porcentaje de hepatocitos afectados por la presencia de vacuolización grasa y de hepatocitos normales en cada grupo experimental, tras el análisis estadístico se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos; en el grupo A no se detectó la presencia de vacuolización en los hepatocitos, el grupo B presentó el mayor porcentaje de hepatocitos afectados (98,2%), seguido del grupo E (62,3%), C (40,7%) y D (35,2%).

En la tabla 22 se distingue el tipo de vacuolización (micro-, macrovacuolar) en los hepatocitos afectados. Tras el análisis estadístico no se observa el predominio de un tipo sobre otro en los diferentes grupos experimentales, pudiendo concluir que la vacuolización inducida en los grupos experimentales es de tipo mixto, sin existir diferencias entre hepatocitos con afectación micro o macrovacuolar.

Tabla 21. Porcentaje de hepatocitos no afectados y afectados por vacuolización grasa.

GRUPOS		No Afectado	Afectado	Total
A	Recuento	1000	0	1000
	% de Grupo	100%	0%	100%
B	Recuento	18	982	1000
	% de Grupo	1,8%	98,2%	100%
C	Recuento	593	407	1000
	% de Grupo	59,3%	40,7%	100%
D	Recuento	648	352	1000
	% de Grupo	64,8%	35,2%	100%
E	Recuento	377	623	1000
	% de Grupo	37,7%	62,3%	100%

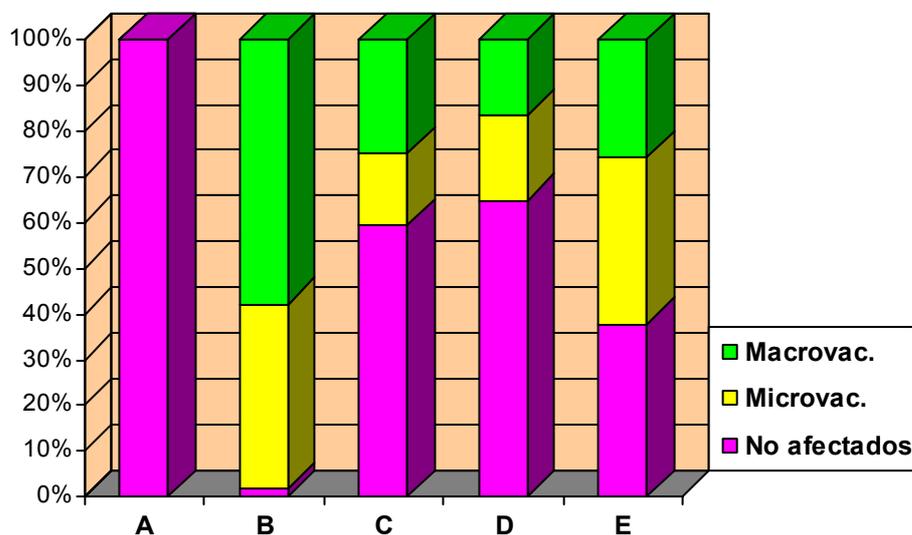
Datos expresados como % de hepatocitos, distribuidos según el tipo de afectación, en un total de 1000 hepatocitos por grupo.

Tabla 22 Porcentaje de hepatocitos normales y afectados por depósito graso micro- y macrovacuolar.

GRUPOS		TIPO DE VACUOLIZACIÓN			Total
		Normal	Microvacuolización	Macrovacuolización	
A	Recuento	1000	0	0	1000
	% de Grupo	100%	0%	0%	100%
B	Recuento	18	404	578	1000
	% de Grupo	1,8%	40,4%	57,8%	100%
C	Recuento	593	159	248	1000
	% de Grupo	59,3%	15,9%	24,8%	100%
D	Recuento	648	187	165	1000
	% de Grupo	64,8%	18,7%	16,5%	100%
E	Recuento	377	365	258	1000
	% de Grupo	37,7%	36,5%	25,8%	100%

Datos expresados como % de hepatocitos, distribuidos según el tipo de afectación, en un total de 1000 hepatocitos/grupo

Fig. 33. Porcentaje de hepatocitos no afectados y afectados por micro- y macrovacuolas.



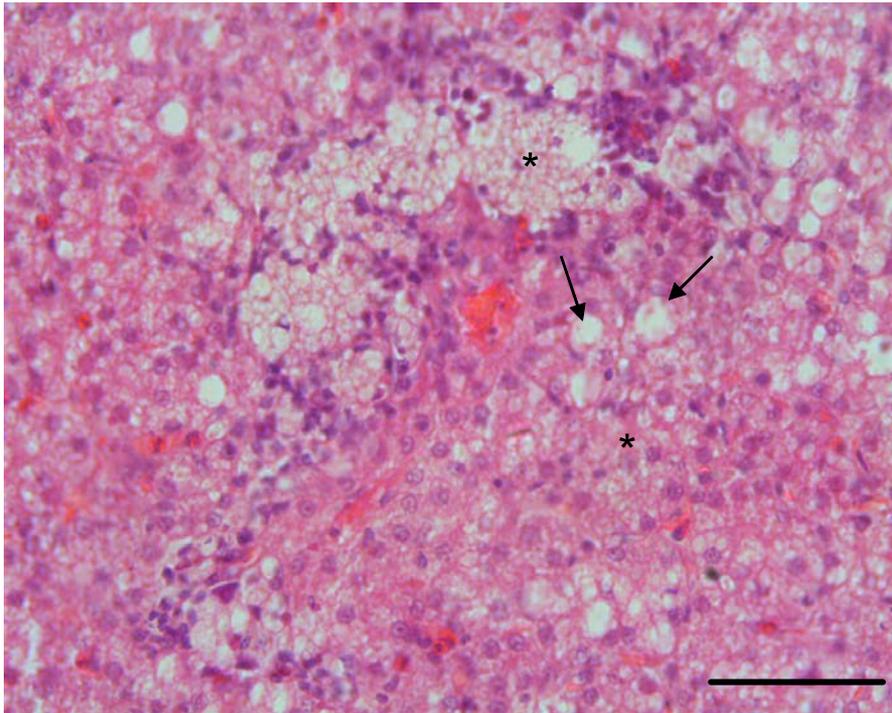


Fig.34 La imagen presenta ambos tipos de esteatosis macrovacuolar (flechas) y microvacuolar (*).
Barra: 50 μ m

13.3.3) RESULTADOS DE LA VALORACIÓN DEL INFILTRADO INFLAMATORIO

Hemos valorado el infiltrado inflamatorio contabilizando el número de focos por campo de observación de 200x, describiendo su aspecto clasificándolo y asignándole puntuaciones en difuso (1), moderado (2) y denso (3) y valorando la presencia/ausencia de lipogranulomas, y microgranulomas

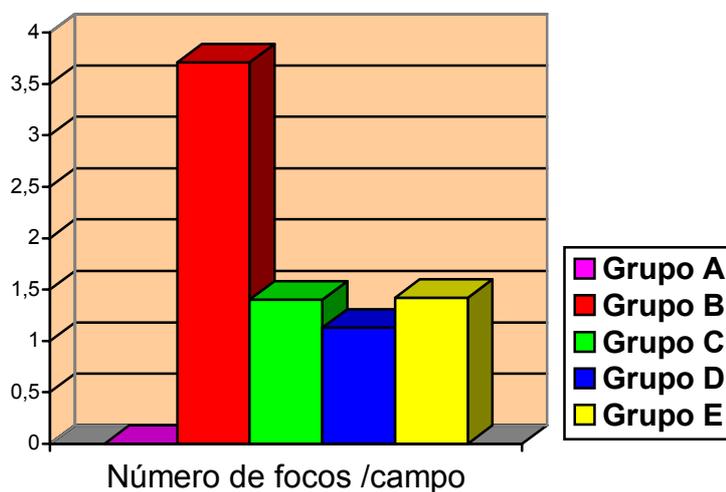
A ello hemos añadido la medida del área y diámetro máximo del foco así como la densidad del infiltrado inflamatorio. En la tabla 23 se representa el número de focos por campo, su aspecto, el área y diámetro máximo del mismo.

Tabla 23. Evaluación del foco inflamatorio

Grupos	Nº de focos por campo [▲]	Aspecto [■]	Área del foco (μm^2) [▲]	Diámetro máximo del foco (μm) [▲]
A	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
B	$3,71 \pm 0,16^b$	$2,37 \pm 0,78^b$	$8754,42 \pm 643,32^b$	$130,27 \pm 6,57^b$
C	$1,4 \pm 0,09^c$	2 ± 1^c	$4976,90 \pm 429,19^c$	$104,18 \pm 6,27^c$
D	$1,13 \pm 0,09^c$	1 ± 1^d	$3031,32 \pm 338,39^d$	$76,86 \pm 5,53^d$
E	$1,42 \pm 0,11^c$	2 ± 1^c	$3869,68 \pm 311,66^{c,d}$	$95,77 \pm 4,96^{c,d}$

Datos expresados como media \pm error estándar. N=100 por grupo experimental. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$). ▲ Welch y Games-Howell ■ Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Valoraciones 0: no existe, 1: difuso, 2: moderado, 3: denso

Tras contabilizar el número de focos por campo encontramos que existen diferencias significativas entre el grupo A, donde no hay ningún foco inflamatorio y el grupo B, de mayor afectación. Respecto a los demás grupos C, D y E no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 35).

Fig. 35. Número de focos por campo

La siguiente figura 36 muestra una imagen representativa del número de focos por campo en diversos grupos experimentales.

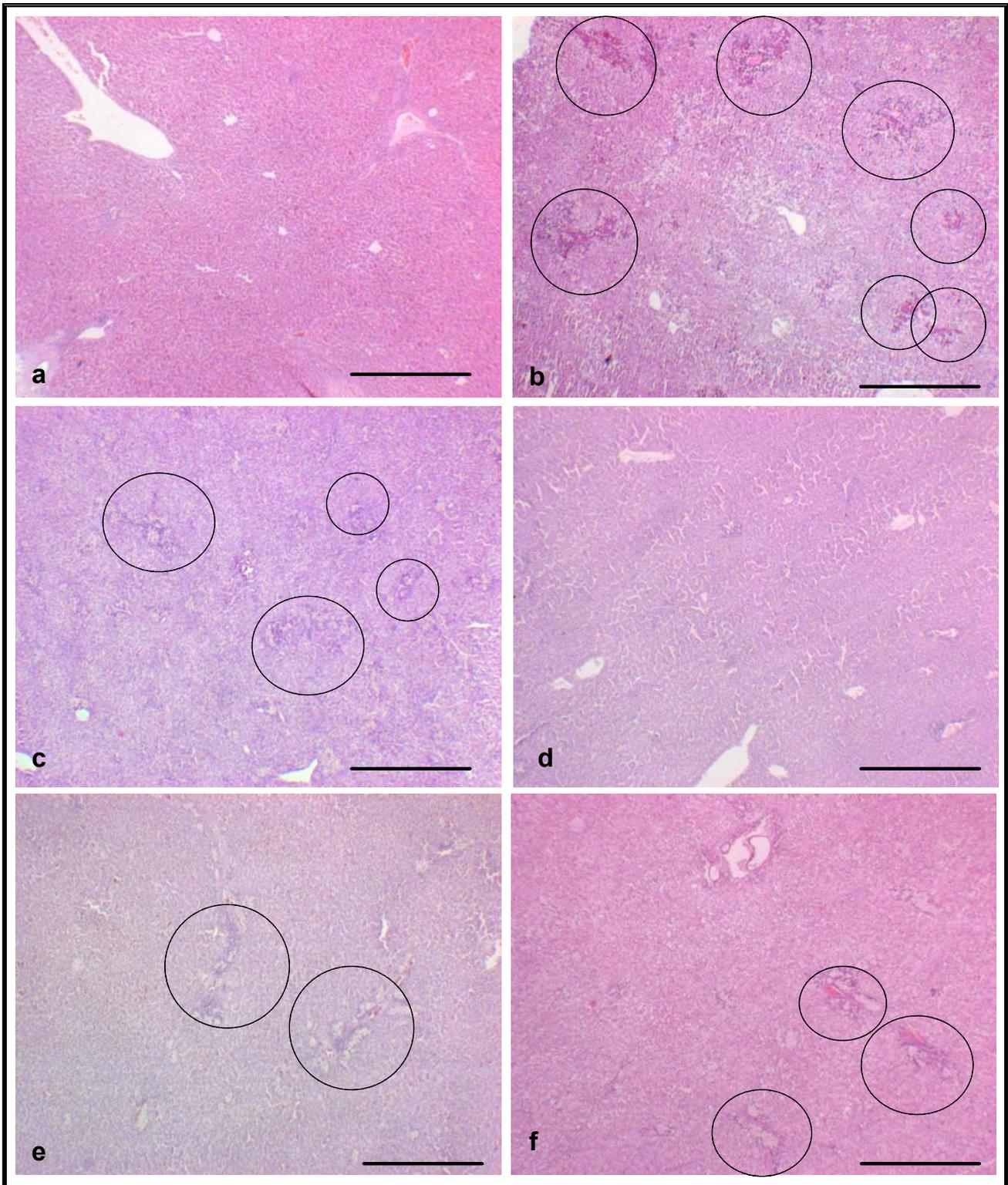
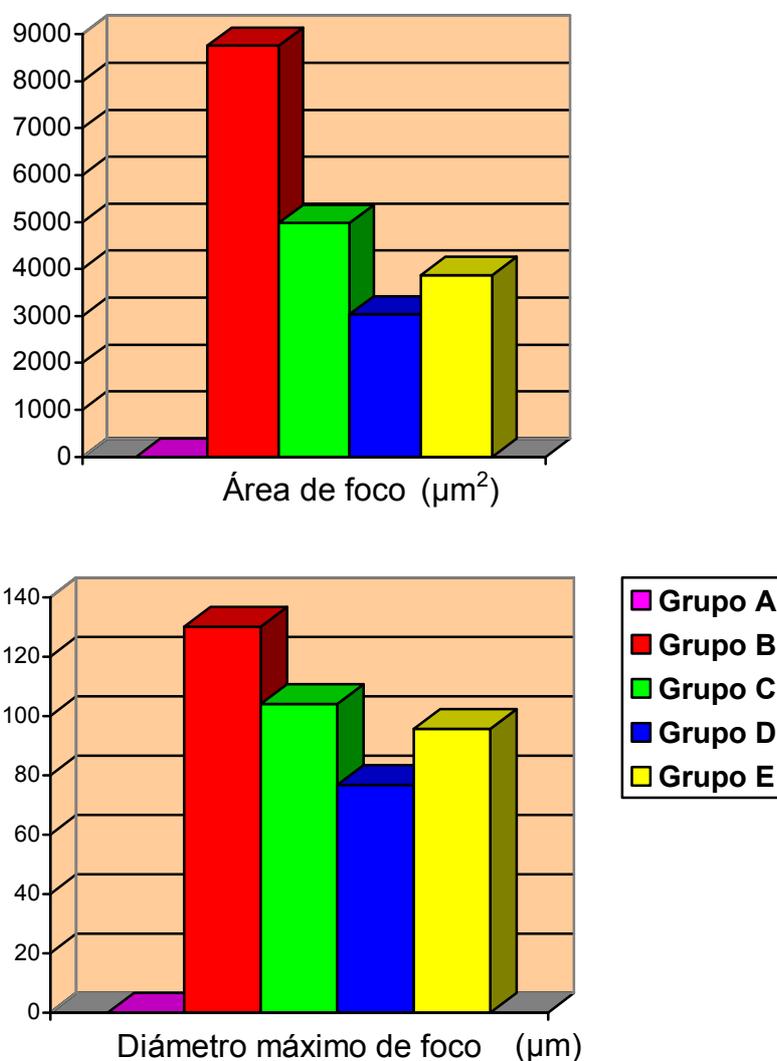


Fig. 36 Número de focos por campo, a) Grupo A no se observan focos inflamatorios, b) en el grupo B se observan focos densos dispersos en el parénquima que son más numerosos y de mayor tamaño que en el resto de los grupos, c) imagen representativa del grupo C, d-e) corresponden a muestras del grupo D, hay escasos o ningún foco, f) muestra del grupo E con tres focos inflamatorios. Círculos: Focos inflamatorios. Tinción Hematoxilina-eosina. Barra: 500µm.

Se midió el área y diámetro máximo de foco (Fig. 37). El valor más alto corresponde al grupo B, seguido de los grupos C, E y D; en el grupo A no se apreciaron focos inflamatorios. Tras realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre los grupos A y B con los demás grupos y entre los grupos C y D; no se apreciaron diferencias entre los grupos E y C ni entre los grupos E y D. Por este método se constata de forma más precisa el menor grado de inflamación en los grupos tratados.

Fig. 37. Medida del área y diámetro del foco



También hemos evaluado el infiltrado inflamatorio mediante el análisis de imagen a nivel lobulillar y portal. La tabla 24 y el gráfico 38 representa la densidad del infiltrado inflamatorio lobulillar y portal.

Tabla 24. Infiltrado inflamatorio lobulillar y portal

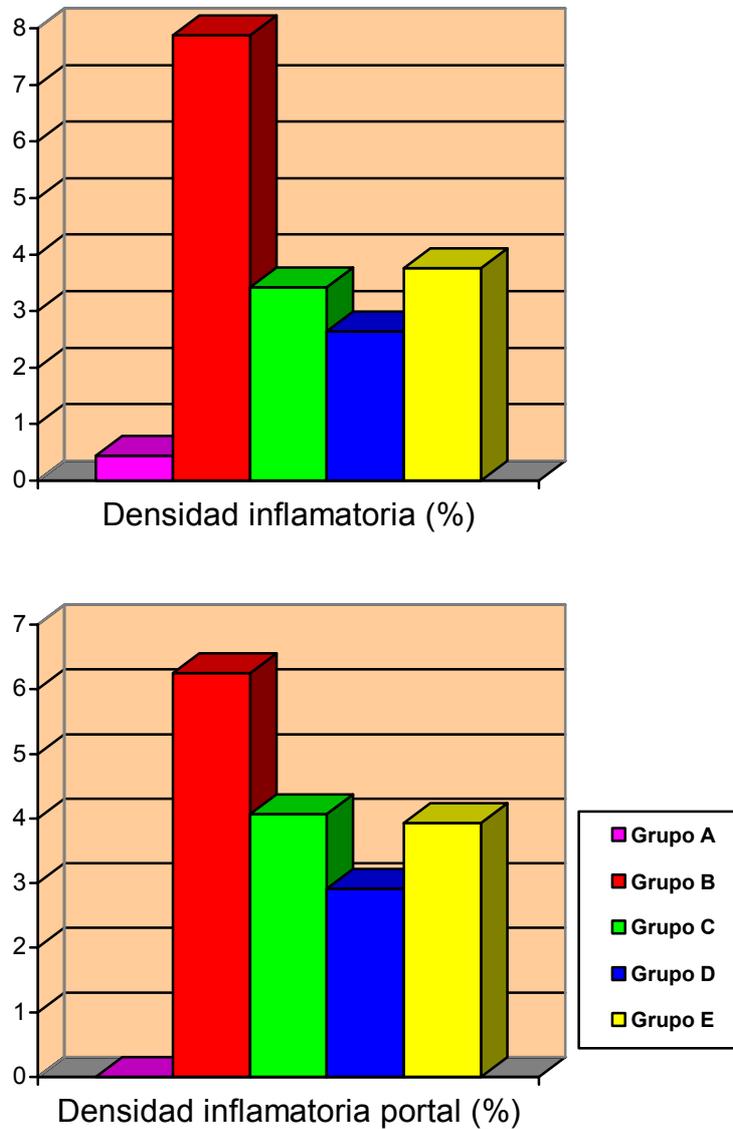
Grupos	Densidad inflamatoria lobulillar (%)	Densidad inflamatoria portal (%)
A	0,44 ± 0,15 ^a	0±0 ^a
B	7,88 ± 0,37 ^b	6,25±1,02 ^b
C	3,42 ± 0,22 ^{c,d}	4,07±0,43 ^b
D	2,98 ± 0,18 ^d	2,91±0,33 ^c
E	3,76 ± 0,24 ^c	3,93±0,33 ^b

Datos expresados como media ± error estándar. N=50 por grupo experimental. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se indican con las letras en superíndice: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$). Welch y Games-Howell. T de student dentro del mismo grupo no observa diferencias entre las zonas ($p < 0.05$).

El análisis estadístico de la densidad del infiltrado inflamatorio lobulillar mostraba un valor significativamente mayor en el grupo B y menor en A. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo D y E. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de regresión C y de regresión más fármaco D, ni entre C y E. Si comparamos los grupos de progresión B y E existe un menor grado de infiltrado inflamatorio estadísticamente significativo en E lo que pensamos se debe al efecto beneficioso de la atorvastatina; no se puede constatar entre los grupos de regresión C y D quizás por un mayor grado de dispersión ó necesidad de incrementar el número de muestras, ya que entre el grupo de regresión C y progresión E no se aprecia diferencias. Respecto al infiltrado portal salvo en el grupo A, en todos los demás grupos se observaron células inflamatorias con diferencias significativas entre los grupos B y D, pero no entre B, C y E que mostraron valores de infiltración portal similares. Tras

el análisis estadístico por zonas dentro de un mismo grupo no se observaron diferencias.

Fig. 38. Densidad del infiltrado inflamatorio lobulillar y portal.



Las figuras 39 a 42 muestran el infiltrado inflamatorio lobulillar y portal en los distintos grupos experimentales.

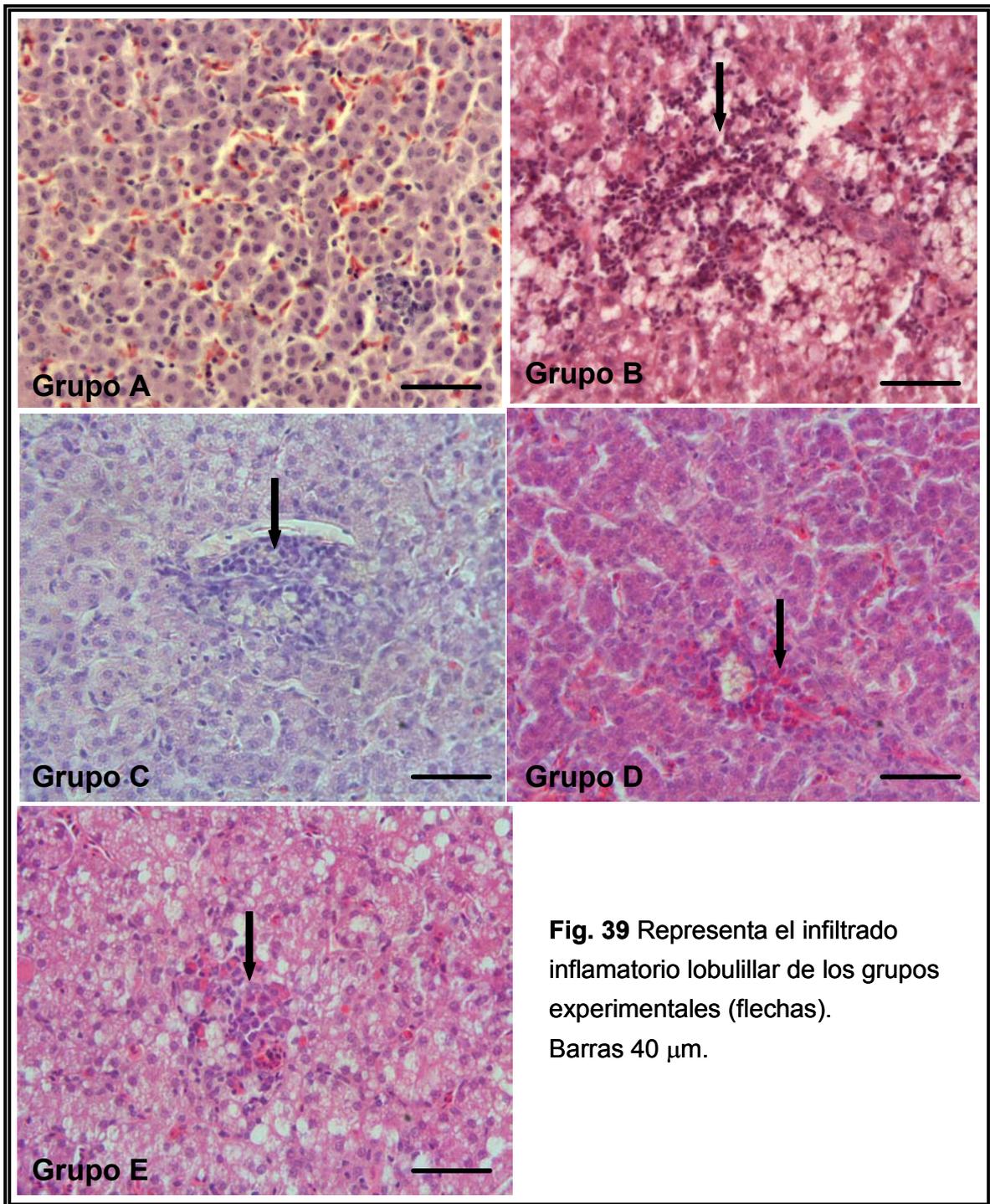


Fig. 39 Representa el infiltrado inflamatorio lobulillar de los grupos experimentales (flechas). Barras 40 μ m.

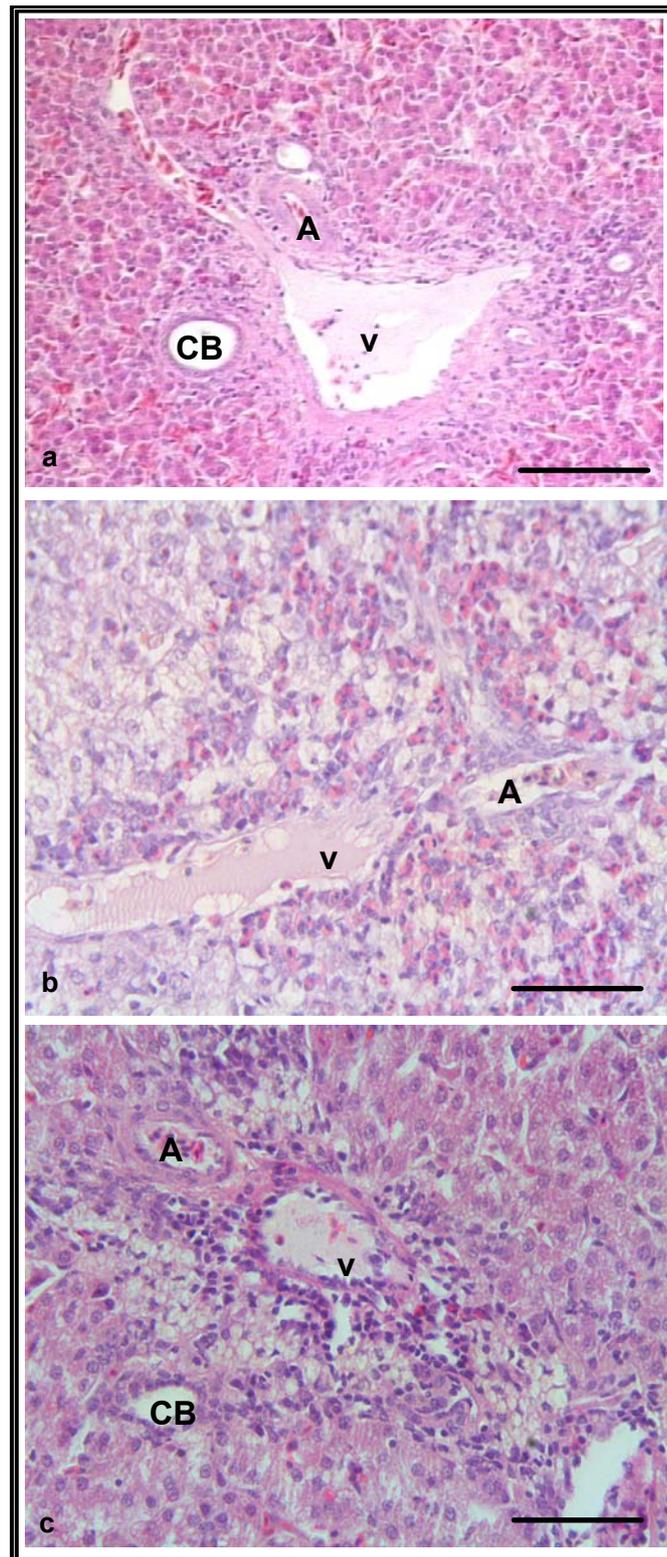
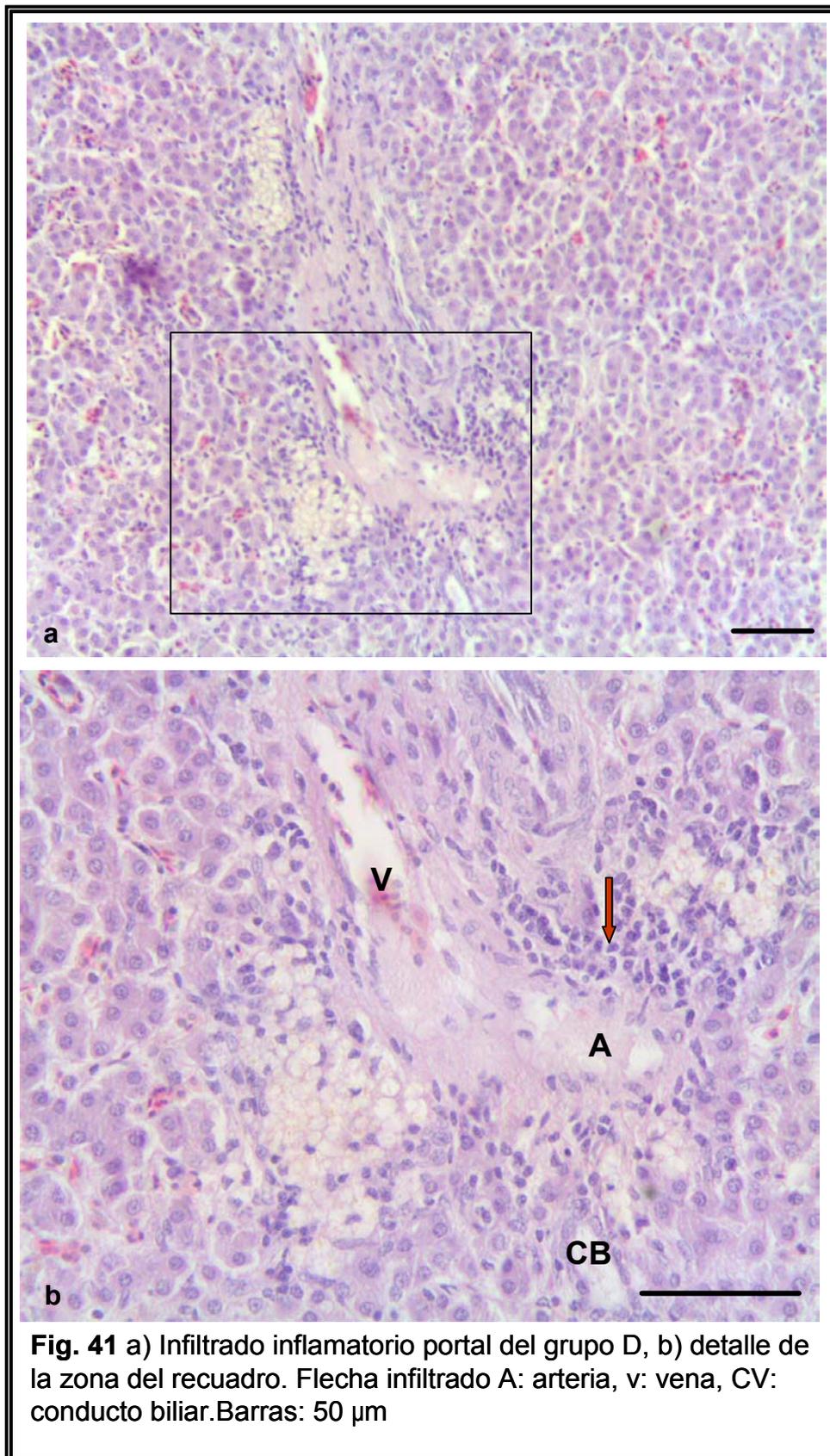


Fig. 40 Representa el infiltrado inflamatorio portal en los grupos experimentales. a) grupo A donde no existe infiltrado. b) grupo B donde si se observa infiltrado inflamatorio y c) grupo C donde se aprecia infiltrado inflamatorio. Barras: 50 μ m. A: arteria, v: vena, CV: conducto biliar.



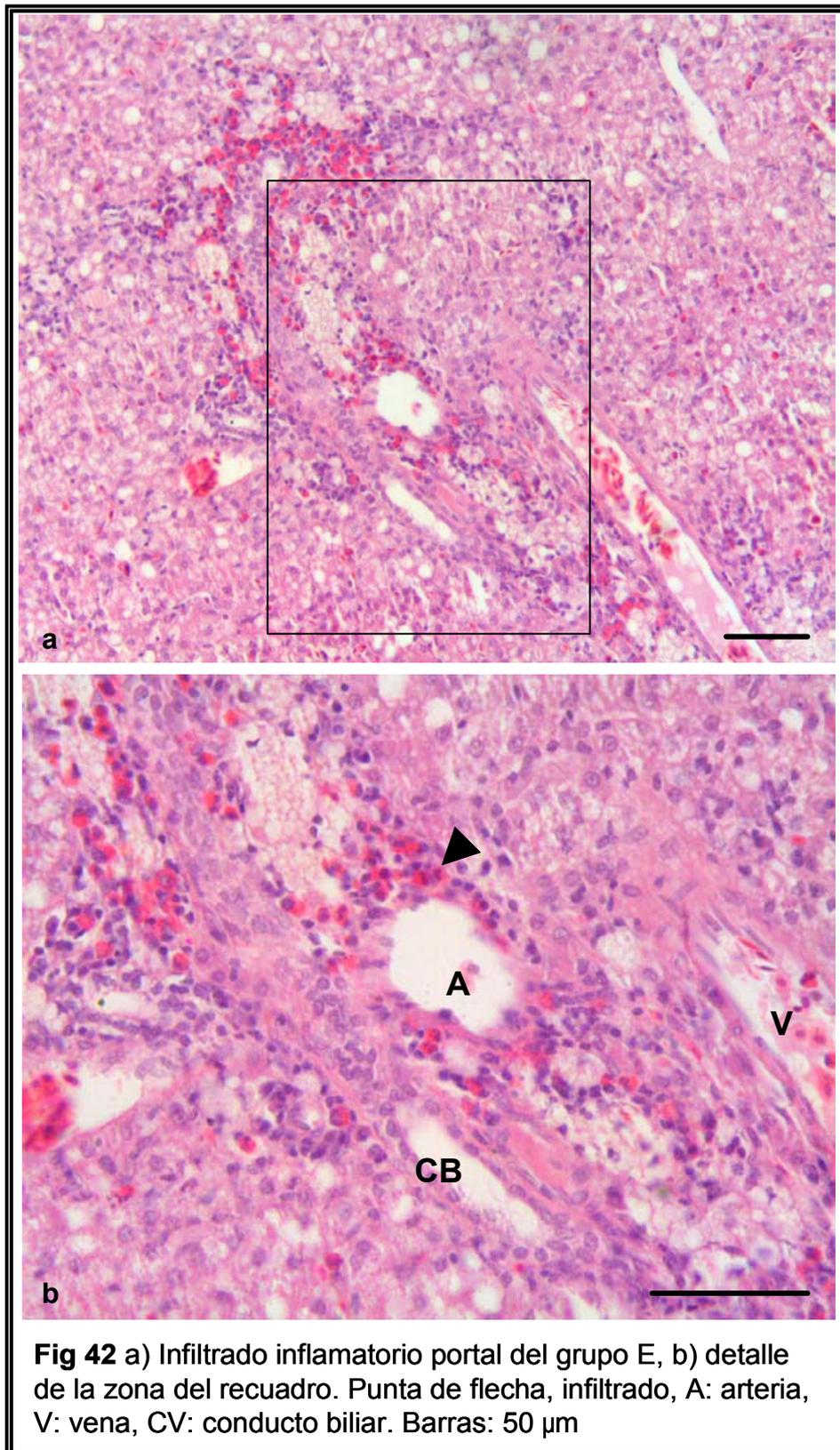
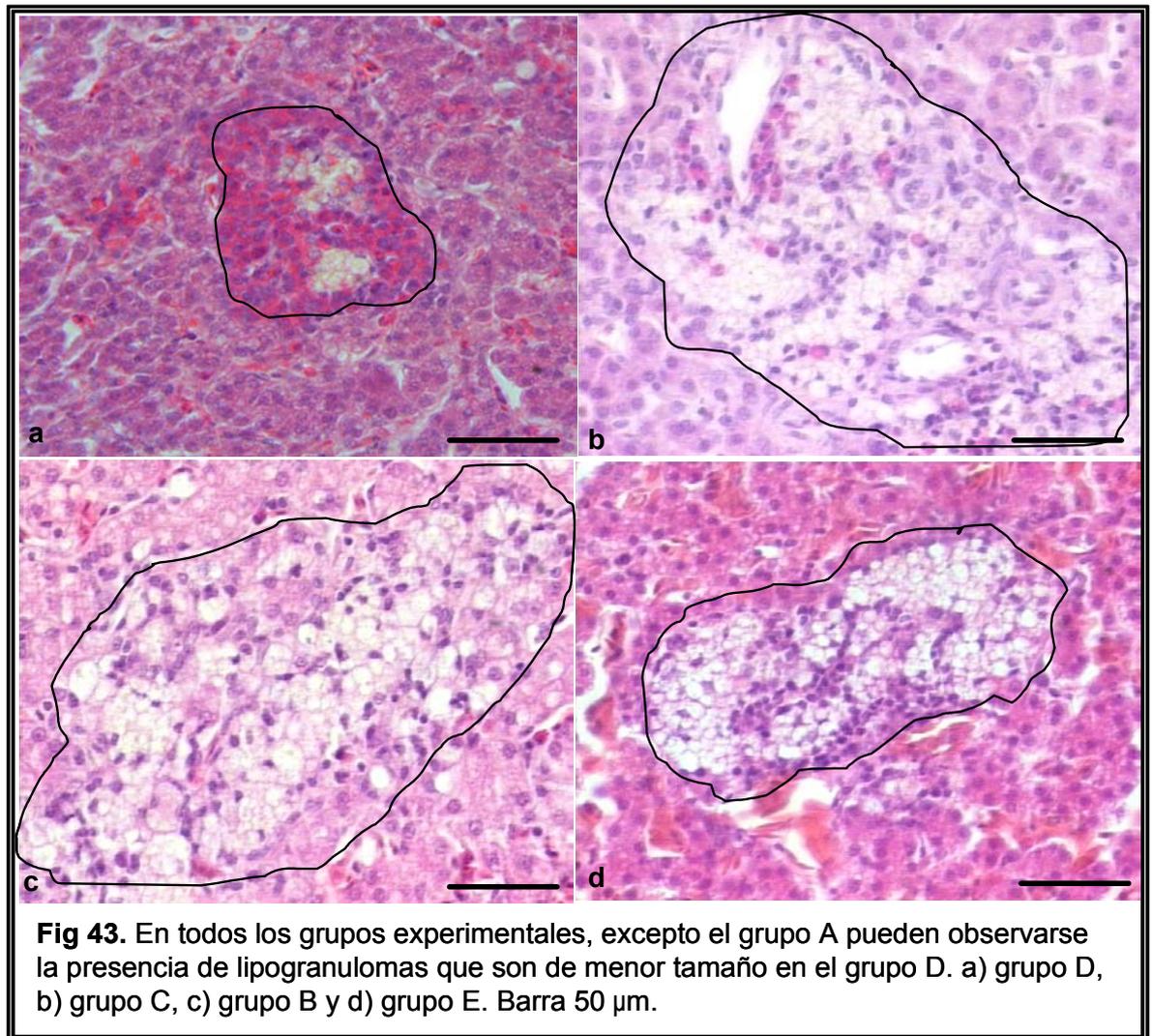


Fig 42 a) Infiltrado inflamatorio portal del grupo E, b) detalle de la zona del recuadro. Punta de flecha, infiltrado, A: arteria, V: vena, CV: conducto biliar. Barras: 50 μ m

Tras el análisis de estos cinco parámetros concluimos que ninguno establece una diferencia significativa entre el grupo C de regresión solo con dieta y el grupo E de progresión más tratamiento con atorvastatina. Todos ellos muestran una mayor afectación para el grupo de progresión con dieta grasa B y ausencia de inflamación en el grupo control A estadísticamente significativa. El grupo D de regresión más tratamiento con atorvastatina es el menos afectado después del grupo A. La medida del área y diámetro máximo del foco es menor que en los grupos C y E pero solo existe diferencia significativa respecto a C ($P < 0.005$). La medida del área y diámetro de foco por tanto muestra una diferencia significativa ($p < 0,005$) entre los grupos de regresión (C y D) y de progresión (B y E) y no entre los grupos tratados con atorvastatina D y E. La densidad inflamatoria del grupo D es menor que en los grupos experimentales C y E, pero solo se observa significación estadística respecto al grupo de progresión más atorvastatina E. La densidad del infiltrado inflamatorio no muestra por tanto diferencias entre los grupos de regresión C y D aunque si entre los de progresión B y E.

Otros parámetros analizados en el sistema de puntuación de la EGHNA (“Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease”) indicativos de inflamación son la presencia de micro- y lipogranulomas, este sistema le asigna un valor de 0 (ausentes) y 1 (presentes). Solo se encontraron diferencias significativas entre el grupo A y los demás grupos. En los grupos B, C, D y E no se encontraron diferencias en el grado de inflamación ya que todos presentaban un valor de 1 y por este método no se pueden establecer diferencias respecto al grado de inflamación. La figura 43 representa la imagen de lipogranulomas en los grupos experimentales.



13.3.4) VALORACIÓN DEL DAÑO HEPATOCELULAR

Como datos indicativos de lesión celular sólo se ha hallado la presencia de balonización, no se ha encontrado por este método la presencia de Hialina de Mallory, megamitocondrias, glucogenización, cuerpos acidófilos ni macrófagos pigmentados. Se considera la balonización la única lesión necesaria para el diagnóstico, el resto son lesiones usuales pero no necesarias.

Para la balonización se realizó una valoración semicuantitativa, se le asigna un valor entre 0 y 2. Si no está presente la lesión, se le asigna valor 0, 1 si es poco frecuente y 2 si son numerosas. El análisis estadístico indica diferencias entre todos los grupos siendo mayor en B

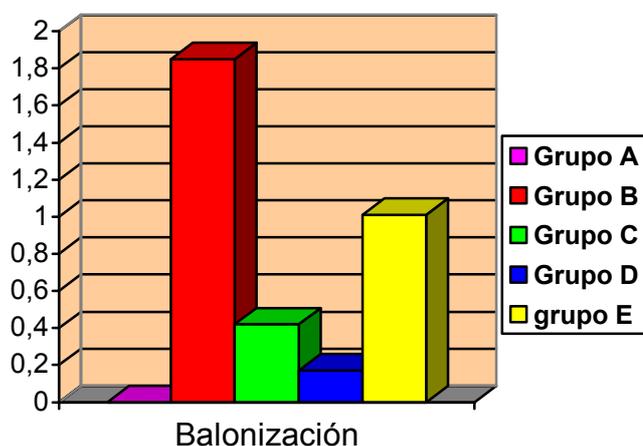
seguido de E, C, D y A. Tanto en los grupos de progresión como de regresión tratados con atorvastatina existe un menor grado de lesión hepatocelular (Tabla 25).

Tabla 25. Balonización

Grupos	A	B	C	D	E
Balonización	0 ± 0 ^a	1,85 ± 0,02 ^b	0,42 ± 0,04 ^c	0,17 ± 0,02 ^d	1,01 ± 0,05 ^e

Los valores se representan como media ± error estandar para n=100 por grupo experimental. Letras distintas indican diferencias significativas entre todos los grupos, tras el análisis estadístico mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Los valores son 0: ausencia, 1: pocos, 2: numerosos.

Fig. 44. Balonización.



13.4) ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD (NAS)

Se ha estimado el valor NAS-cualitativo y el NAS-cuantitativo, los resultados se muestran en la siguiente tabla

Tabla 26. Resultados de los valores NAS

Grupos	A	B	C	D	E
NAS cualitativo	0 ± 0 ^a	5,6 ± 0,09 ^b	3 ± 0,08 ^c	2 ± 0,08 ^d	4,4 ± 0,09 ^e
NAS cuantitativo	0 ± 0 ^a	7,13 ± 0,12 ^b	2,90 ± 0,14 ^c	1,83 ± 0,11 ^d	4,58 ± 0,16 ^e

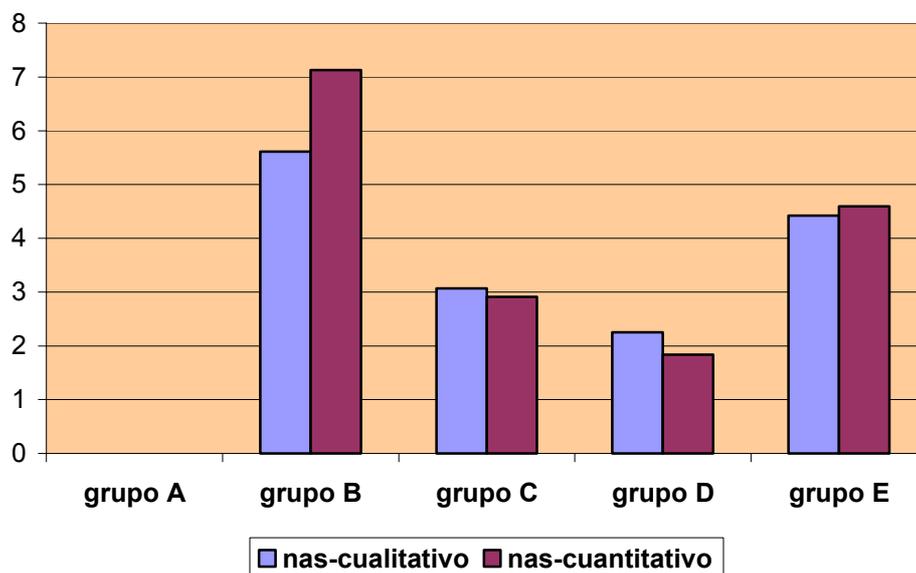
Los valores se expresan como media ± error estándar para N = 100 por grupo experimental. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas tras las pruebas Anova y Bonferroni. Rango de valores 0-8.

El NAS-cualitativo se ha obtenido como está descrito en la bibliografía, considerando el depósito graso evaluado de forma semicuantitativa, el número de hepatocitos balonizados y el número de focos por campo 200X. El NAS-cuantitativo lo hemos obtenido mediante la aplicación del análisis de imagen. Para la esteatosis hemos asignado una puntuación similar (0-3), 0: depósito graso de 0 a < 5%; 1: de 5 a 33%; 2: >33 a 66% y 3: >66%, pero en la asignación de esta puntuación hemos considerado los valores cuantitativos obtenidos. Para la balonización hemos seguido igual criterio de asignación de 0 a 2 según la presencia de ningún (0), pocos (1) y muchos (2) hepatocitos balonizados. Para la inflamación hemos considerado la densidad inflamatoria lobulillar asignando un valor de 0 a 3. 0: si no hay infiltrado inflamatorio; 1: para un infiltrado <2,5%; 2: si el infiltrado se sitúa entre 2,5- 5,2% y 3: si el infiltrado es > al 5,2%. Estos valores, que representan los puntos de corte, los hemos obtenido considerando los valores medios de los mínimos y máximos del infiltrado inflamatorio en los grupos experimentales.

Por ambos cálculos de NAS se observan diferencias significativas en el grado de actividad inflamatoria entre todos los grupos experimentales, siendo mayor en B y seguido de E, C, D y A. Se constata mayor grado de actividad de la enfermedad en los grupos de progresión (B y E) respecto a los de regresión de retirada de dieta (C y D) y también un menor grado de actividad en los animales tratados (E y D) respecto a los no tratados (B y C).

Para el NAS-cuantitativo encontramos un contraste mayor entre los valores máximo (grupo B) y mínimo (grupo A ó D) por lo que creemos que este cálculo propuesto para NAS tiene mayor capacidad de discriminación en pequeñas diferencias entre los grupos.

Fig. 45. NAS



13.5) RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS. ANÁLISIS CUANTITATIVO

- **El grupo A** control sano, no presenta esteatosis siendo este del 0% evaluado de forma semicuantitativa directamente con el microscopio óptico, como cuantitativa con equipo de análisis de imagen; tampoco se observaron células inflamatorias en el parénquima. Todos los hepatocitos son uniformes de tamaño conservado y no se aprecian signos de lesión hepatocitaria, ello se corresponde con un índice de actividad histológica o NAS igual a 0. Son en su mayoría hígados pequeños de color rojo vinoso y superficie brillante a los que se les ha asignado un grado 0 de lesión macroscópica.
- **El grupo B** presenta de forma significativa un mayor depósito graso con una media del 55,11% en la valoración cuantitativa del depósito a nivel lobulillar y un grado III (67% de las muestras evaluadas) en la valoración semicuantitativa. Este depósito es de tipo mixto macro- y microvacuolar. Respecto al grado de inflamación es el más afectado con mayor número de focos, área

de infiltrado inflamatorio y mayor densidad inflamatoria, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Aparece el mayor grado de afectación hepatocelular con numerosos hepatocitos balonizados. Todo ello arroja el mayor índice de actividad histológica igual a 7,13. Mayoritariamente se le asignó el mayor grado de lesión macroscópica, grado III hígado de tonalidad ocre-mate, tumefacto, de superficie irregular sin brillo y con estrías amarillentas aunque por este método no se encontraron diferencias con el grupo E.

- **El grupo E** es el segundo en afectación con una diferencia estadísticamente significativa respecto al depósito graso, fue de un 32,30% en la zona lobulillar y en la clasificación semicuantitativa se le asignó un grado de lesión II-III en igual proporción (44,4% de las muestras evaluadas). El depósito es de tipo mixto con predominio de la forma microvacuolar. No se encontraron diferencias respecto al número de focos, área y diámetro máximo de foco con los grupos de regresión C y D, aunque si con A y B. También se mostraron diferencias respecto a la densidad inflamatoria con todos los grupos salvo con C. Son frecuentes los hepatocitos balonizados. Es el segundo en el grado de afectación de la enfermedad con un índice de actividad NAS-cuantitativo igual a 4,58. Macroscópicamente se le asignó un grado II ó moderado de lesión que correspondía a un hígado marrón oscuro mate de tamaño aumentado y superficie rugosa. A nivel macroscópico no se diferenciaba de los grupos B y C.
- **El grupo C** ocupa el tercer lugar de afectación con un depósito graso del 7,10% a nivel lobulillar y un grado II (en el 72% de las muestras evaluadas) de la valoración semicuantitativa, la esteatosis hepática era de tipo mixto macro y microvesicular. No se encontraron diferencias con respecto al número de focos por campo y densidad inflamatoria con los grupos D y E. El área y diámetro máximo de foco fue mayor significativamente en C respecto a D y sin diferencias significativas respecto a E. Son escasos los hepatocitos balonizados. El resultado del índice NAS-cuantitativo fue igual a 2.90. Macroscópicamente se le asignó un grado de

lesión I-II (31 y 28% respectivamente) o leve hígado de color más pálido que el grado 0 y superficie más granular y menos brillante, con este método no se encontró diferencias respecto a D y E.

- **El grupo D** fue el menos afectado después de A, existía mínimo depósito graso en torno al 2,92% en la zona lobulillar y de grado I en un 63 % de las muestras evaluadas de forma semicuantitativa, también mayoritariamente de tipo mixto macro- y microvacuolar. Aunque presentaba los valores más bajos de inflamación, el número de focos por campo no fue significativamente inferior respecto a C y E, el área y diámetro de foco fue significativamente inferior a C y similar a E y la densidad inflamatoria dio un valor similar a C y significativamente inferior a E. El número de hepatocitos balonzados fue escaso. El índice de actividad NAS-cuantitativo fue del 1.83. Macroscópicamente se le asignó de forma mayoritaria un valor de I (48% de las muestras) o grado leve sin diferencias respecto a C.

Tabla 27. Resumen del análisis cuantitativo de las características histológicas

CARACTERÍSTICA	GRUPOS					
	A	B	C	D	E	
Esteatosis (%)						
Depósito Lobulillar	0,0	55,11	7,10	2,92	32,30	
Depósito Centrolobulillar	0,01	53,76	8,99	2,98	20,55	
Tipo de esteatosis	Macrovacuolar	0	40	23	16	27
	Microvacuolar	0	34	14	17	39
	No afectados	100	26	63	67	34
Inflamación						
Nº focos campo	0	3,71	1,4	1,13	1,42	
Área foco inflamatorio (μm^2)	0	8754,42	4976,90	3031,32	3869,68	
Diámetro máximo del foco (μm)	0	130,27	104,18	76,86	95,77	
Inflamatoria lobulillar (%)	0,44	7,88	3,42	2,64	3,76	
Inflamación portal (%)	0	6,25	4,07	2,91	3,93	
Microgranulomas 0-1	0	1	1	1	1	
Lipogranulomas 0-1	0	1	1	1	1	

Lesión hepatocitaria					
Balonización	0	1,85	0,43	0,17	1,01
Cuerpos acidófilos	0	0	0	0	0
Megamitocondrias	0	0	0	0	0
Macrófagos pigmentados	0	0	0	0	0
Hialina de Mallory	0	0	0	0	0
Núcleos glucogenados	0	0	0	0	0
Índice de actividad de la enfermedad (NAS)					
NAS-cualitativo	0	5,6	3	2	4,4
NAS-cuantitativo	0	7,13	2,9	1,83	4,58

El índice de actividad histológica o NAS-cuantitativo fue mayor en B (7,13), seguido de E (4,58), C (2,90), D (1,83) y A (0), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) entre todos los grupos. Ello indica una menor lesión histológica en los grupos E de progresión más atorvastatina y D de regresión más atorvastatina que los grupos B de progresión y C de regresión sin fármaco respectivamente.

13.5) ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO

La matriz de la metaloproteinasa 9 (MMP9) presentó una reacción moderada en el citoplasma de los hepatocitos; las muestras del grupo A son ligeramente menos reactivas que los demás grupos. La reactividad a MMP9 también se encuentra asociada a grandes depósitos grasos especialmente en las muestras de los grupos B, C y E, mientras que los depósitos grasos del grupo D no fueron reactivos. (Fig 46).

El inhibidor de la matriz de la metaloproteinasa 3 (IMP3) mostró menor reactividad que MMP9, encontrándose dicho marcaje en el citoplasma de los hepatocitos. (Fig 47). No se observan diferencias entre las reactividades en los diferentes grupos experimentales.

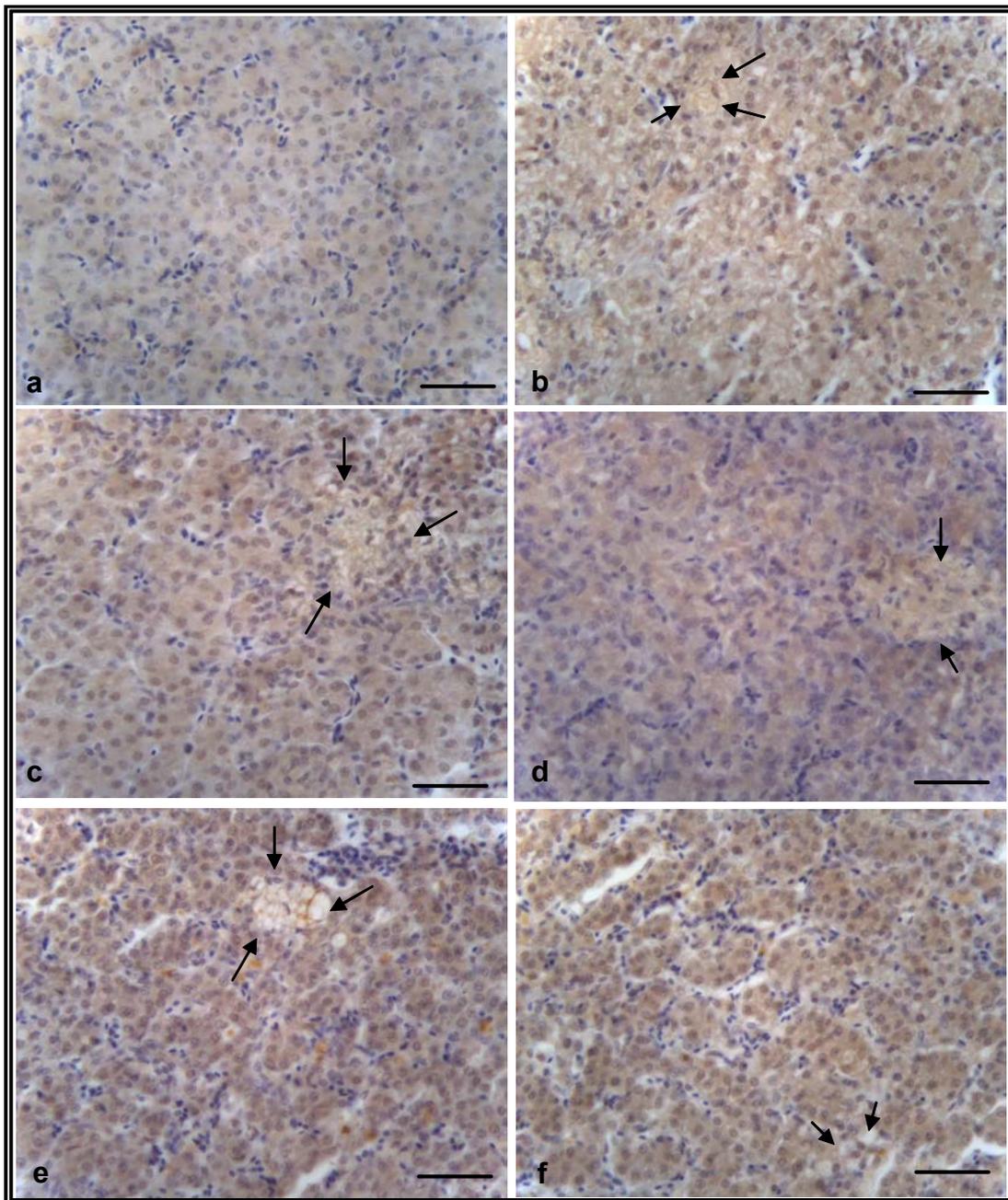


Fig 46. Inmunorreactividad a MMP9 en los grupos experimentales. a).- Grupo A, control sano, b) Grupo B, control hiperlipidémico, c) grupo C, regresión espontánea, d) grupo E, progresión con atorvastatina. e-f). Grupo D, regresión con atorvastatina. Se observa una moderada reactividad en el citoplasma de los hepatocitos. Flechas: depósitos grasos. Barras 40 μ m

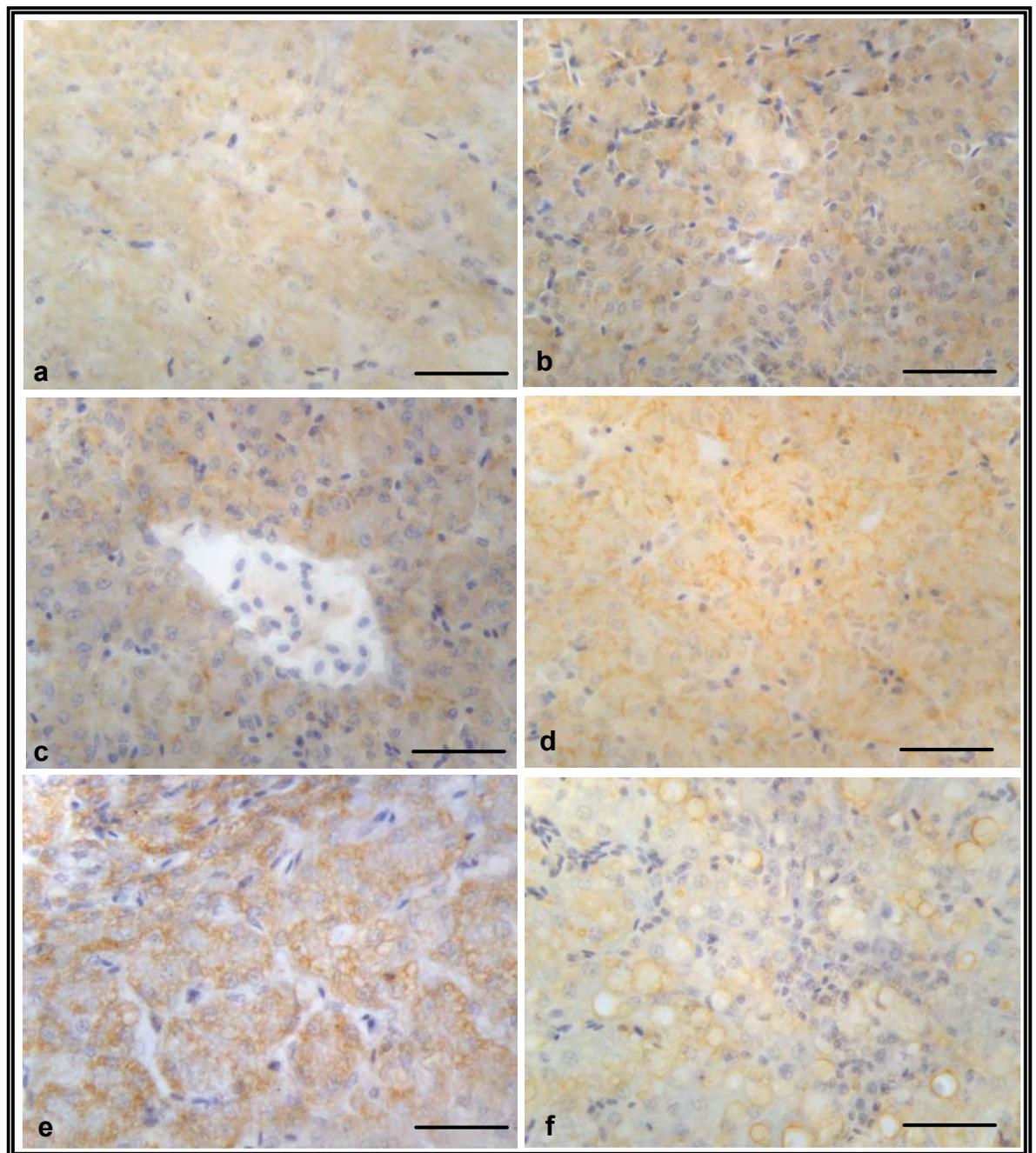


Fig 47. Inmunorreactividad a IMP3. se observa un heterogéneo marcaje en el citoplasma de los hepatocitos. a) grupo A, control sano, b) grupo D, regresión con atorvastatina, c-d) grupo B, control hiperlipémico, e) grupo C, regresión espontánea, f) grupo E, progresión con atorvastatina.. Barras: 40 μ m

13.6) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En el análisis ultraestructural de las muestras destacamos las siguientes características:

El hepatocito del grupo A, presenta la ultraestructura típica de un hepatocito sano, distinguimos la membrana celular en sus vertientes lateral, vascular y biliar. La membrana lateral limita con el hepatocito contiguo y no tiene microvellosidades. La membrana del polo vascular tiene microvellosidades largas y delgadas y la membrana del polo biliar también tiene microvellosidades que se extienden hacia la luz del canalículo biliar pero a diferencia de las anteriores son más cortas y anchas.

El canalículo biliar es un espacio extracelular angosto rodeado por los hepatocitos del polo biliar con fuertes uniones entre ellos, la membrana celular del polo biliar es la parte de la membrana más pequeña del hepatocito y es la unidad estructural a partir de la cual comienza a formarse el canalículo biliar. Este canalículo hace su recorrido entre los hepatocitos y se reconoce fácilmente por las microvellosidades que protruyen hacia su luz. El citoplasma adyacente a la membrana de las microvellosidades es más electrodensó que el resto.

En la siguiente imagen (Fig. 48) se observan cuatro hepatocitos que delimitan un canalículo biliar y la membrana lateral entre los hepatocitos adyacentes.

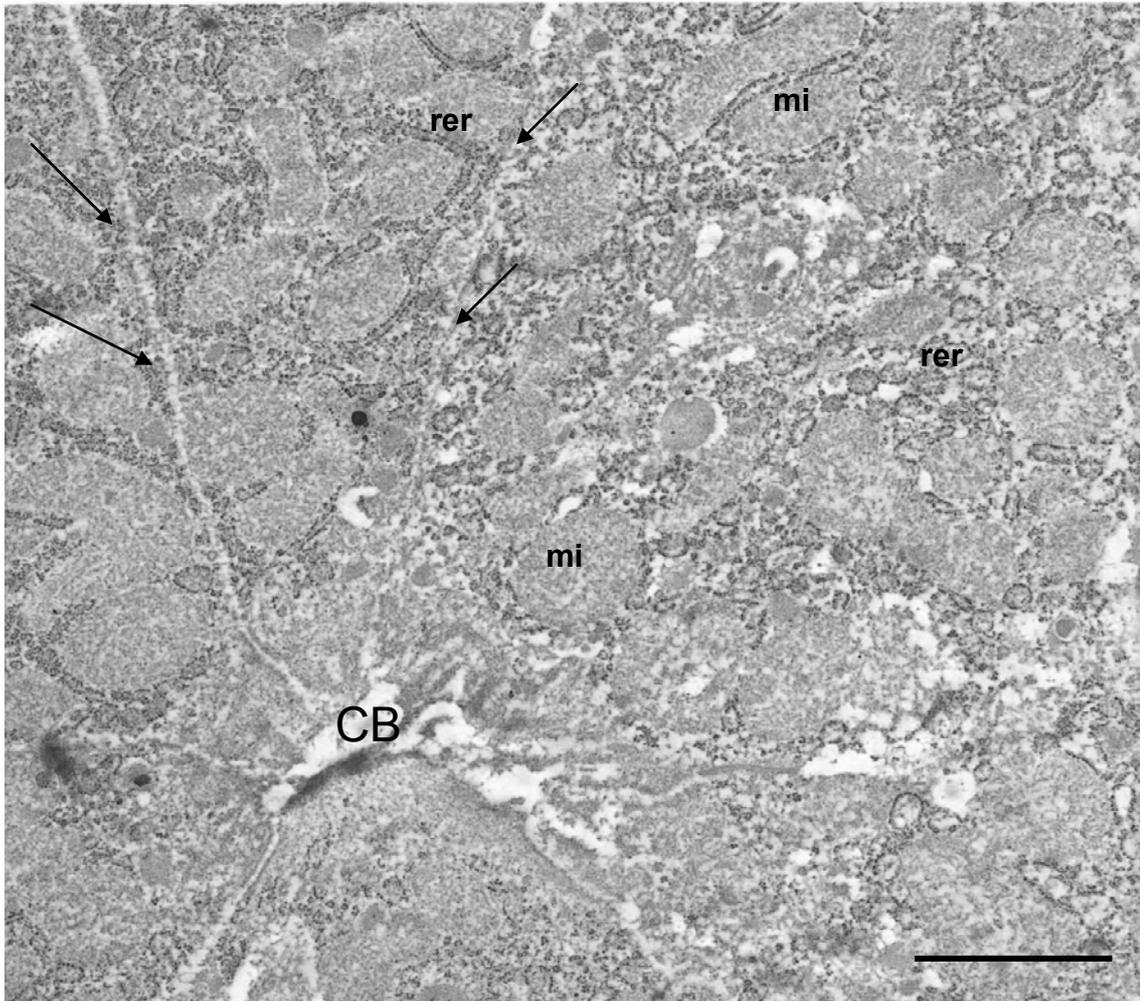


Fig 48. Canalículo biliar (CB) delimitado por cuatro células hepáticas, se puede apreciar la luz biliar hacia donde se extienden las microvellosidades, la membrana lateral de los hepatocitos señalada con flechas y el retículo endoplasmático rugoso rodeando a las mitocondrias que ocupan la mayor parte del citoplasma. rer: retículo endoplasmático rugoso; mi: mitocondria; CB: canalículo biliar. Barra: 2 μ m.

El hepatocito a través de las microvellosidades de su membrana vascular entra en contacto con el endotelio sinusoidal. Entre el hepatocito y el sinusoides se distingue el espacio de Disse de aproximadamente 1 μ m (Fig 49). Suele ser frecuente la presencia de vesículas densas asociadas a la base de estas microvellosidades.

El endotelio sinusoidal es fenestrado y de forma irregular, estas fenestraciones están a veces cerradas por una fina membrana aunque

otras veces son grandes y están lo suficientemente abiertas para que prolongaciones citoplasmáticas de células migratorias pasen a su través hacia el espacio de Disse.

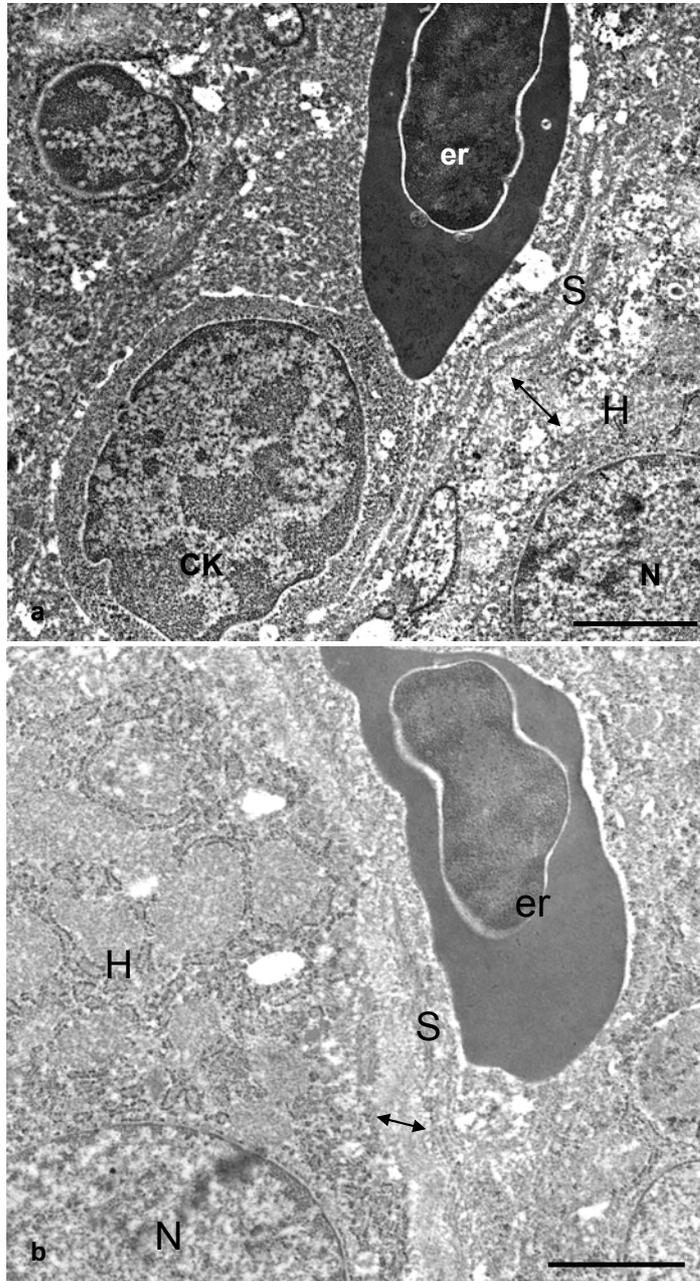


Fig. 49 Membrana vascular del hepatocito en contacto con el endotelio sinusoidal a través del espacio de Disse (flecha). Se observa un eritrocito en la luz sinusoidal. H:hepatocito; S: sinusoide; er: eritrocito; N: núcleo; CK: célula de Küpffer. Barras: 1,58 μ m

Las células de Küpffer son poco numerosas y muy difíciles de encontrar, pueden identificarse porque son más grandes que las células endoteliales y están en continuidad con ellas contribuyendo en la formación de la línea sinusoidal. No tienen microvellosidades pero tienen pseudópodos que protruyen hacia el espacio de Disse y a la luz sinusoidal.

En cada hepatocito se distingue un único núcleo grande y esférico de 4-6 μm de diámetro aproximadamente y suele situarse hacia el polo vascular, posee un moderado número de poros en su membrana. La estructura nuclear es bastante típica, generalmente la cromatina tiende a estar dispersa en el nucleoplasma aunque pueden verse pequeñas condensaciones en la periferia del núcleo en asociación con la membrana interna. En cada núcleo se suelen distinguir uno o dos nucleolos bien diferenciados.

El citoplasma del hepatocito tiene una electrodensidad moderada, se distinguen zonas electrolúcidas y electrodensas, la zona más electrodensa es rica en orgánulos destacando las mitocondrias y el retículo endoplasmático rugoso.

La mitocondria es el orgánulo predominante, posee una forma y tamaño variable, la mayor parte son cilíndricas y varían de longitud entre 1 μm a 10 μm con un diámetro uniforme entorno a 2 μm . Se suelen encontrar diseminadas uniformemente en el citoplasma y en ocasiones relacionadas con la membrana plasmática y alrededor del núcleo.

El retículo endoplasmático rugoso está bastante desarrollado y es frecuente que forme una estructura revestimiento que rodea a las mitocondrias estando en estrecha relación con ellas (Fig. 50).

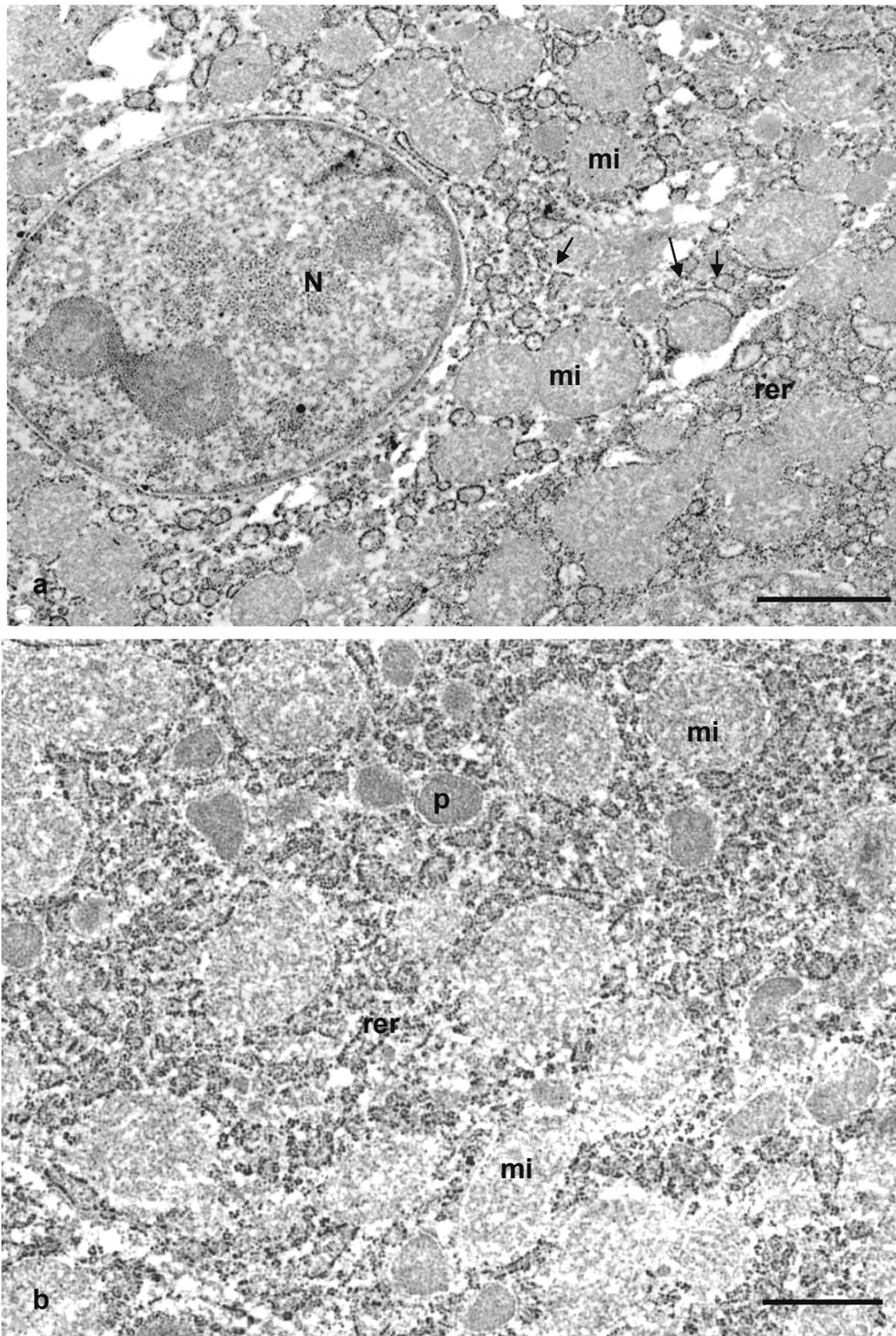


Fig. 50 a) Citoplasma del hepatocito, las mitocondrias están rodeadas por cisternas del retículo endoplasmático rugoso. En el núcleo se distingue la doble membrana nuclear con múltiples porosidades, la cromatina diseminada en el nucleoplasma y dos núcleolos bien diferenciados. Barra: 1,58 μm b) Citoplasma con mitocondria, retículo endoplasmático rugoso y gránulos densos redondeados que son los peroxisomas. Barra: 1 μm . N: núcleo; p: peroxisomas; mi: mitocondria; rer: retículo endoplasmático rugoso

El aparato de Golgi está poco desarrollado y es difícil de distinguir, consiste usualmente en 4-6 cisternas electrodensas aplanadas dispuestas en "S" ó "C" que pueden llegar a alcanzar forma de vesículas elípticas empaquetadas con pequeños gránulos amorfos.

Los peroxisomas o microcuerpos son redondos y algo irregulares, se componen de una membrana simple y una matriz finamente granular de moderada electrodensidad, miden aproximadamente la mitad ó un tercio del tamaño de la mitocondria.(Fig 50)

Los lisosomas se observan como orgánulos muy heterogéneos de tamaño, número y posición variables, suelen ser más pequeños que las mitocondrias aunque también pueden ser mayores. Su contenido puede ser homogéneo o heterogéneo, electrodenso o finamente granular y contener figuras de mielina, pigmentos u orgánulos intactos o parcialmente digeridos. Se sitúan con mayor frecuencia en el polo apical de la célula, próximo al canalículo biliar. En las muestras del grupo A son escasos.

Los gránulos de glucógeno son escasos y se disponen característicamente en forma de "rosetas".

En el grupo B, es donde se ha observado más alteraciones en la ultraestructura del hepatocito.

Un hallazgo constante ha sido la presencia de esteatosis de predominio macrovacuolar y menos frecuente microvacuolar. La presencia de vacuolas lipídicas causa compresión de la mayor parte de los orgánulos celulares, en muchos casos con desplazamiento hacia la periferia o hacia el núcleo y a veces necrosis focal en el citoplasma del hepatocito. El depósito graso hace que el citoplasma del hepatocito sea más electrolúcido (Fig 51 y 52).

En algunas células no se distinguen orgánulos en el citoplasma, únicamente un núcleo picnótico central muy electrodenso y gran cantidad de vacuolas lipídicas.

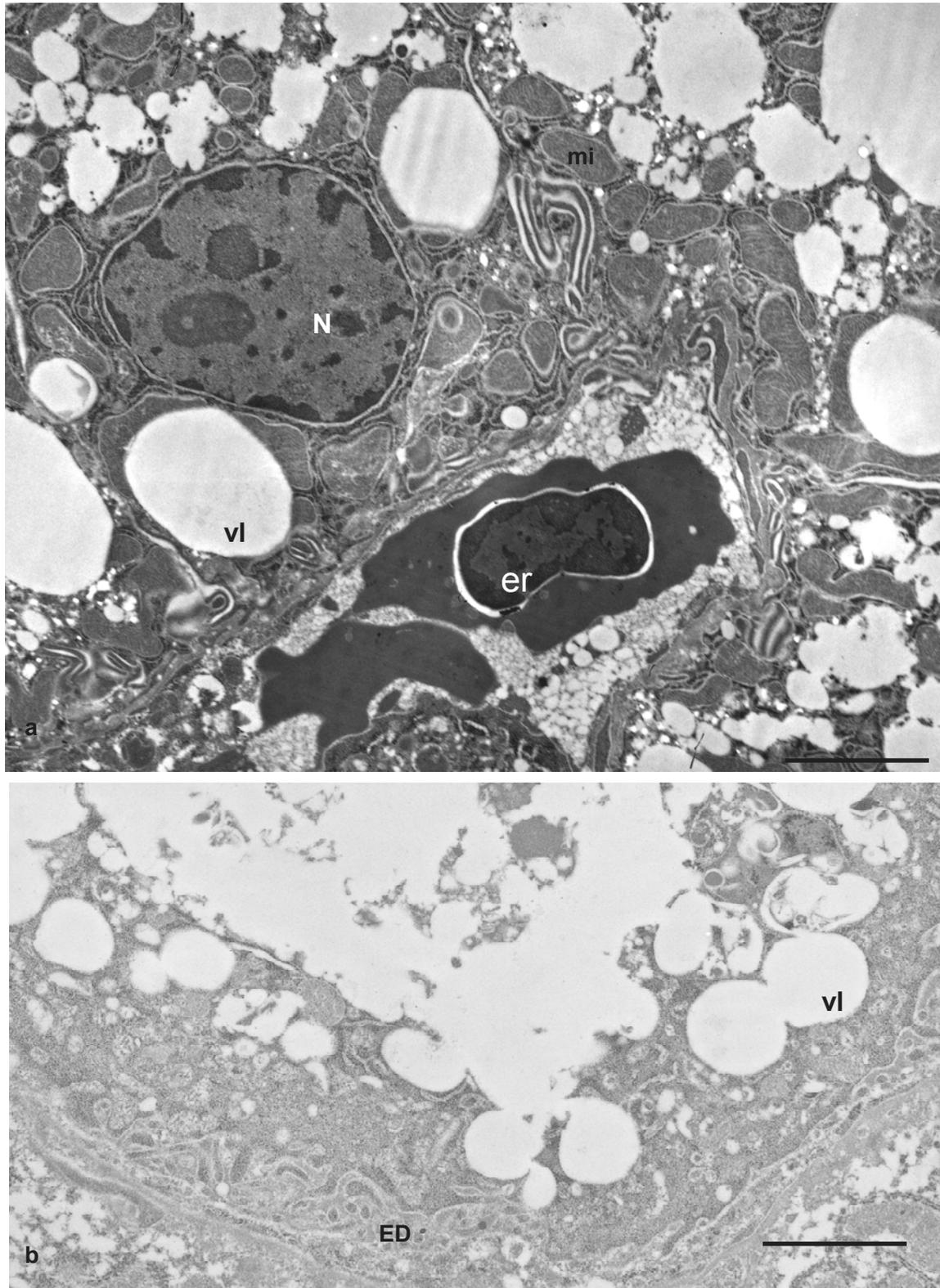


Fig. 51 Grupo B. a) Hepatocito con macrovacuolas lipídicas, el núcleo se encuentra próximo a la membrana vascular del hepatocito. Barra 1,58 μm . b) Se muestran las microvellosidades de la membrana vascular de una célula ocupada por macrovacuolas lipídicas que desplazan los orgánulos hacia la periferia celular. Barra 1,72 μm . N: núcleo; ED: espacio de Disse; mi: mitocondria; er: eritrocito.

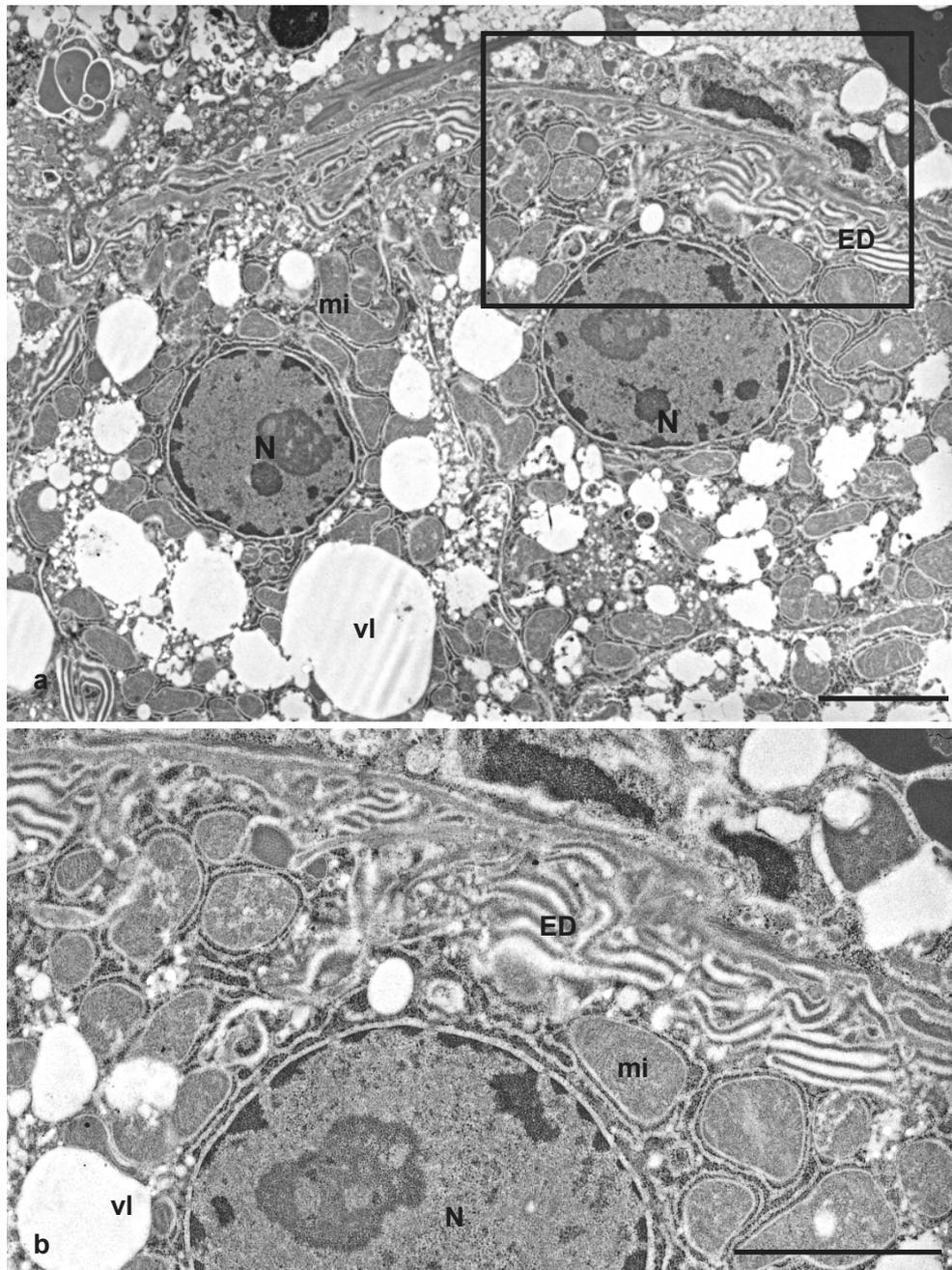


Fig. 52 Grupo B. a) Dos hepatocitos con macrovacuolas lipídicas en el citoplasma con desplazamiento de las mitocondrias hacia el núcleo. b) Detalle del espacio de Disse donde se aprecian las microvellosidades del hepatocito y el endotelio fenestrado. N: núcleo; vl: vacuola lipídica; mi: mitocondria; ED: espacio de Disse. Barras: 1,58 μ m.

Dentro del hepatocito se observa heterogeneidad respecto al tamaño y forma de sus mitocondrias, observando que un gran número de ellas son de mayor tamaño, de forma más irregular y con una matriz mitocondrial muy electrodensa. El retículo endoplasmático rugoso que las rodea aparece fragmentado y disperso en el citoplasma perdiéndose su relación con la mitocondria. A veces las mitocondrias se disponen alrededor de las vacuolas lipídicas (Fig. 53).

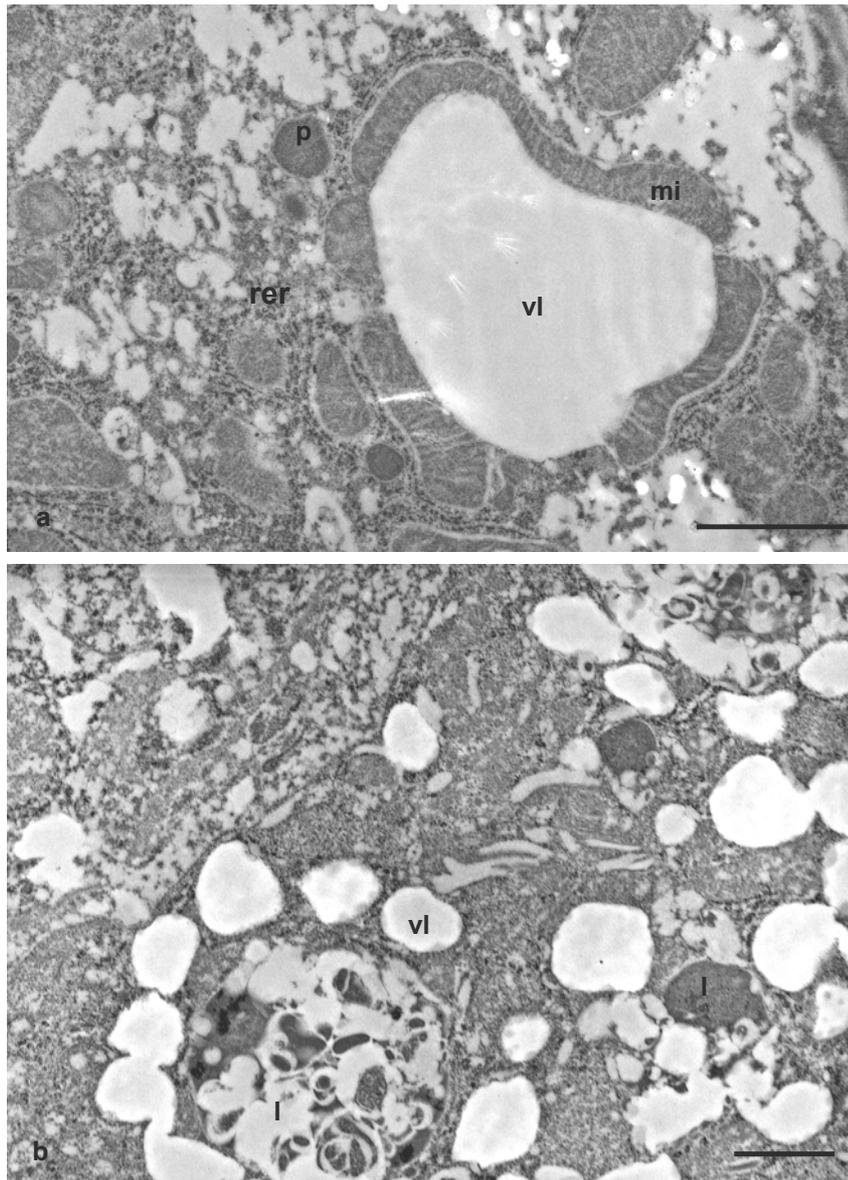


Fig. 53 Grupo B. a) Vacuola lipídica rodeada por las mitocondrias que están en íntimo contacto con el retículo endoplasmático rugoso el cual está desestructurado, se observan peroxisomas aislados. Barra: 1,58 μ m b) Vacuolas lipídicas, peroxisomas y lisosoma en el citoplasma del hepatocito. Barra: 1,25 μ m. mi: mitocondria; l: lisosoma; vl: vacuola lipídica; rer: retículo endoplasmático rugoso.

En el hepatocito del grupo B destacan el aumento del tamaño y número de lisosomas de diversa morfología, muchos son del tamaño de la mitocondria, rodeados por una membrana simple y contienen material electrodenso, otros adoptan una estructura lamelar moderadamente electrodenso (Fig. 54). También destaca un incremento en el número de peroxisomas.

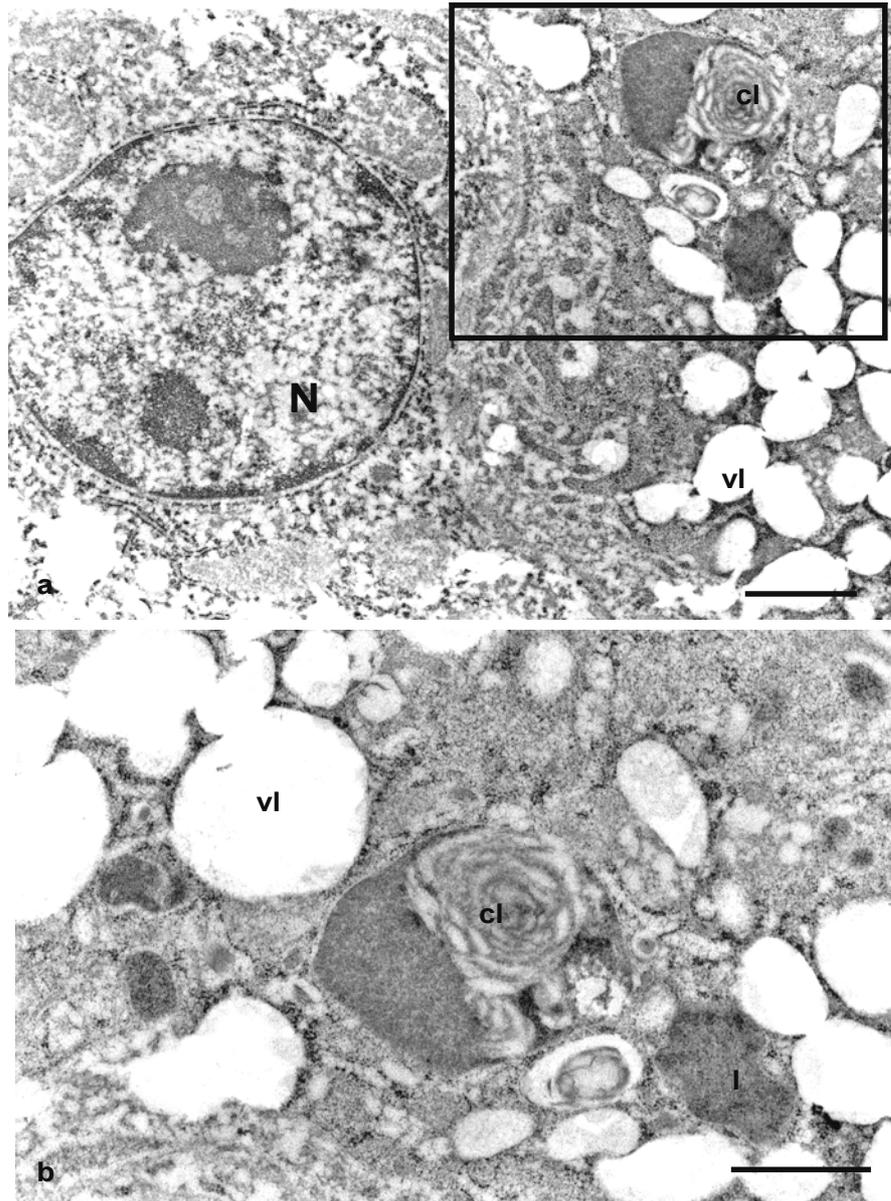


Fig. 54 a) Vacuolas lipídicas y cuerpo lamelar en un hepatocito del grupo B. Barra: 1,25 μm .b) Detalle a mayor aumento de la figura anterior. Barra: 0,8 μm . N: núcleo; cl: cuerpo lamelar; vl: vacuola lipídica; l: lisosoma

Resumiendo, las alteraciones que hemos observado en el grupo B comprenden el aumento del tamaño de las mitocondrias (megamitocondrias), incremento de los peroxisomas y lisosomas características de un aumento de la actividad metabólica, numerosas vacuolas citoplasmáticas con contenido en lípidos, desestructuración y fragmentación del RER.

En el grupo C también se distinguen vacuolas lipídicas aunque en menor cantidad, es frecuente la presencia de peroxisomas y lisosomas y en algunas células también se observa variación en la morfología de las mitocondrias (Fig. 55).

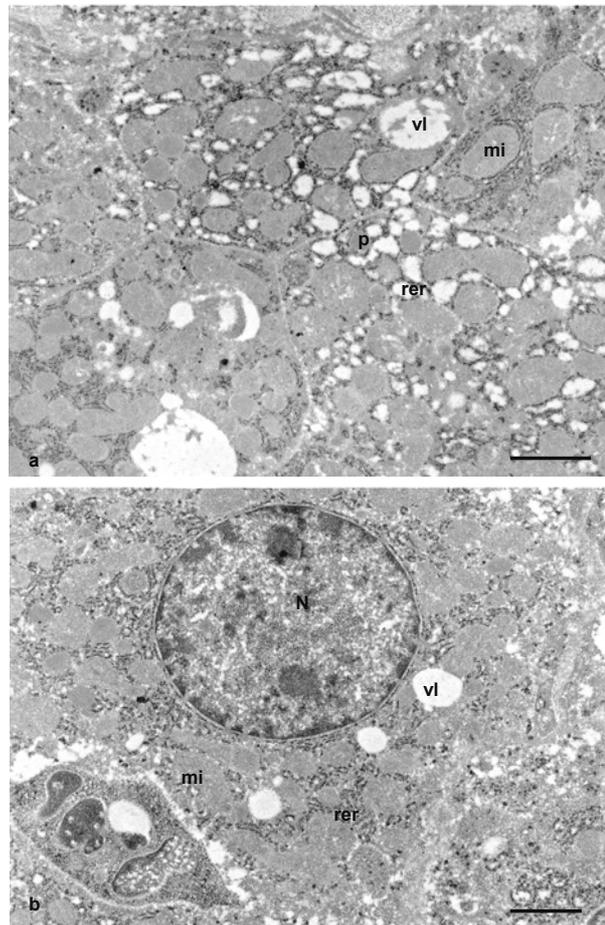


Fig. 55 Grupo C. Vacuolas lipídicas aisladas en el citoplasma de los orgánulos, retículo endoplasmático rugoso dilatado y fragmentado. Barras: 1,25 μ m. vl:vacuola lipídica; mi:mitocondria; rer: retículo endoplasmático rugoso; N: núcleo; p:peroxisoma.

En el grupo D se pueden apreciar vacuolas lipídicas aunque en menor cantidad que en los grupos B, C y E. Las mitocondrias son regulares en forma, tamaño y densidad, se encuentran rodeadas de RER, el cual es uniforme y rodea homogéneamente a las mitocondrias al igual que en el grupo A (Fig 56 y 57).

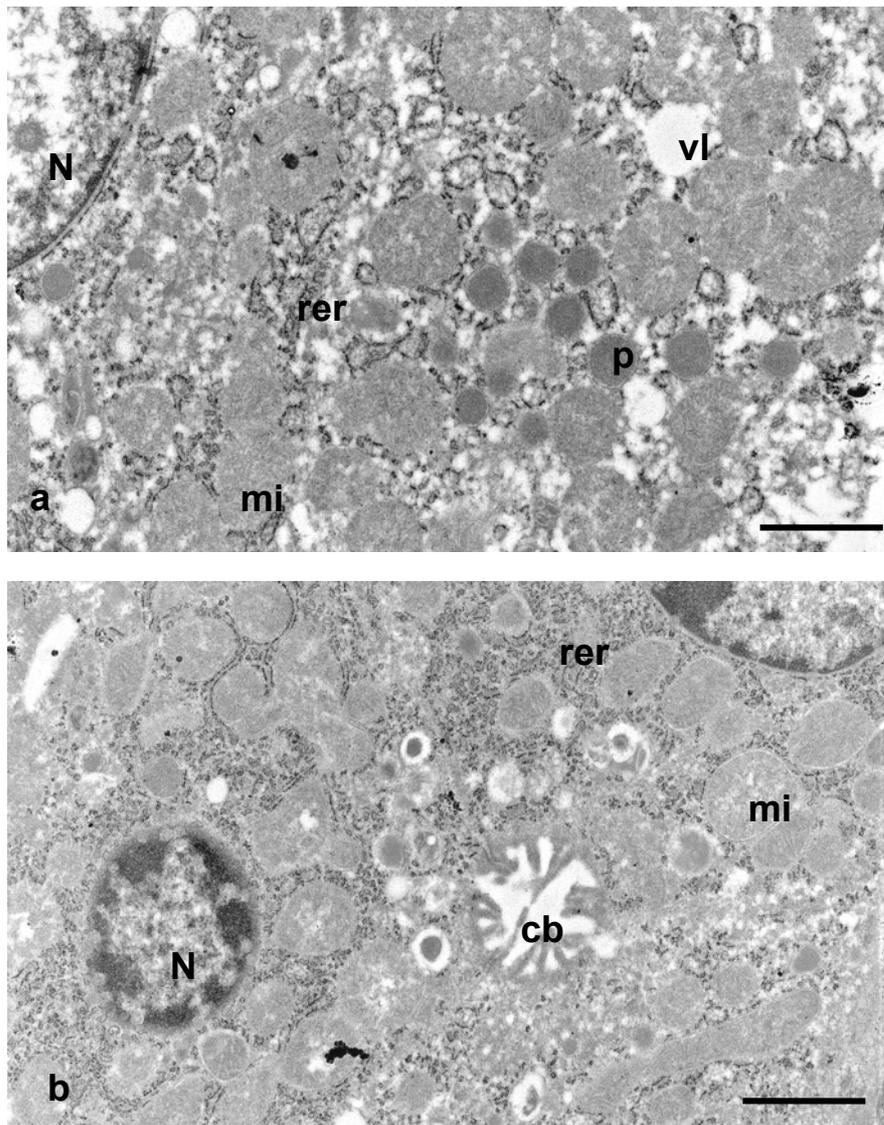


Fig. 56 Grupo D. a) Peroxisomas agrupados en el citoplasma y escasas vacuolas lipídicas. Barra: 1 μm b) Las mitocondrias son regulares y están rodeadas por un retículo endoplasmático rugoso que conserva su morfología. No se observan vacuolas lipídicas. Barra: 1,25 μm . N: núcleo; mi: mitocondria; rer: retículo endoplasmático rugoso; vl: vacuola lipídica; cb: canalículo biliar; p: peroxisomas.

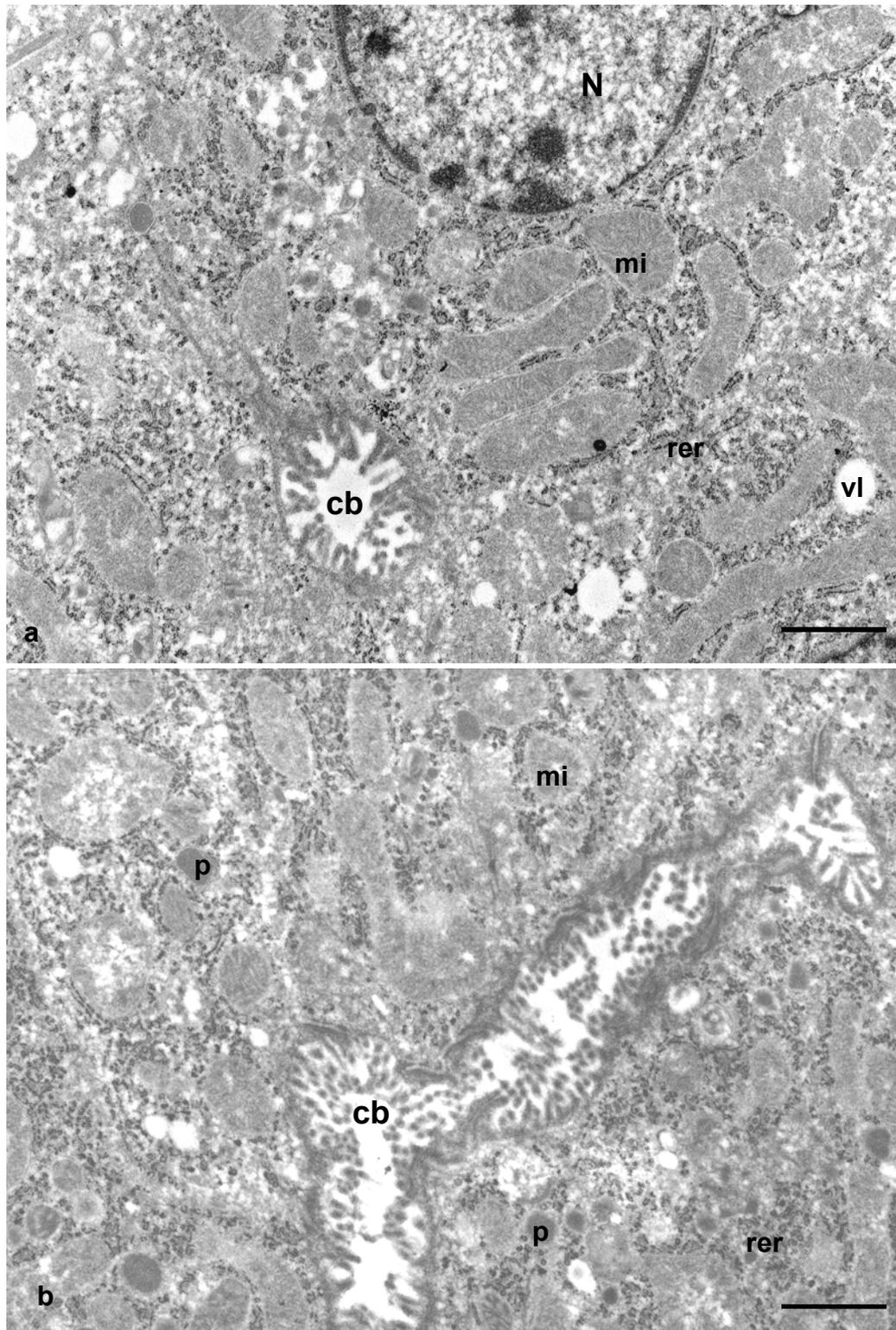


Fig. 57 Grupo D. Corte transversal (a) y longitudinal (b) de un canalículo biliar. Se aprecian algunas vacuolas lipídicas de pequeño tamaño y peroxisomas aislados en el citoplasma en menor cantidad que en el resto de los grupos. cb: canalículo biliar; mi: mitocondria; p: peroxisomas; N: núcleo; vl: vacuola lipídica. Barras 1,25 μ m

En el grupo E se encuentran también presentes todas las alteraciones descritas en el grupo B. En el núcleo de algunas células no se distingue la estructura de los nucleolos, apareciendo una cromatina más dispersa y fragmentada y destaca la alta cantidad de vacuolas lipídicas (Fig 58).

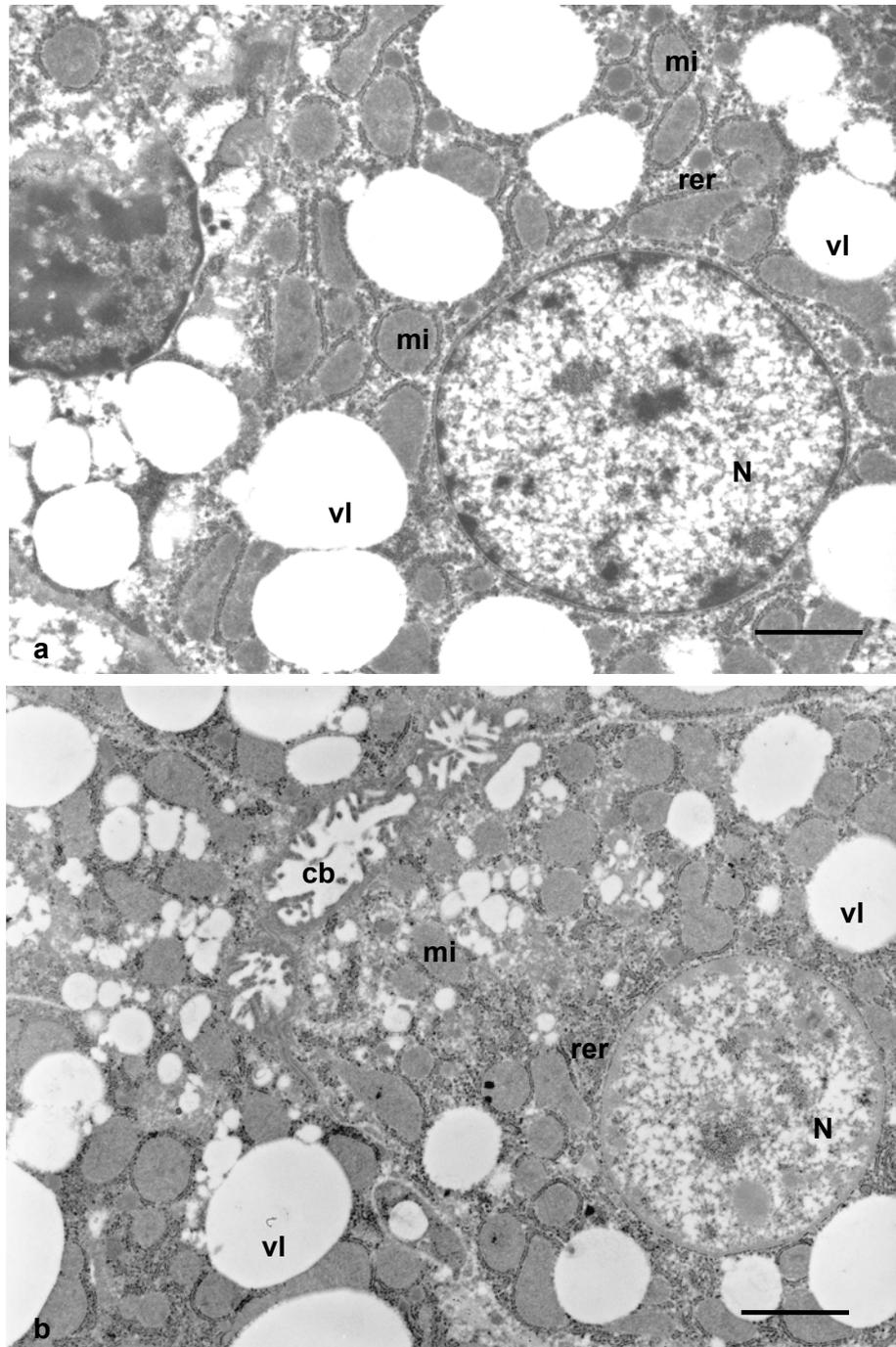


Fig. 58 Grupo E. Hepatocitos con numerosas vacuolas lipídicas dispersas en el citoplasma y escasa diferenciación de los nucleolos. a) Barra: 1,58 μ m. b) Barra: 2 μ m. mi: mitocondria; N: núcleo; vl: vacuola lipídica; cb: canalículo biliar; rer: retículo endoplasmático rugoso.

En algunas células, el citoplasma está invadido por vacuolas lipídicas, apenas se observan otros orgánulos celulares y sólo la presencia de un núcleo picnótico denota necrosis celular; junto a estas células degeneradas se observan células inflamatorias (Fig. 59)

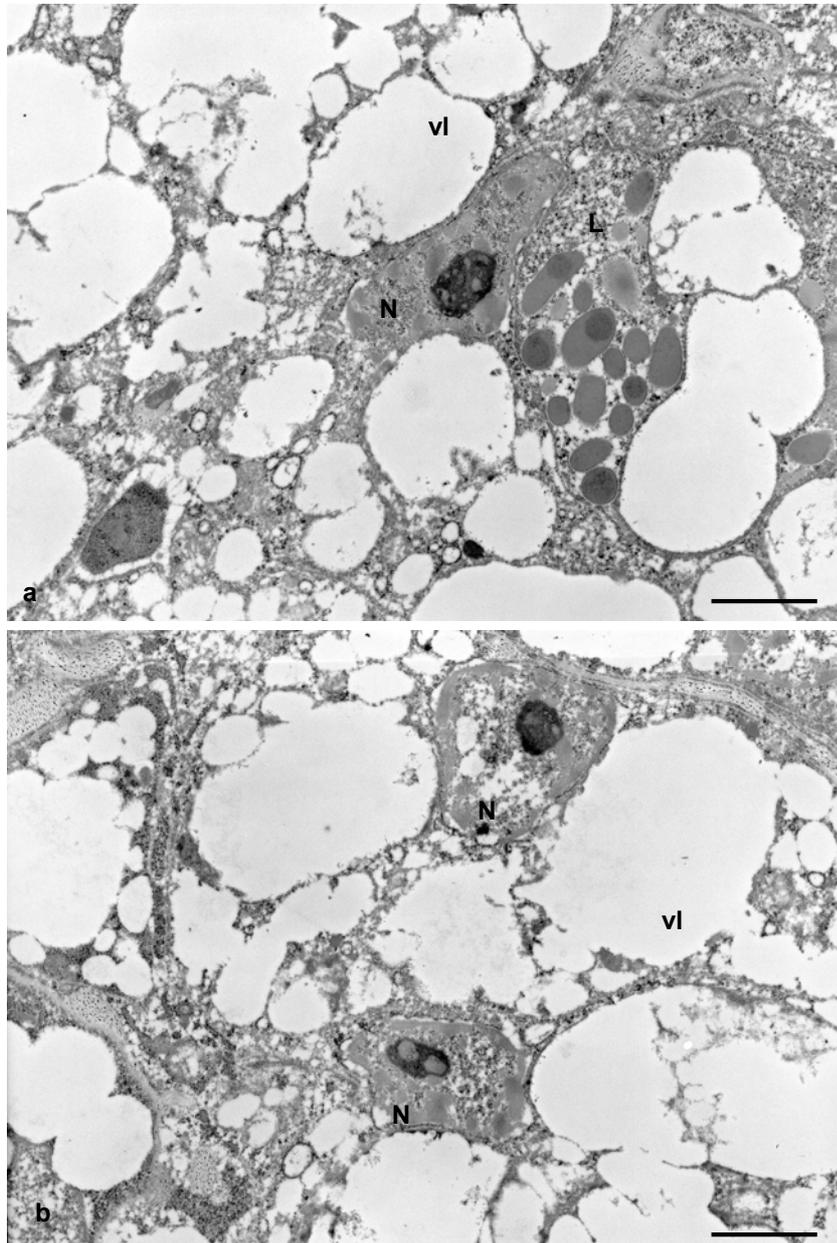


Fig. 59 Grupo E, las vacuolas lipídicas ocupan todo el citoplasma, los núcleos picnóticos indican necrosis celular. a) célula inflamatoria con gránulos electrodensos junto al hepatocito con degeneración grasa. Barras: 2 μ m. N: núcleo, vl: vacuola lipídica; L: leucocito.