

DISCUSIÓN



14.1) MODELO ANIMAL

Aunque existen algunos modelos animales para el estudio del hígado graso, empleando fundamentalmente roedores bien con mutaciones genéticas o mediante la utilización de factores ambientales como drogas, toxinas o dietas hiperlipémicas (Koteish y Diehl, 2001; London y George, 2007), en nuestra experiencia hemos desarrollado un modelo experimental más claro que reproduce las características distintivas de la EGHNA mediante el empleo de dietas hiperlipémicas, sin realizar ninguna alteración genética, empleando el pollo como modelo animal.

Los modelos en aves han contribuido a comprender en gran medida el metabolismo lipídico de los vertebrados. Las aves tienen generalmente una mayor capacidad para la biosíntesis lipídica y a diferencia de otros vertebrados, el hígado tiene bastante más tejido adiposo y es el principal lugar de síntesis *de novo* de ácidos grasos (Stevens, 1996).

Dentro de las especies de aves existe una gran variedad respecto a la propensión en el depósito graso corporal. En un extremo está el pavo, su menor presencia de grasa parece ser debida a una marcada disminución del hígado para sintetizar y excretar triglicéridos (Mossab y col., 2002). En otro extremo del espectro están las aves acuáticas que tienen una gruesa capa de depósito graso subcutáneo y abdominal (Scott y Dean, 1991). Además la sobrealimentación a algunas especies de gansos y patos induce una forma de obesidad caracterizada por una dramática esteatosis hepática resultado de la acumulación de lípidos en el hígado (Davail y col., 2003).

Las aves están entre los primeros modelos animales de arteriosclerosis que han sido estudiados y las investigaciones en palomas, patos y pollos han hecho una importante contribución a nuestro conocimiento morfológico y bioquímico del proceso de la arteriosclerosis (Toda y col., 1983; García Pérez y col., 2003; Ayala y col., 2005).

Debido a la predisposición de las aves al desarrollo de hígado graso y las experiencias previas en las que se analizaba el efecto de la dieta sobre

las histología hepática (Cherian y col., 2002; Cherian y Goeger, 2004) hemos desarrollado un modelo de estudio de esta enfermedad, empleando el pollo como animal de experimentación.

Además la elección de este modelo animal para el estudio de la EGHNA nos parece adecuada porque cumple una serie de factores propuestos por Mullen y McCullough (1989) a tener en cuenta en la elección de un modelo animal como la *reproducibilidad*, ya que nuestros animales tras el periodo de tres meses de inducción alcanzaron el estado deseado. La *especificidad*, pues este modelo tiene la anormalidad deseada, sin presentar otras complicaciones. El *coste directo* del animal y el *tiempo de inducción* de la enfermedad no es excesivo. Es un método *seguro* porque el animal y el método de inducción de la enfermedad no suponen un riesgo para el personal y el *tamaño del animal* permite su manipulación con facilidad. Por ejemplo a la hora de conseguir un buen acceso vascular. Este modelo es *factible* puesto que se puede generar y manejar en otros laboratorios con un mínimo de posibilidad material (personal, instalaciones, etc) y finalmente bajo el *punto de vista ético* los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

Mediante la alimentación a pollos con dieta hiperlipémica *ad libitum*, hemos reproducido las lesiones hepáticas típicas de la EGHNA, principalmente la esteatosis, la inflamación y la balonización; este efecto debido a la dieta se ha visto en otros estudios animales, utilizando ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta rica en grasas (El-Haschimi y col., 2000).

La reproducibilidad de este nuevo modelo experimental en aves podría ayudar a dilucidar mejor la patogénesis y el establecimiento de un tratamiento efectivo de la EHNA. Una de sus principales aplicaciones está ilustrada por el resultado obtenido con el cambio de dieta. El presente estudio muestra que las principales características de la EHNA reproducidas por una dieta rica en grasas fueron significativamente atenuadas tras el cambio de dieta aunque no totalmente abolidas. Ello

puede proporcionar una herramienta útil para posteriores estudios de desarrollo de una mejor dieta para prevenir la EGHNA. Estos resultados y todo lo anteriormente expuesto validan el modelo experimental del pollo para el estudio del hígado graso.

14.2) ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PLASMA

- **Lípidos plasmáticos**

El efecto de la dieta en este modelo se comprueba con los datos analíticos del plasma y sobre todo con la afectación observada a nivel histológico.

Hemos inducido en los animales de estudio una hiperlipoproteinemia tipo IIb por aumento de colesterol-LDL y de triglicéridos. Como se ha mencionado anteriormente este tipo de dislipemia se asocia con frecuencia a la EGHNA (Cortez-Pinto y col., 1999).

Los niveles de colesterol y triglicéridos más elevados se encuentran en el grupo alimentado con dieta hiperlipémica, sin encontrar diferencias significativas respecto a los demás grupos, lo que atribuimos al efecto de la atorvastatina, como se ha visto en otros estudios (Bisgier y col., 1997; Kushiya y col., 2005).

Existe una variedad en las hembras de la raza de pollos White Leghorn (*Gallus gallus*) descrita por primera vez por Ho y col. (1974) con una mutación que les hace tener una ovulación limitada, son hiperlipémicas y desarrollan lesiones severas en aorta, coronarias y arterias mesentéricas. Existe un estudio que evalúa el efecto de la atorvastatina sobre los lípidos en plasma e hígado de estas aves (Elkin y col., 2006). Estas hembras no ovulan ni ponen huevos, ello combinado con un fallo en la supresión de la síntesis y secreción de lipoproteínas hepáticas da lugar a la acumulación de cantidades masivas de lípidos en plasma y otros órganos como el hígado y como consecuencia de ello tienen más esteatosis hepática que las normales. En este estudio el contenido graso del hígado y los niveles

plasmáticos de colesterol y triglicéridos disminuyeron de forma significativa en las tratadas con atorvastatina respecto al control hiperlipémico; este ha sido el primer trabajo que evalúa el efecto de la atorvastatina sobre el perfil lipídico de plasma y homogenados de hígado de las aves, comparando estos dos grupos experimentales. El tiempo de experimentación que emplearon fue de sólo 20 días. En este tiempo han demostrado una reducción significativa del colesterol y triglicéridos plasmáticos en los animales tratados. En nuestro trabajo demostramos que esta respuesta inicial al tratamiento, en la reducción de los niveles de lípidos plasmáticos es mantenida en el tiempo, como puede observarse en los resultados de colesterol y triglicéridos plasmáticos obtenidos en los animales tras seis meses de tratamiento. Además, en nuestro estudio, hemos encontrado una reducción significativa en los animales tratados con atorvastatina, grupos D y E, respecto a los animales de los grupos no tratados, B y C. Sin embargo el empleo único de la atorvastatina ha sido insuficiente para normalizar los niveles de colesterol en el grupo E alimentado con dieta aterogénica y la dieta por si sola tampoco normalizó los niveles de colesterol y triglicéridos en el grupo C. El grupo D, de regresión con dieta estándar y tratamiento con atorvastatina, presentó los niveles más bajos de colesterol y triglicéridos aunque discretamente más altos que en el grupo control.

Nuestros resultados también coinciden con los del trabajo de Egawa (2003) que emplea la pitavastatina en un modelo de esteatosis en ratas con déficit de aromatasa (*Ar-/-*) y observan que con respecto a las no tratadas existe un descenso significativo del colesterol total y los triglicéridos plasmáticos. Este estudio señala que la pitavastatina activa eficientemente la vía de metabolización de los ácidos grasos dependiente de los PPAR- α en los ratones *Ar-/-* lo que implica una reducción no solo del colesterol y triglicéridos plasmáticos sino también del depósito de grasa en los hepatocitos.

Ambos trabajos de Elkin y col. (2006) y Egawa y col. (2003) emplean animales modificados genéticamente, nosotros hemos empleado una dieta hiperlipémica. Esto nos ha permitido establecer dos grupos más de

experimentación que llamamos de regresión, C al que retiramos la dieta hiperlipémica y suministramos una dieta estándar y D al que damos atorvastatina junto con la dieta estándar, lo que nos permite también comparar el efecto de la dieta con y sin atorvastatina, encontrando una reducción mayor en los lípidos plasmáticos en los animales tratados con atorvastatina.

La razón del incremento plasmático del colesterol y de los triglicéridos en los animales sometidos a una dieta hiperlipémica no está claro pero como se ha visto en otros estudios (Du y Ahn, 2003) de pollos sometidos a una dieta rica en ácido linoleico conjugado, podría estar relacionado con el incremento en la actividad enzimática asociada al metabolismo lipídico hepático de las principales enzimas que controlan la síntesis de ácidos grasos (ácido graso sintetasa y acetil-CoA carboxilasa).

Estudios clínicos donde se llevaron a cabo tratamientos de pacientes con estatinas durante 4 ó 6 años, constataron una disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos (Ekstedt y col. 2007, Georgescu and Georgescu, 2007)

Las estatinas reducen principalmente los niveles de colesterol intrahepatocitario y promueven la expresión de los receptores celulares de superficie apo B/E lo que incrementa el aclaramiento de las lipoproteínas contenidas en las apo y reducen los niveles circulantes de LDL (Moghadasian y col., 2000).

Como norma, todas las estatinas reducen los triglicéridos y el colesterol LDL en plasma, pero la atorvastatina es más potente disminuyendo los triglicéridos en plasma que otras estatinas. (Bakker-Arkema y col., 1996).

- **Pruebas de función hepáticas y otros marcadores**

La EGHNA es común en pacientes con hiperlipidemia y DM tipo 2, los cuales son los principales diagnósticos subsidiarios para el tratamiento con estatinas. Existe la teórica posibilidad de que las estatinas podrían

empeorar la histología hepática en la EGHNA. El actual prospecto para las estatinas indica que no debieran ser utilizadas en pacientes con una elevación persistente de aminotransferasas. En un estudio (Ekstedt y col., 2007) que evalúa a largo plazo el efecto de las estatinas sobre la histología hepática en la EGHNA, se ha observado que las estatinas son seguras en pacientes con elevación persistente de las aminotransferasas debido a la EHNA y que tienen un efecto positivo en la histología hepática en pacientes con EGHNA.

La ALT es la enzima más específica de lesión hepatocelular y sirve como marcador del estado del hígado en los estudios poblacionales.

En el trabajo de Federico y col. (2006) se estudiaba la dieta de 130 pacientes con EGHNA respecto a 2.326 sujetos sanos. Encontraron un aumento del IMC, niveles de glucemia en suero y mayor consumo de calorías, sobre todo de proteínas de origen animal, carbohidratos y lípidos, lo que se relacionaba con el aumento de los niveles plasmáticos de ALT y AST. Sin embargo no en todos los estudios se ha encontrado una correspondencia entre incrementos de aminotrasferasas y esteatosis hepática.

Existe un porcentaje significativo de pacientes con una EGHNA no diagnosticada en la que la única manifestación la constituye el incremento de ALT aunque también existen pacientes con EGHNA sin elevación de aminotransferasas. Zelberg-Sagai y col. (2006) comparan la validez de la determinación de ALT respecto a la ultrasonografía en la detección primaria de la EGHNA y señalan que el empleo de ALT como marcador para la EGHNA no debería recomendarse en los estudios epidemiológicos poblacionales porque conduciría a una infraestimación de la enfermedad.

En nuestro modelo no había un incremento significativo en la concentración de ALT, un hallazgo que no es infrecuente de la enfermedad en humanos, donde se ha señalado que menos de un tercio de los pacientes afectados presentan un incremento significativo, estando presente la inflamación histológica (Diehl y col., 1988). Como se ha publicado en los últimos años, los valores normales de ALT no garantizan

que no exista una esteatohepatitis subyacente, incluso puede existir una fibrosis avanzada (Mofrad y col., 2003). Por otro lado, es posible que existan otros parámetros bioquímicos en el plasma del pollo que pudieran indicarnos con mayor fiabilidad una posible alteración hepática, como por ejemplo los ácidos biliares (Elkin et al., 1990).

En nuestro trabajo no hemos encontrado ningún incremento significativo en las pruebas de función hepática, en relación con el cambio de dieta ni con el tratamiento con atorvastatina. Estos datos son concordantes con el estudio longitudinal, anteriormente citado (Ekstedt y col., 2007) en el que realizan un seguimiento a 68 pacientes con EGHNA durante un periodo de 10 a 16 años. De este grupo, 17 pacientes recibieron tratamiento con estatinas. Concluyen que las estatinas son seguras y pueden ser preescritas en pacientes con hiperlipemia y/o DM tipo 2 con elevación concomitante de las enzimas hepáticas debido a la EGHNA.

En un reciente metanálisis (de Denus y col., 2004) en 49.275 pacientes tratados con estatinas y otro en pacientes hiperlipémicos (Chalasani y col., 2004) tampoco se observaron cambios significativos de las pruebas de función hepática. Estos estudios indican además que los pacientes hiperlipémicos presentan fluctuaciones espontáneas de aminotransferasas reciban o no tratamiento con estatinas. Sin embargo, en otros estudios clínicos, si se observa una disminución significativa en los niveles de aminotransferasas en 10 pacientes con EHNA tratados con atorvastatina durante un periodo de 4 años, apoyando su empleo para la reducción de la esteatosis hepática (Georgescu and Georgescu, 2007).

Hoy en día no se conocen los mecanismos mediante los cuales, la atorvastatina es capaz de reducir la citolisis hepática en la EHNA. Innoue y col. (2006) observan un retroceso de la fibrosis y esteatosis que atribuyen al efecto de la atorvastatina, en la supresión de la expresión del factor de crecimiento tumoral y a una reducción del estrés oxidativo.

Por otro lado, debido a que se ha identificado a la PCR como un marcador útil para la predicción de la enfermedad vascular coronaria en el síndrome metabólico y se ha asociado a la presencia de EGHNA en

sujetos con síndrome metabólico (Kogiso y col., 2006) la hemos determinado en los distintos grupos encontrando un incremento significativo en todos ellos respecto al grupo control A, por lo que creemos que constituye un reactante de fase activa que indicaría enfermedad.

En el estudio de George y col. (1998) realizado en un total de 51 pacientes con EHNA, se encontró que un 62% tenía una elevación de la ferritina plasmática y que el incremento del hierro hepático constituye un riesgo significativo para el desarrollo de fibrosis hepática. Un nivel alto de ferritina no refleja necesariamente el depósito de hierro hepático, ya que la misma esteatohepatitis lo puede producir de forma aislada. Se desconoce si una moderada sobrecarga de hierro en la EGNA forma parte de su propia patogénesis, si es debido a alteraciones metabólicas, causa genética aún no identificada o factores medioambientales. También estudios en animales (Tsukamoto y col., 1995) han mostrado que la sobrecarga de hierro puede actuar sinérgicamente junto con la esteatosis y el alcohol en la progresión de la fibrosis. Dadas las experiencias previas en estos estudios realizamos las determinaciones de hierro y ferritina plasmáticos sin apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

14.3) ESTUDIO DE LA LESIÓN HEPÁTICA

Como hemos descrito anteriormente en el apartado 8.5 de antecedentes, para la evaluación en el diagnóstico y gravedad de la EGNA se utiliza el sistema de puntuación propuesto por Kleiner y col. (2005) en el que se emplea una valoración semicuantitativa del depósito graso y se contabiliza el número de focos en campos de observación 200x. Nosotros hemos añadido a estos parámetros una evaluación cuantitativa del depósito graso distinguiendo las zonas lobulillar y centrolobulillar, señalando el porcentaje de hepatocitos sanos y afectados por macro- y microvacuolas, una estimación del área y diámetro máximo del foco inflamatorio y además hemos valorado la densidad inflamatoria en el

parénquima hepático en las zonas portal y lobulillar y hemos realizado una descripción morfológica del hígado tras su extracción asignándole según su aspecto un grado de lesión que hemos correlacionado con el NAS ó índice de actividad histológica de la EGHNA.

14.3.1) Evaluación macroscópica y NAS

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas respecto al peso de los hígados ni su relación con el peso corporal total.

Se ha observado (Cherian y col, 2002; Cherian y Goeger, 2004) que el aspecto macroscópico del hígado recién extraído en pollos de la raza White-Leghorn alimentados con una dieta rica en grasas, es mas pálido que el de las aves alimentadas con dieta normal. Nosotros hemos observado estas diferencias y hemos establecido un sistema de gradación macroscópico.

A nivel macroscópico, la observación del hígado del animal y sus características morfológicas dieron una primera aproximación del grado de afectación del mismo, sin que estos datos fueran concluyentes para grados de afectación más precisos.

Al comparar el grupo de progresión B y el grupo de progresión con atorvastatina E y los grupos de regresión C y el de regresión más atorvastatina D 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.

Los mayores porcentajes de los grupos A, B y D coincidieron con los tipos de afectación, sano, grave y leve respectivamente. Para el grupo E, la valoración macroscópica se situó mayoritariamente en moderada. Respecto al grupo C, la valoración macroscópica estuvo distribuida entre leve-moderada-grave. Es de destacar que en este análisis macroscópico ya es posible discriminar una regresión de la lesión en los grupos C, D y E, aunque esta no sea muy precisa y pueda quedar infravalorada. La

principal ventaja de la evaluación macroscópica es la rapidez, en detrimento de la precisión. En el análisis microscópico los valores del NAS muestran que el grupo B es el más afectado, seguido de los grupos E, C, D y A con diferencias significativas. Se muestra coincidencia en ambas valoraciones entre los valores extremos; grupo B más afectado histológicamente al que macroscópicamente se le asigna un grado grave y al grupo control A que se le asigna un grado 0. En el análisis microscópico, se demuestra el efecto beneficioso de la atorvastatina sobre la lesión hepática en los grupos de regresión D y E al compararlos con los grupos C y B. Con ello, se puede concluir que la evaluación macroscópica puede ser una primera aproximación a grandes rasgos, obtenida de forma directa y rápida, que necesita ser confirmada para mayor detalle con un estudio microscópico.

La combinación de estos dos métodos de estudio se presenta como una herramienta sencilla y rápida de evaluación de los grados de lesión del hígado.

14.3.2) Valoración del análisis histológico

- **Esteatosis**

Para la estimación semicuantitativa del depósito graso hemos seguido el sistema de gradación histológico propuesto por Kleiner y col. (2005) que se basa en la asignación de puntuaciones según el porcentaje de hepatocitos afectados por la esteatosis. Otros trabajos realizados en pollos como Cherian (2002) contabilizan de un total de 20 hepatocitos aquellos con más de un 75% de vacuolización o determinan el número de vacuolas grasa en una determinada área del microscopio con ayuda de una cuadrícula (Cherian y Goeger, 2004).

Otro modo de valorar el depósito graso (Egawa y col., 2003), utilizado en ratones con déficit de aromatoasa (Ar^{-/-}) ha sido clasificando el depósito graso en cuatro grados: 0 = ninguna vacuola grasa, I = pocas vacuolas

grasas dispersas, II = vacuolas grasas en la zona 3, III = vacuolas grasas en las zonas 2 y 3, IV = numerosas vacuolas grasa en las zonas 2 y 3.

Mediante la valoración semicuantitativa hemos demostrado el efecto beneficioso de la atorvastatina sobre la lesión hepática en el grupo de regresión D al compararlo con el grupo C. No se pudo demostrar este efecto en el grupo de regresión E, ya que no mostraba diferencias significativas con el grupo B.

En nuestro trabajo, tras la valoración cuantitativa ningún grupo alcanzó el grado III de máxima afectación (depósito graso > 66%) que si se observó en la valoración semicuantitativa. Podemos decir que en la valoración semicuantitativa se tiende a sobreestimar el depósito graso hepático. Franzén y col. (2005) comparan la estimación del depósito graso hepático en 75 biopsias efectuado mediante análisis de imagen y valoración semicuantitativa encontrando una sobreestimación por este último método y señalan que el método de valoración semicuantitativa presenta en su mayor parte una reproducibilidad de baja a moderada y una gran variabilidad interobservador. Aunque la medida precisa del grado de esteatosis hepática no sea usualmente necesaria en la práctica clínica creemos que si tiene interés determinarla en nuestro estudio por ser más discriminativa para la valoración del efecto de la dieta y la atorvastatina en nuestros grupos experimentales.

Por tanto para precisar con mayor exactitud el depósito graso total hemos realizado una valoración morfométrica cuantitativa utilizado un equipo de análisis de imagen, que además nos permitió valorar el depósito graso a nivel centrolobulillar (zona 3) y las zonas 1 y 2 del lobulillo. Por este método se encuentran diferencias significativas entre todos los grupos, siendo el más afectado el grupo B seguido de los grupos E, C y D. En el grupo control A no se apreció depósito graso, en los grupos no tratados B y C los valores del depósito graso son casi el doble con respecto a los tratados E y D. El depósito graso es homogéneo, no se encontraron diferencias entre la zona centrolobulillar y el resto del lobulillo.

Este método es más fiable y exacto que el anterior permitiendo una mejor evaluación del efecto del fármaco sobre la esteatosis hepática.

Egawa y col. (2003) observaron que la esteatosis desarrollada en estos ratones que era del tipo IV regresaba a un grado II ó III al ser tratados con pitavastatina. Este estudio fue la primera evidencia *in vivo* de que la pitavastatina puede disminuir la esteatosis hepática severa en los ratones Ar-/- a través de la activación de la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de los ácidos grasos mediada por los PPAR- α . En este trabajo no se describió el componente inflamatorio en las muestras ni la lesión hepatocelular. En nuestro modelo, aunque solo llegamos a un grado II de esteatosis, este se redujo a la mitad en el grupo tratado con atorvastatina.

Así, el efecto de la atorvastatina también se ha observado en el hígado de las gallinas de la raza White Leghorn con una mutación que las hace hiperlipémicas, constatándose una disminución en el depósito graso del hígado con una reducción en los niveles de colesterol y de triglicéridos en los animales tratados con atorvastatina, aunque en este trabajo no se valora la histología (Elkin y col., 2006).

Otro estudio (Sanguino y col., 2005) en ratas seniles Sprague-Dawley hipercolesterolémicas e hipertriglicéridémicas a las que se les administró atorvastatina mostró un descenso en la concentración hepática de colesterol del 48% y de triglicéridos del 41%. En este trabajo tampoco se valoró la histología, este descenso fue atribuido también a un efecto agonista sobre los PPAR- α y su acción sobre las vías de la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos.

Un estudio recientemente publicado (Ekstedt y col., 2007) en 68 pacientes afectados por la enfermedad, de los cuales 17 fueron tratados con estatinas, demostró en los pacientes tratados, una disminución significativa de los depósitos grasos del hígado tras un periodo de seguimiento de 6 años. Este estudio longitudinal muestra que en los pacientes tratados con estatinas se reduce de forma significativa el infiltrado graso hepático; sin embargo, el efecto de las estatinas sobre la

histología hepática no puede ser explicado en humanos porque aún se desconocen aspectos importantes sobre la patogénesis de la enfermedad.

En nuestro modelo además hemos valorado el tipo de depósito, encontrando que el depósito es de tipo mixto macro- y microvacuolar con ligero predominio de macrovacuolas en los grupos B y C y de microvacuolas en los grupos E y D pero sin diferencias significativas.

- **Inflamación**

De acuerdo al sistema de puntuación propuesto para el diagnóstico de EHNA (Kleiner y col., 2005) hemos contabilizado el número de focos en el parénquima hepático. El grupo B de dieta hiperlipémica destacó de forma significativa por su mayor número de focos, los cuales eran de mayor tamaño y densos que el resto de los grupos; en los grupos C, D y E, sin embargo por este método no se observaron diferencias.

Con la valoración mediante análisis de imagen del área y diámetro máximo del foco hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos de progresión y regresión, existiendo menor grado de inflamación en los grupos D y E tratados respecto a los no tratados C y B. Por el método de evaluación del infiltrado inflamatorio lobulillar también hemos encontrado diferencias entre los grupos de progresión B y E pero no entre los de regresión C y D.

El parámetro aislado *número de focos* no ha mostrado diferencias entre los grupos C, D, E por lo que creemos que no discrimina de forma adecuada el componente inflamatorio.

El parámetro área y diámetro del foco inflamatorio y densidad inflamatoria no aparece en los estudios histológicos publicados de hígado graso pero creemos que aporta mayor información sobre el grado de inflamación y el efecto del tratamiento, que únicamente el número de focos por campo.

Con el empleo de estos parámetros encontramos una disminución del componente de inflamación en los grupos tratados con atorvastatina.

Además analizamos la densidad inflamatoria. Creemos que este es el mejor índice del grado de inflamación pues evalúa el infiltrado inflamatorio por área de parénquima hepático.

Mientras que Hübscher (2006) indica que el infiltrado inflamatorio en la EHNA es más de predominio lobulillar que portal en nuestra experimentación no encontramos diferencia entre la densidad inflamatoria lobulillar y portal.

Ni Egawa y col. (2003) en su trabajo sobre el efecto de la pitavastatina sobre la esteatosis hepática en ratones, ni Elkin y col. (2006) en su trabajo sobre el efecto de la atorvastatina en pollos con esteatohepatitis, evalúan el componente inflamatorio, aunque ambos señalan una reducción de la esteatosis y de los valores de aminotransferasas.

Los estudios clínicos (Ekstedt y col., 2007, Georgescu y Georgescu, (2007) en pacientes tratados con atorvastatina o simvastatina, no encuentran diferencias en el grado de inflamación entre el grupo control y el tratado con estatinas, analizando el número de focos por campo. Sin embargo en nuestro modelo tanto el número de focos como la densidad inflamatoria, disminuyen en los grupos tratados con atorvastatina, indicando que esta estatina reduce la inflamación.

Horlander y col. (2001) y Rallidis (2004) señalan una reducción de la inflamación en siete y cinco pacientes tratados con estatinas durante un periodo de 12 y 6 meses respectivamente. La inflamación fue evaluada mediante el número de focos por campo 200x mediante microscopía de luz. Este efecto en la reducción de la inflamación se cree que es debido a que las estatinas inhiben la quimiotaxis de los neutrófilos y reducen la producción de citoquinas proinflamatorias (Duzendorfer y col., 1997).

- **Balonización**

El hallazgo más específico de lesión celular hepática en la EGHNA lo constituye la balonización, ello denota progresión de la enfermedad. No es un parámetro que se evalúe de forma sistemática en los trabajos de EGHNA realizados en animales que han sido consultados, como otros parámetros histológicos (esteatosis o inflamación) porque es el más difícil de evaluar y para el que en su identificación existe mayor discrepancia entre los patólogos (Younossi y col., 1998).

En nuestra experimentación, la lesión hepatocelular representada por el número de hepatocitos balonizados está presente en todos los grupos experimentales, salvo en el grupo A, siendo mayor en B, seguido de E, C y D con diferencias estadísticamente significativas entre todos ellos.

Se obtiene una reducción aproximada del 50% de la balonización al comparar el grupo hiperlipémico y el grupo de progresión tratado con atorvastatina. También obtenemos el mismo resultado entre los grupos de regresión con dieta y regresión con dieta y atorvastatina.

El trabajo de Ekstedt y col (2007) en 17 pacientes tratados con atorvastatina o simvastatina muestra con respecto a 68 pacientes control, una estabilización de la lesión hepatocelular en los pacientes tratados, mientras que en el otro grupo de pacientes si se observa mayor grado de balonización durante un periodo de 6 años. Horlander y col. (2001) y Rallidis (2004) también observaron un menor grado de balonización respecto a la lesión inicial después del tratamiento con estatinas. Sin embargo Georgescu y Georgescu (2007) no observaron diferencias en la balonización en los pacientes tratados con atorvastatina.

- **Puntuación NAS**

La puntuación del NAS para valorar la actividad de la enfermedad en nuestro modelo fue mayor para el grupo B, seguida del E, C, D y A con diferencias significativas entre todos los grupos. Se ha incluido este

parámetro por ser una herramienta útil puesto que representa las principales características histológicas de la EHNA (esteatosis, inflamación y lesión hepatocelular).

El NAS incluye específicamente sólo características de la actividad de la enfermedad que pueden ser potencialmente reversibles a corto plazo. Existe además una correlación entre NAS y el diagnóstico de la EHNA. El NAS comprende un rango de 0 a 8, siendo las puntuaciones ≥ 5 diagnósticas de EHNA, mientras que valores < 3 no pueden considerarse como EHNA. El grupo B (NAS = 7,13); E (NAS = 4,58) y C (NAS = 3) se consideran afectados por la enfermedad y los grupos A (NAS = 0) y D (NAS = 1,83) podrían considerarse sanos.

Desde que se designa y valida el NAS como parámetro indicador de actividad (Kleiner y col., 2005) ha quedado incorporado su cálculo en la mayor parte de trabajos experimentales en animales y humanos con EHNA (London y George, 2007; Ekstedt y col, 2007; Georgescu and Georgescu, 2007).

Ekstedt y col (2007) no encuentran diferencias significativas en el grado necro-inflamatorio. Otro reciente estudio de Georgescu y Georgescu (2007) evalúa a 48 pacientes con EHNA durante un periodo de 4 años; todos presentaban un NAS similar al comienzo del estudio. Estos se dividieron en cuatro grupos de tratamiento, 10 recibieron atorvastatina, 13 pentoxifilina, 12 losartan y 13 AUCD. Salvo en el grupo tratado con AUCD todos presentaron una reducción significativa del NAS al final del estudio. Este dato era mayor para el grupo tratado con losartán con una reducción de 1,48. El valor de NAS que mostró mayor reducción fue la esteatosis. No se observaron diferencias de la inflamación y balonización en los pacientes tratados con atorvastatina y si en aquellos que recibieron tratamiento con pentoxifilina y losartan.

La actividad en la hepatopatía crónica se considera limitada por la variabilidad inter-observador. Los hallazgos encontrados en los estudios experimentales, llevados a cabo para la valoración de los distintos regímenes terapéuticos, necesitan de una evaluación objetiva. Por todo

ello, debido a la mayor exactitud en la cuantificación de los parámetros de esteatosis e inflamación mediante análisis de imagen, hemos adaptado el NAS considerando el valor cuantitativo de la esteatosis y la inflamación por ser más exactos. Para la inflamación hemos utilizado la densidad inflamatoria lobulillar.

Por tanto, hemos realizado dos medidas de NAS para cada grupo por el método semicuantitativo y cuantitativo. El resultado obtenido ha sido similar en ambos e indican que en nuestro modelo, la atorvastatina tiene el potencial de reducción de la lesión hepática en el grupo de progresión E a pesar de continuar con una dieta hiperlipémica. Esta reducción fue de 1,2 para el NAS-cualitativo y de 2,55 en la valoración cuantitativa; si bien, en nuestro modelo, la retirada de la dieta ha resultado beneficiosa, sin embargo ha sido insuficiente para alcanzar una mayor regresión de la lesión hepática, lográndose el mayor efecto en la reducción de la lesión hepática inducida mediante la combinación de dieta estándar y tratamiento con atorvastatina como se observa en el grupo D con una reducción para NAS-cualitativo de 1 y para NAS-cuantitativo de 1,07.

- **Fibrosis**

Además de su efecto hipolipemiante, las estatinas tienen un potente efecto inmunomodulador, citostático e inhibidor de la angiogénesis. Como parte de una búsqueda de agentes antifibróticos, Rombouts y col. (2003) investigaron el potencial de las estatinas para inhibir la proliferación y síntesis proteica de las células estrelladas. Descubrieron que la simvastatina y la lovastatina inhibían la proliferación y la síntesis de colágeno de las células estrelladas hepáticas en los cultivos celulares y que estas una vez activadas, eran resistentes a los factores de crecimiento como el mavelonato o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Ekstedt y col. (2007) describen una estabilización de la progresión de la fibrosis en su estudio clínico de pacientes con EHNA. Otro trabajo como el de Georgescu y Georgescu (2007) no encuentra

diferencias respecto a la fibrosis en los pacientes tratados con atorvastatina durante 4 años.

En nuestro trabajo tras realizar la tinción de van Gieson no hemos detectado la presencia de fibrosis en los grupos experimentales siendo esta la única característica histológica de la EHNA que no hemos logrado reproducir en nuestro modelo. Mediante esta experimentación hemos alcanzado un grado moderado de lesión, como lo demuestra el no llegar a desarrollar fibrosis, que es una característica de afectación de mayor gravedad.

- **Inmunocitoquímica**

Hoy se conoce que la lesión hepática está en parte mediada por un desequilibrio entre la síntesis y degradación de colágeno en la matriz extracelular, participando así en los procesos de fibrosis.

Se ha demostrado que el uso de inhibidores de amplio espectro frente a MMP, previene la aparición de esteatosis y mejora la función hepática en un modelo en ratones, sugiriendo que esta terapia puede ser una herramienta útil en el tratamiento de la EGHNA (Alwayn y col., 2006).

La expresión de MMP-9 se ha relacionado con diversas patologías incluyendo la enfermedad hepática y se ha establecido una correlación entre la severidad en la progresión de la enfermedad hepática y la detección de MMP-9 en suero (Kuyvenhoven y col., 2003).

Moore y col. (2007) relacionan la presencia de MMP-9 con la infiltración de leucocitos en el parénquima hepático y se ha implicado en la activación y liberación de citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento. En nuestros resultados hemos encontrado reactividad para la MMP-9, en los diferentes grupos experimentales, siendo esta reactividad moderada y ligeramente más débil en el grupo control sano. Sin embargo los resultados no son concluyentes, ya que no se observan diferencias

significativas en la intensidad de inmunorreactividad entre los diferentes grupos experimentales.

El marcaje de IMP-3 fue menos reactivo y tampoco se observaron diferencias destacables entre los diferentes grupos. Es posible que exista una reacción cruzada entre alguna molécula de estructura similar a estos marcadores y que esté relacionada con otras funciones en las aves.

- **Microscopía electrónica**

Existen pocos trabajos ultraestructurales que analicen la esteatohepatitis inducida en el hígado. No hemos encontrado ningún estudio que valore el efecto de la atorvastatina en el hígado graso a nivel ultraestructural. En nuestro trabajo aportamos un estudio ultraestructural mediante la inducción de la enfermedad con dieta grasa y la evaluación del posible efecto de la atorvastatina a nivel ultraestructural.

Los hepatocitos son ricos en mitocondrias que juegan un importante papel en el metabolismo hepático; en muchos artículos se señala el importante papel de la mitocondria en la patogenia de la enfermedad (Pessayre y col., 2001). En condiciones normales la mitocondria no es visible con microscopía de luz, por ello hemos empleado esta técnica que nos permite valorar los cambios morfológicos tanto en la mitocondria como en otros orgánulos celulares.

El análisis ultraestructural en los grupos de progresión B y E mostró aumento del tamaño y de la electrodensidad de las mitocondrias, esteatosis micro- y macrovacuolar, dilatación y fragmentación del retículo endoplasmático rugoso y el aumento del número de peroxisomas y lisosomas. Estas alteraciones han sido descritas en enfermos con EGHNA (Lebensztejn y col., 2001). Por tanto, a nivel ultraestructural también hemos reproducido las anomalías descritas en la EGHNA. Si comparamos la morfología del hepatocito del grupo A control, con los grupos de regresión observamos que en el grupo A no aparece depósito graso, existen pocos peroxisomas y el retículo endoplasmático rugoso se

dispone alrededor de las mitocondrias que son homogéneas en tamaño y electrodensidad, no presentando por tanto este grupo las alteraciones señaladas. Estas alteraciones se reflejan claramente en los hepatocitos de los grupos B y E y están atenuadas en los grupos de regresión C y D.

Las alteraciones mitocondriales en la EGHNA han sido señaladas por Caldwell y col, (1999) y se han interpretado como un proceso adaptativo de la célula o bien como resultado de la lesión celular. Estas alteraciones la constituyen junto con el polimorfismo incluyendo la megamitocondria, y el moderado incremento de electrodensidad en la matriz, la presencia de numerosas inclusiones lineares cristalinas cuya composición no se conoce exactamente, nosotros no hemos distinguido en nuestro trabajo estas inclusiones en la mitocondria pero si el aumento del tamaño y de electrodensidad.

Krahenbuhl (1993) mostró que las alteraciones en la morfología de la mitocondria podrían reflejar una alteración en la cadena de transporte de electrones, en la síntesis de ATP o ambas. Perez-Carrera y col. (1999) también describieron alteraciones en la morfología de la mitocondria en 38 pacientes con EHNA atribuyendo estos cambios a un estado de incremento de estrés oxidativo en el que los radicales libres formados podrían dañar los lípidos de la membrana mitocondrial.

Hemos observado lisosomas y cuerpos lamelares. Steiner y col. (1964) han sugerido que estas formaciones lamelares son figuras de mielina originadas en cisternas del RER del hepatocito. Otros (Tanaka y col., 1975) concluyen que figuras similares son lisosomas secundarios formados por la degradación del citoplasma. Dado el alto contenido en lípidos sugerimos que se trata de este tipo de lisosomas, cuya formación se ha promovido por el alto metabolismo lipídico. Además son especialmente frecuentes en los grupos de progresión con dieta hiperlipémica.

También hemos encontrado gran cantidad de vacuolas lipídicas en los hepatocitos aunque el depósito graso ya se puede evaluar con microscopia óptica.

Wang y col. (2006), observaron el efecto deletéreo de una dieta rica en ácidos grasos saturados en un modelo en ratas con esteatohepatitis. Este estudio señalaba que la acumulación de ácidos grasos saturados en el hígado procedentes de la dieta conducía a un incremento de los marcadores asociados a la lesión del retículo endoplasmático del hepatocito y a una disfunción hepática. En nuestro estudio hemos observado dilatación y fragmentación del RER en los hepatocitos de los grupos B, E y C, mientras que el RER mostraba la ultraestructura normal en los grupos A y D.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que la atorvastatina además de reducir los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, disminuye la esteatosis hepática, la inflamación y la lesión hepatocelular. Además, muestra un buen perfil de seguridad porque en ningún grupo se observa aumento de los niveles de aminotransferasas y ha tenido un efecto positivo en la esteatohepatitis inducida en nuestros animales.

