

Evaluación macroscópica y microscópica del efecto de la atorvastatina sobre la progresión-regresión de la esteatosis hepática en un modelo aviar

A. Martín-Castillo^a, B. García-Pérez^b, I. Ayala^c, G. Adánez^d, J.V. Ortega^e, M.T. Sánchez^b y M.T. Castells^f

^aSección de Aparato Digestivo. Hospital de Hellín. Hellín. Albacete. España.

^bServicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. España.

^cDepartamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia. España.

^dServicio de Urgencias. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. España.

^eServicio de Urgencias. Hospital de Los Arcos. San Pedro del Pinatar. Murcia. España.

^fDepartamento de Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. España.

Introducción. La enfermedad grasa del hígado no alcohólica (EGHNA) se asocia a patología vascular subsidiaria de ser tratada con estatinas, por ello creemos de interés desarrollar un modelo de esteatosis hepática en animales y valorar el efecto de la atorvastatina en la lesión hepática inducida, así como presentar métodos de evaluación macroscópica y microscópica de los grados de esteatosis.

Métodos. Se emplearon pollos de la raza White-Leghorn, clasificados en 5 grupos experimentales con diferentes dietas y tratamiento con atorvastatina. Los hígados fueron valorados y clasificados macroscópicamente y microscópicamente en 4 grados de lesión.

Resultados. En el presente trabajo se ha conseguido desarrollar un modelo de hígado graso inducido por una dieta aterogénica empleando el pollo como animal de experimentación.

Conclusión. Se demuestra que este modelo es adecuado para el estudio de la esteatosis hepática.

Además, se muestran dos métodos de valoración de los grados de lesión: macroscópico y microscópico. Se concluye que la valoración macroscópica es útil para una discriminación rápida del efecto de la dieta, observándose también una tendencia al efecto beneficioso de la atorvastatina aunque no sea estadísticamente significativa. La evaluación microscópica, basada en los depósitos lipídicos, completa este estudio dando un mayor detalle de los grados de lesión, especialmente en los grados de lesión intermedios. Por este análisis microscópico se demuestra una reducción de la lesión hepática en los grupos tratados con atorvastatina. La combinación de los dos métodos, macroscópico y microscópico, es de gran utilidad para las valoraciones de los grados de lesión de esteatosis hepática.

Palabras clave:

Hígado. Pollo. Atorvastatina. Dieta.

Trabajo financiado por la Fundación Séneca de Murcia (Proyecto de Investigación, referencia PI-7/00785/FS/01). Mención a las mejores comunicaciones del XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (Murcia, 2-5 de junio, 2004).

Correspondencia: Dra. A. Martín Castillo.
Servicio de Aparato Digestivo. Hospital de Hellín.
Juan Ramón Jiménez, s/n. 02400 Hellín. Albacete. España.
Correo electrónico: amc1908@hispavista.com

Recibido el 22 de diciembre de 2004 y aceptado el 26 de mayo de 2005.

EFFECTS OF ATORVASTATIN ON MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC CHARACTERISTICS OF HEPATIC STEATOSIS PROGRESSION-REGRESSION IN AN AVIAN MODEL

Introduction. Nonalcoholic fatty liver disease is commonly associated with vascular disease secondary to statin therapy. Therefore, the development of a hepatic steatosis animal model could be useful to evaluate the effect of atorvastatin on induced hepatic lesions, as well as

to provide macroscopic and microscopic methods for evaluating hepatic steatosis.

Methods. White Leghorn chickens were used, classified into five experimental groups, with different protocols of atorvastatin therapy and diets. Livers were assessed by means of macroscopic and microscopic analysis and classified into four grades of lesions.

Results-conclusions. The chicken is useful and suitable as an animal model of hepatic steatosis induced by an atherogenic diet. Two methods of assessment are described: macroscopic and microscopic analysis. It was concluded that macroscopic evaluation rapidly identifies the effect of diet; atorvastatin showed a beneficial effect, although this was not statistically significant. Histological analysis (by evaluation of lipidic deposits) provided a more detailed classification of the grades of lesion, especially in intermediate grades. The histological analysis showed a decrease in the severity of induced hepatic lesions in atorvastatin-treated groups. The combination of the two evaluation methods (macroscopic and microscopic) was useful for determining the grades of severity of hepatic steatosis.

Key words:

Chicken. Liver. Atorvastatin. Diet.

Introducción

La enfermedad grasa del hígado no alcohólica (EGHNA) hace referencia a un amplio espectro de lesiones hepáticas, que comprende la esteatosis simple, esteatohepatitis, fibrosis hepática, cirrosis y hepatocarcinoma. La esteatosis representa un estadio inicial en la secuencia cronológica de la enfermedad. Sus características histopatológicas son similares a las de la hepatopatía inducida por el alcohol. Las implicaciones clínicas de la enfermedad, como se ha demostrado en la última década, derivan de su alta prevalencia en la población general y su potencial progresión hacia la cirrosis y al fallo hepático. Afecta a un 10-24% de la población general de varios continentes. Es la explicación más común de elevación asintomática de transaminasas, una vez excluidas otras causas de enfermedad hepática^{1,2}.

La obesidad, la diabetes mellitus (DM) tipo 2 no insulino dependiente y la hiperlipidemia coexisten frecuentemente asociadas a la EGHNA. La presencia de obesidad en pacientes con EGHNA varía según los estudios entre un 30-100%; ésta es 4-6 veces

más frecuente en obesos, definidos como aquellos que presentan un índice de masa corporal (IMC) > 30, sobre todo si es troncular. La DM lo está entre un 10-75%, e independientemente del IMC ésta incrementa el riesgo y la severidad de la hepatopatía. La hiperlipemia afecta a un 20-92% de los pacientes con EGHNA y casi la mitad de los pacientes con hiperlipidemia tienen esteatosis ecográficamente manifiesta^{1,3}. No se conocen con exactitud los mecanismos patogénicos de la enfermedad y por qué algunos pacientes presentan esteatosis simple y en otros la enfermedad es progresiva.

La retención de lípidos dentro de los hepatocitos, por alteración del metabolismo lipídico hepático, bien en la vía de entrada, síntesis, degradación o secreción, es un prerrequisito para su desarrollo. La resistencia a la insulina, junto con el estrés oxidativo, tienen un papel crítico en su patogénesis⁴.

Independientemente de la pérdida de peso, ninguna medicación ha demostrado reducir o revertir la enfermedad. Fármacos como el gemfibrozilo, la vitamina E y la metformina han demostrado mejorar la bioquímica hepática. El ácido ursodesoxicólico, la betaína, la vitamina E y la troglitazona conducen a una mejoría de la bioquímica hepática y de los hallazgos histológicos⁵.

La EGHNA se asocia al síndrome metabólico, en el que la alta incidencia de arteriosclerosis justifica el empleo de las estatinas, por su efecto en la reducción de la morbimortalidad cardiovascular y cerebrovascular⁶. Existen varios trabajos que describen la posible toxicidad hepática de las estatinas⁷; sin embargo, en nuestras experiencias previas en modelos de arteriosclerosis experimental inducida con dieta rica en colesterol tratados con atorvastatina, observamos un efecto beneficioso macroscópicamente evidente de la esteatosis hepática en los pollos tratados con atorvastatina⁸. Este efecto positivo también se ha observado en un modelo de ratas con hígado graso tratadas con atorvastatina⁹. Harlander et al¹⁰ en 2001 evidencian una disminución ecográfica e histológica de la esteatosis, a los 6 meses de tratamiento con atorvastatina en 7 pacientes con hígado graso. Kiyici et al¹¹ en 2003 también observan en pacientes una evolución favorable de la bioquímica hepática sin que se valore la histología. Chalasani et al¹² en 2004 han publicado que los individuos con enzimas hepáticas elevadas basalmente no tienen mayor riesgo de hepatotoxicidad al ser tratados con estatinas.

El sistema linfático del pollo es rudimentario y el hígado es el primer lugar expuesto a la dieta grasa. Los quilomicrones absorbidos llegan directamente a la sangre del sistema portal, depositándose

en el hígado. De aquí, que las aves estén especialmente predisuestas a esta patología, y son numerosos los trabajos que evalúan la enfermedad grasa inducida en aves¹³⁻¹⁵. Tras comprobar la alta prevalencia de la EGHNA, su potencial evolución a cirrosis, la asociación con otras enfermedades de alto riesgo arteriosclerótico en las que existe un amplio uso de estatinas, la actual controversia de la posible toxicidad hepática de las estatinas, unido a la escasez de trabajos en experimentación animal y humana sobre el uso de las estatinas en la esteatosis, y la predisposición de las aves al desarrollo de hígado graso, nos planteamos desarrollar el estudio macroscópico y microscópico del efecto de la atorvastatina en un modelo experimental de esteatosis hepática desarrollada en pollo, sugiriendo el empleo de este animal como un buen modelo experimental para esta enfermedad.

Material y método

Animales y dietas

Se utilizaron 100 pollos de la raza White-Leghorn, de 3 semanas de edad, aislados en una habitación con temperatura controlada y alimentados con la dieta usual para este tipo de animales (dependencias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia). Tanto las jaulas de los animales como los procedimientos de sacrificio se ajustaron a la legislación vigente en materia de bienestar y experimentación animal y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

A los 21 días de edad se separaron de forma arbitraria en 2 grupos de 20 pollos en el grupo A y 80 pollos en el grupo B. A partir de este momento, comenzó la fase de inducción y los animales eran sometidos a distintos regímenes de alimentación. Finalmente cada grupo experimental constaba de 20 animales.

Grupo A: dieta normal, compuesta de cereales (maíz y cebada), harina de soja, fosfato bicálcico y complemento vitamínico mineral (4 kg/Tm de pienso para progenitores Broilers; composición por kg: vitamina A, 3.000.000 U; D₃, 750.000 U; E 12.500 mg; B₁, 1 g; B₂, 3,75 g; B₁₂, 12,5 mg; B₆, 1,25 g; ácido pantoténico, 5 g; ácido nicotínico, 12,5 g; biotina, 75 mg; K₃, 1,5 g; ácido fólico, 750 mg; manganeso, 30 g; zinc, 27,5 g; hierro, 12,5 g; cobre, 3,75 g; yodo, 750 mg; selenio, 75 mg; cobalto, 150 mg; molibdeno, 250 mg; excipiente c.s.p., 1.000 g (además de un coccidiostático, la monensina).

Grupo B: dieta grasa compuesta por pienso estándar más colesterol puro (2% del total de la mezcla) y 20% del total de aceites saturados (aceite de palma crudo).

A los 3 meses de iniciada la dieta, se sacrificó a 10 animales del grupo A y 10 del B. El grupo B fue dividido en 4 grupos al azar. Grupo B: control con dieta grasa; grupo C: animales que reciben una primera fase de inducción de hígado graso de 3 meses y segunda fase con dieta normal de 3 meses; grupo D: primera fase de 3 meses de inducción con dieta grasa seguida de retirada de la dieta grasa y administración de atorvastatina durante 3 meses, y grupo E de inducción con dieta grasa durante 3 meses y segunda fase de 3 meses de mantenimiento de la dieta grasa junto con administración de atorvastatina.

La estatina empleada, atorvastatina, se administró a una dosis de 3 mg/kg/día diluida en 2 ml de polietilenglicol. Se em-

pleó como placebo 2 ml de polietilenglicol en los grupos a los que no se administraba el fármaco.

En cada sacrificio se utilizaron 10 animales de cada uno de los grupos, a los que se sometía a una inyección intraperitoneal de pentobarbital (150 mg). Previamente, se extrajo sangre venosa para determinaciones analíticas, y posteriormente se procedía a la extracción del hígado.

Análisis y procesamiento de las muestras macroscópicas

Tras la extracción del hígado se fotografiaba esta víscera, en idénticas condiciones de luz, para poder realizar una valoración de sus características macroscópicas. Posteriormente se clasificaron las fotografías atendiendo a los siguientes criterios de evaluación macroscópica: color, rugosidad de la superficie y tamaño del hígado. Ello nos permitía diferenciar 4 grados de afectación macroscópica: grado 0 o normal, corresponde a un hígado de tamaño pequeño, de superficie lisa, brillante y color rojo vino intenso; en el grado I o leve, el hígado es de tonalidad más pálida, superficie ligeramente más granular y menos brillante que el anterior; el grado II o moderado engloba a un hígado de color marrón oscuro mate, de tamaño aumentado con superficie rugosa, y con el grado III o grave designamos un hígado de tonalidad ocre mate, sin brillo, tumefacto en cuya superficie se distinguen estrías amarillentas (fig. 1). Cuatro observadores independientes y con método ciego realizaron la clasificación de cada muestra en los grados de lesión de referencia definidos previamente. Con la totalidad de las observaciones (n = 80 por grupo experimental), se calculó el porcentaje correspondiente a cada grado de lesión, dentro de cada uno de los grupos experimentales (tabla 1).

Análisis histológico

Una muestra de hígado por animal tomada siempre de la misma región, se fijó en formol al 10% tampón fosfato salino y se procesó para su inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 µm, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y Verhoeff-van Gieson. Posteriormente se realizó una descripción histológica de los hígados de cada animal, destacando la presencia de esteatosis micro o macrovesicular, su distribución, la presencia de células migratorias y la existencia o no de fibrosis o cambios arquitecturales. Se evaluó el depósito graso en 10 campos de observación por animal, con el objetivo 40×, valorando un total de 200 campos por grupo experimental. Los hígados fueron clasificados en 4 grados de lesión atendiendo al contenido de depósito graso existente en la muestra, según la clasificación histológica de Brunt et al¹⁶ adaptada por Angulo¹: 0 o normal, si no hay depósito graso; I o leve, si el contenido graso es inferior al 33%; II o moderado, si el contenido graso oscila entre un 33-66%; y III o grave, si el contenido de grasa es mayor al 66%. Finalmente, se calculó el porcentaje de cada grupo experimental que correspondía a cada grado de lesión y se realizó el análisis estadístico.

Análisis del plasma

Tras un período de ayuno de 12 h, se extrajeron muestras de sangre para las determinaciones basales de colesterol, triglicéridos y enzimas hepáticas, previa centrifugación a 3.000 rpm, durante 15 min para obtener el plasma. Los lípidos y enzimas hepáticas, aspartato aminotransferasa (GOT) y alanino aminotransferasa (GPT), se determinaron mediante un procesador automático Hitachi 717 utilizando reactivos de Boehringer Mannheim. El colesterol se determinó mediante el test-color

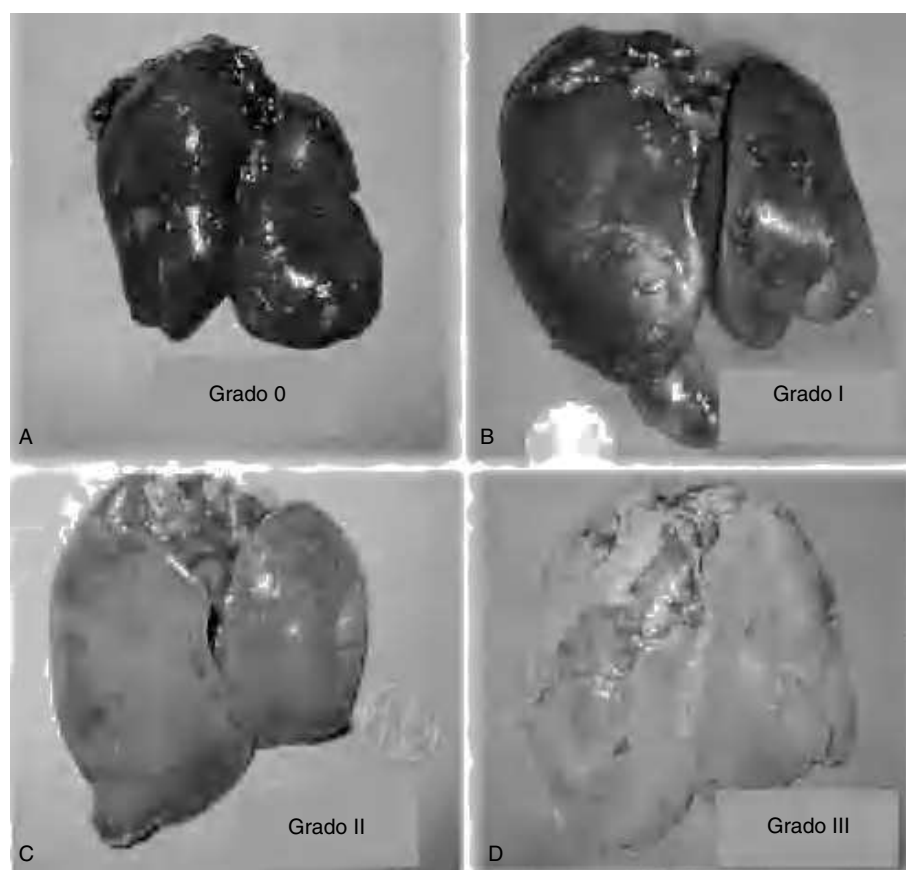


Figura 1. Estadios de grados de lesión macroscópica de referencia de los hígados.

Tabla 1. Resultados de la valoración macroscópica y microscópica de los hígados expresados en porcentajes. Correspondencia de los grados de lesión en cada grupo experimental

a. Valoración macroscópica				
Grupo experimental	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 ^d	13	48	31	8
E ^{b,d}	0	25	53	22
b. Valoración microscópica				
Grupo experimental	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

A: grupo control con dieta estándar; B: grupo control de progresión con dieta aterogénica; C: grupo de regresión sólo con dieta; D: grupo de regresión con dieta y atorvastatina; E: grupo de progresión con dieta más atorvastatina.

1 a: datos expresados como porcentaje de observaciones en cada grado de lesión por grupo experimental. Para cada grupo n = 80.

1 b: datos expresados como porcentaje de la distribución de las frecuencias en los grados de lesión en cada grupo experimental. Para cada grupo n = 200.

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 * $p < 0,06$.

enzimático (método CHOD-PAP). Los triglicéridos se determinaron por reacción colorimétrica mediante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y determinación enzimática subsiguiente del glicerol formado, y las enzimas hepáticas mediante un test color-enzimático.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando el paquete informático SPSS v11. Para el cálculo de la significación estadística de las valoraciones macroscópicas y microscópicas de cada grupo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones dos a dos por la prueba de Mann-Whitney. La significación estadística de los resultados analíticos en plasma se evaluaron mediante la prueba ANOVA y el método de Bonferroni.

Resultados

En la tabla 1a 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 por cuatro observadores independientes y método ciego (fig. 1). 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

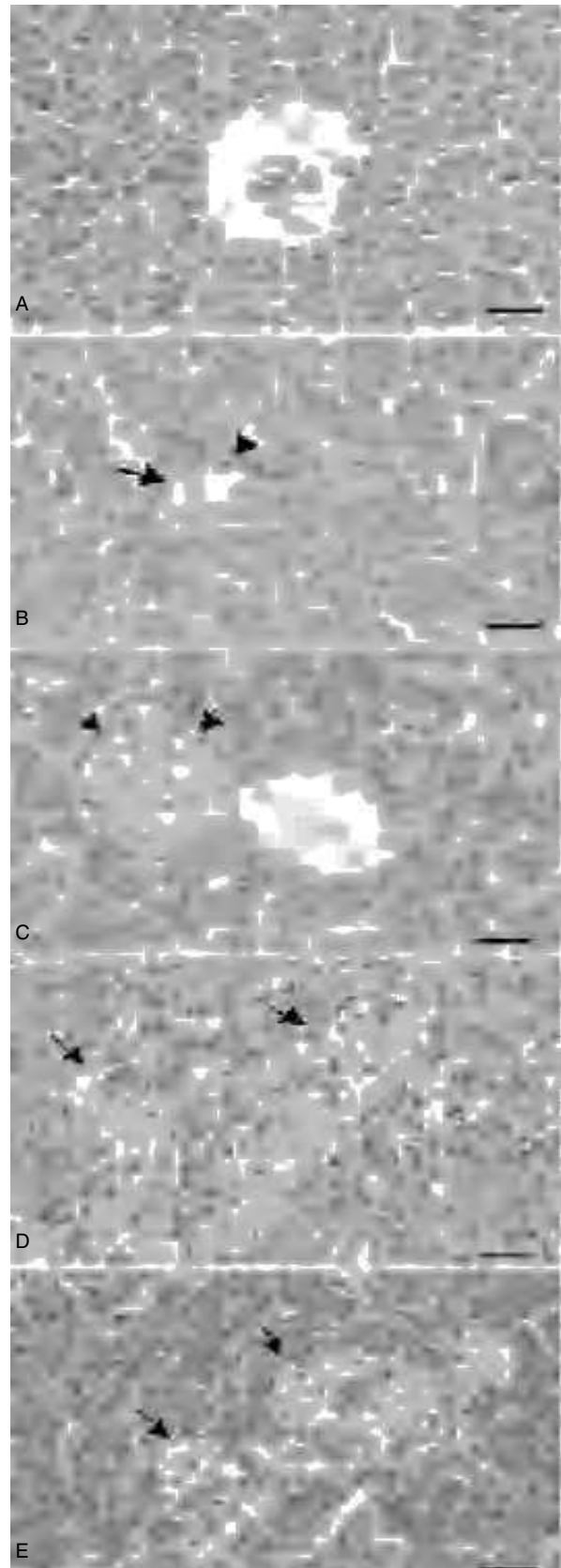


Figura 2. Grados de afectación histológica del hígado en cada grupo experimental. A) Grupo A: dieta estándar, normal. B) Grupo D: regresión con dieta aterogénica y atorvastatina, grado de lesión I o leve. C) Grupo C: regresión con dieta aterogénica, grado de lesión II o moderada. D) Grupo B: progresión con dieta aterogénica, grado de lesión III o grave. E) Grupo E: progresión con dieta aterogénica y atorvastatina, grado de lesión III o grave. Flechas: esteatosis macrovesicular. Hematoxilina-eosina. Barra: 20 μ m.

Tabla 2. Resultados analíticos del plasma en los grupos experimentales

Grupo experimental	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	GOT (U/dl)	GPT (U/dl)
A	95,11 ± 5,93	79,55 ± 33,49	136,22 ± 41,04	2,88 ± 0,59
B	1136,00 ± 196,2*	454,00 ± 165,90	217,60 ± 57,20	17,10 ± 6,74
C	204,20 ± 40,87	153,40 ± 90,92	237,10 ± 48,80	11,10 ± 4,46
D	172,40 ± 44,68	31,60 ± 7,24	371,50 ± 158,20	4,10 ± 1,08
E	413,75 ± 83,80	356,88 ± 130,32	392,38 ± 66,40	18,25 ± 6,06

Los valores se expresan como media ± error estándar; n = 20 por grupo experimental. Pruebas de ANOVA y Bonferroni.

GOT: aspartato aminotransferasa; GPT: alanino aminotransferasa.

*Diferencia significativa entre el grupo B y los demás grupos ($p < 0,05$). No se encuentran diferencias significativas en las demás comparaciones.

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.

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 et al¹⁶ y adaptados por Angulo¹. En la tabla 1b se muestran los porcentajes de los grados de lesión microscópica en cada grupo experimental. 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). La esteatosis en el grupo B era macrovesicular, difusa, de distribución uniforme junto a numerosos focos densos de células migratorias en el parénquima; en el grupo E el tipo de esteatosis era mayoritariamente macrovesicular y microvesicular en menor grado, los focos de inflamación eran más aislados y de menor densidad. En el grupo C la esteatosis formaba pequeños acúmulos grasos confluentes dispersos en el parénquima rodeados de células migratorias que se disponían alrededor de ellos; estos depósitos grasos en el grupo D los encontramos de forma más aislada en el parénquima, eran más pequeños y se distinguían menos células inflamatorias¹⁷ (fig. 2). Mediante la tinción de Verhoeff-van Gieson no se evidenció la presencia de fibrosis en ninguna de las muestras evaluadas.

Tras el análisis estadístico por las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney 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 ($p < 0,48$).

En la histología se confirma 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 tabla 2 muestra los resultados analíticos del plasma en cada uno de los 5 grupos experimentales. Es de destacar los altos valores de colesterol y triglicéridos en el grupo B, frente a los bajos valores del control sano, grupo A. Ambos valores disminuyen en los grupos con supresión de dieta aterogénica y/o tratamiento con atorvastatina. Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de colesterol plasmático del grupo B respecto a los demás grupos. Los valores de GOT y GPT no muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Discusión

Existen numerosos modelos en animales para el estudio de la esteatosis hepática mediante la utilización de dietas aterogénicas¹⁸. En el presente trabajo, hemos desarrollado un modelo de estudio de esta enfermedad, empleando el pollo como animal de experimentación. El efecto de la dieta en este modelo se comprueba con los datos analíticos del plasma (tabla 2) y sobre todo con la afectación observada en las pruebas histológicas. Se ha inducido en los animales de estudio una hiperlipoproteíemia por aumento de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad y de triglicéridos, con frecuencia asociada a la EGHNA¹⁹. Los resultados de nuestro estudio aportan que la lipogénesis hepática inducida en el pollo mediante el empleo de una dieta aterogénica constituye un modelo válido para el estudio de la EGHNA en humanos.

Se presentaron dos métodos de evaluación de los grados de esteatosis hepática: macroscópico y

microscópico. En el estudio macroscópico, la observación del hígado del animal y sus características morfológicas dieron una primera aproximación del grado de afectación de éste, sin que estos datos fueran concluyentes para grados de afectación más precisos. Los mayores porcentajes de los grupos A, B y D coincidieron con los tipos de afectación, sano, grave y leve, respectivamente, tanto en las valoraciones macroscópicas como en el estudio microscópico. Para el grupo E, la valoración microscópica fue moderada-grave y la macroscópica se situó mayoritariamente en moderada, lo que supuso una infravaloración en el estudio macroscópico. Respecto del grupo C, la valoración macroscópica estuvo distribuida entre leve-moderada-grave, mientras que se concretó una mayor proporción de grado de lesión moderado en la evaluación microscópica. 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 ésta 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, se demuestra 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 progresión E, ya que no mostraba diferencias significativas con el grupo B. Esto puede deberse a la magnitud de las lesiones inducidas por la dieta y al corto período de tratamiento, si bien puede apreciarse una tendencia no significativa a disminuir el grado de lesión respecto del grupo B. Con todo 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. Este estudio podría incluir principalmente una valoración de los depósitos grasos en micro o macrovesículas con una evaluación semicuantitativa según la ocupación en los campos de observación del microscopio, siguiendo los criterios de Brunt et al¹⁶. La combinación de estos dos métodos de estudio se presenta como una herramienta sencilla y rápida de evaluación de los grados de esteatosis del hígado. En este estudio también hemos demostrado el efecto beneficioso de la atorvastatina; sugerimos la necesidad de otros estudios para evaluar la eficacia de la atorvastatina a largo plazo en el tratamiento de la EGHNA.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de la empresa Hijos de Juan Pujante S.A. y Avícola Levantina S.A., así como del veterinario de éstas, Dr. Juan Pablo Pérez Ruzafa, y al Prof. Juan Gómez García por el análisis estadístico de los datos.

Bibliografía

- Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med.* 2002; 346:1221-31.
- Daniel S, Ben-Manachem T, Vasudevan G, Ma CK, Blumen Kehl M. Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:3010-4.
- Ratzliff V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology.* 2000;118:1117-23.
- Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999;107:450-5.
- Angulo P, Keith D, Lindor D. Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver: Present and Emerging Therapies. *Semin Liver Dis.* 2001;21: 81-7.
- LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effects of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 1999;282:2340-6.
- Kinman N, Hultcrantz R. Lipid lowering medication and hepatotoxicity. *J Intern Med.* 2001;250:183-5.
- Ortega JV, García Pérez B, Fernández-Pardo J, Castells MT, Escobar S, Valdés M. Efecto antiaterogénico de la atorvastatina en pollos alimentados con una dieta rica en colesterol. *Clin Invest Arterioscl.* 2002;14:225-9.
- Egawa T, Toda K, Nemoto Y, Ono M, Akisaw N, Saibara T, et al. Pitavastatin ameliorates severe hepatic steatosis in aromatase-deficient (Ar-/-) mice. *Lipids.* 2003;38:519-23.
- Harlander JC, Kwo PY, Cummings OW. Atorvastatin for the treatment of NASH. *Gastroenterology.* 2001;120:A-544.
- Kiyici M, Gulten M, Gurel S, Nalk SG, Dolar E, Savci G, et al. Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol.* 2003;17:713-8.
- Chalasani N, Aljadhey H, Kesterson J, Murray MD, Hall SD. Patients With Elevated Liver Enzymes Are Not at Higher Risk for Statin Hepatotoxicity. *Gastroenterology.* 2004;126:1287-92.
- Cherian G, Goerge MP. Hepatic lipid characteristics and histopathology of laying hens fed CLA or n-3 fatty acids. *Lipids.* 2004; 39:31-6.
- Cherian G, Holsonbake TB, Goerge MP, Bildfell R. Dietary CLA alters yolk and tissue FA composition and hepatic histopathology of laying hens. *Lipids.* 2002;37:751-7.
- Du M, Ahn DU. Dietary CLA affects lipid metabolism in broiler chicks. *Lipids.* 2003;38:505-11.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94:2467-74.
- Martín Castillo A, García Pérez B, Ayala I, Ortega JV, Sánchez MT, Adán G, et al. Caracterización histológica del hígado en un modelo experimental de enfermedad grasa hepática en pollos. *Clin Invest Arterioscl.* 2004;16 Supl 2:26-7.
- Koteish A, Diehl AM. Animal Models of Steatosis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:89-104.
- Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptista A, Valente A, Saragoça A, Moura MC. Nonalcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome? *Clin Nutr.* 1999;18:353-835.