



Universidad de Murcia
Facultad de Medicina
Dpto. Medicina Interna

***Efecto de la atorvastatina sobre la
Enfermedad Grasa del Hígado No
Alcohólica (EGHNA) inducida en pollos
mediante una dieta hiperlipémica***

Antonia Martín Castillo

Murcia, 2008



Universidad de Murcia

Facultad de Medicina

Dpto. Medicina Interna

***Efecto de la atorvastatina sobre la
Enfermedad Grasa del Hígado No
Alcohólica (EGHNA) inducida en pollos
mediante una dieta hiperlipémica***

Memoria presentada por Dña. Antonia Martín

Castillo para optar al Grado de Doctor

Directores:

Dr. D. Bartolomé García Pérez

Dra. Dña. María Teresa Castells Mora

Dr. D. Ignacio Ayala de la Peña

Murcia, 2008



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

D Mariano Valdés Chavarri, Catedrático de Universidad del Área de Medicina Interna y Director del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Murcia

INFORMA::

Que la Tesis Doctoral titulada *“Efecto de la atorvastatina sobre la Enfermedad Grasa del Hígado No Alcohólico (EGHNA) inducida en pollos mediante una dieta hiperlipémica”*, ha sido realizada por Dña Antonia Martín Castillo, bajo la dirección y supervisión de D Bartolomé García Pérez, Dña M^a Teresa Castells Mora y D. Ignacio Ayala de la Peña y que el Departamento de Medicina Interna, ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 14 de diciembre de 2007

Fdo.: Mariano Valdés Chavarri





UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

D Federico Soria Arcos, Profesor Titular de Universidad del Área de Medicina Interna del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Murcia

RATIFICA, como tutor:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada *“Efecto de la atorvastatina sobre la Enfermedad Grasa del Hígado No Alcohólico (EGHNA) inducida en pollos mediante una dieta hiperlipémica”*, realizada por Dña Antonia Martín Castillo, bajo la dirección y supervisión de D Bartolomé García Pérez, Dña M^a Teresa Castells Mora y D. Ignacio Ayala de la Peña en el Departamento de Medicina Interna, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia, por las siguientes razones:

- Considero que es conforme en cuanto al contenido del programa de doctorado realizado por la Licenciada.
- Haber demostrado su faceta investigadora en el campo de la medicina.
- Realizar sus ensayos experimentales en un campo de gran interés clínico y social

Murcia, a 10 de diciembre de 2007




Fdo.: Federico Soria Arcos

D Bartolomé García Pérez, Doctor en Medicina por la Universidad de Murcia y especialista en Medicina Interna

AUTORIZA

La presentación de la Tesis doctoral titulada *"Efecto de la atorvastatina sobre la Enfermedad Grasa del Hígado No Alcohólica (EGHNA) inducida en pollos mediante una dieta hiperlipémica"*, realizada por Dña Antonia Martín Castillo, bajo mi inmediata dirección y supervisión en el departamento de Medicina Interna y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Diciembre de 2007



Fdo.: Bartolomé García Pérez



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA

Dña. María Teresa Castells Mora, Doctora en Biología e investigadora del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Murcia,

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis doctoral titulada *"Efecto de la atorvastatina sobre la Enfermedad Grasa del Hígado No Alcohólica (EGHNA) inducida en pollos mediante una dieta hiperlipémica"*, realizada por Dña Antonia Martín Castillo, bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Diciembre de 2007

M. Teresa Castells



Fdo.: Maria Teresa Castells Mora



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
PATOLOGÍA MÉDICA Y DE LA NUTRICIÓN

D Ignacio Ayala de la Peña, Profesor Titular de Universidad del Área de Medicina y Cirugía Animal, del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia, **AUTORIZA**

La presentación de la Tesis doctoral titulada "*Efecto de la atorvastatina sobre la Enfermedad Grasa del Hígado No Alcohólica (EGHNA) inducida en pollos mediante una dieta hiperlipémica*", realizada por Dña Antonia Martín Castillo, bajo mi inmediata dirección y supervisión en el departamento de Medicina Interna y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Diciembre de 2007



Fdo.: Ignacio Ayala de la Peña

Este trabajo experimental ha sido financiado por la Fundación Séneca con los siguientes proyectos

- Referencia PI-7/00785/FS/01
- Referencia 05671/PI/07
- Referencia 04542/GERM/06

Ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Artículos:

- Martín Castillo A, García-Pérez B, Ayala I, Adánez G, Ortega JV, Sánchez MT, Castells MT. Evaluación macroscópica y microscópica del efecto de la atorvastatina sobre la progresión-regresión de la esteatosis hepática en un modelo aviar. *Clínica e investigación en arteriosclerosis* 17, 270-276, 2005.
- David Hernández-Espinosa, Ignacio Ayala, Maria Teresa Castells, Bartolomé García-Pérez, Antonia Martín-Castillo A, Antonia Miñano, Isabel Arcas, Vicente Vicente, Javier Corral. Intracellular retention of hepatic serpins caused by severe hyperlipidemia *Liver international* 26, 708-715, 2006

Comunicaciones a Congresos:

- Martín Castillo A, García Pérez B, Ayala I, Ortega JV, Sánchez-Polo MT, Adanez G, Castells MT. Caracterización histológica del hígado en un modelo experimental de enfermedad grasas hepática en pollos.
Congreso/Reunión científica: XVII Congreso nacional de la sociedad española de arteriosclerosis.
Lugar de celebración: Murcia 2-5 junio 2004
- Martín Castillo A, García Pérez B, Ayala I, Adanez G, Ortega JV, Sánchez-Polo MT, Castells MT. Evaluación macroscópica del efecto de la atorvastatina sobre la progresión-regresión de la esteatosis hepática en un modelo aviar
Congreso/Reunión científica: XVII Congreso nacional de la sociedad española de arteriosclerosis.
Lugar de celebración: Murcia 2-5 junio 2004

- García Pérez B, Ayala I, Martín- Castillo A, ortega JV, Sánchez-Polo MT Adanez G, Castells MT, Fernandez-Pardo J, Efecto de la atorvastatina sobre la regresión de la enfermedad grasa del hígado no alcohólica en pollos
Congreso/Reunión científica: Club español para la investigación de dislipemias.
Lugar de celebración: Stiges 7-10 octubre 2004
- Martín-Castillo A, G Adanez, Sánchez-Polo MT, Ayala I, García-Pérez B, Castells MT. Valoración cuantitativa de los acúmulos grasos en esteatosis hepática aviar mediante análisis de imagen
Congreso/Reunión científica: XVIII Congreso nacional de la sociedad española de arteriosclerosis.
Lugar de celebración: A Coruña, 4-7 Mayo 2005
- Martín-Castillo A, Castells MT, Ayala I, Gómez-García J, García-Pérez B. Efecto de la atorvastatina sobre el grado de inflamación y esteatosis en la enfermedad grasa del hígado en un modelo experimental
Congreso/Reunión científica: XXXI Congreso anual de la fundación y asociación española para el estudio del hígado
Gastroenterología y hepatología 29, supl 1, 163, 2006
Lugar de celebración: Madrid 15-17 febrero 2006

Agradecimientos

Aunque en esta tesis he invertido mucha dedicación, tiempo y esfuerzo nunca hubiera sido posible su realización sin la ayuda desinteresada de M^a Teresa Castells Mora a quien dirijo mi más sincero y profundo agradecimiento, porque a pesar de sus múltiples ocupaciones encontró el momento para guiarme e inculcar el rigor científico necesario a este trabajo. Con la finalización de esta tesis se ha cerrado una etapa muy importante de mi vida y empieza otra, en la que también espero poder contar con ella. Una vez más todo mi agradecimiento.

A Bartolomé García Pérez por haber depositado su confianza en mí para la realización en este trabajo, por su capacidad para combinar la labor asistencial, docente e investigadora. Su orientación y ayuda han sido fundamentales en el inicio de este trabajo y también en mi formación como residente.

A Ignacio Ayala de la Peña por su asesoramiento y dirección, especialmente por su papel como veterinario en el desarrollo del modelo experimental y en la revisión de las publicaciones y de esta memoria de investigación.

Al Profesor Soria Arcos, por haber aceptado ser tutor de esta tesis.

A mis compañeros, Juan Vicente Ortega Liarte, M^a Teresa Sánchez-Polo, María de Gracia Adánez Martínez, por todas las horas compartidas en este equipo de trabajo.

Al Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina por habernos proporcionado los medios necesarios para la realización de las técnicas histológicas.

Al Prof. Juan Gómez por su ayuda para el análisis estadístico de los datos.

A la empresa Hijos de Juan Pujante y Avícola Levantina por proporcionarnos los animales.

Al Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia por el apoyo prestado especialmente en análisis de imagen y microscopía electrónica.

A todos mis compañeros del Hospital Santa María del Rosell de Cartagena y especialmente al Servicio de Aparato Digestivo por el buen ambiente, disposición a ayudar, por aportar ideas y conocimiento e intentar mejorar día a día.

Por último quiero tener un agradecimiento especial a mi familia, mis padres (Antonio y Virtudes), que siempre han luchado por mi educación y darme todo lo mejor. Por haber confiado en mí, por su amor incondicional y generosidad. A mi hermana (Isabel María) y mi cuñado (Paco) que siempre me han dado ánimos y no puedo olvidar el agradecimiento con todo cariño a mi queridos sobrinos, Francisco Javier por su gran capacidad de trabajo y la ilusión con la que afronta nuevos retos e Isabel M^a por su gran talento artístico y constancia diaria. Ellos son signos de vitalidad y han sido mis estímulos constantes para superar las dificultades y llevar adelante esta Tesis

Sin el gran apoyo de mi familia habría sido imposible llevar a buen puerto este trabajo de investigación.

ABREVIATURAS

4-HNA: 4-hidroxinonenal

AG: Ácidos grasos

AGL: Ácidos grasos libres

ALT: Alanina aminotransferasa

AMPc: Adenosín-monofosfato celular

AMPK: Adenosín-monofosfato proteinquinasa activada

apo: apolipoproteinas

AST: Aspartato aminotransferasa

ATP: Adenosín trifosfato

AUDC: Ácido ursodeoxicólico

BAAT: Body Mass Index, ALT, AGE, TG (Índice de masa corporal, ALT, edad, triglicéridos)

BYI: Bypass yeyunoileal

CEH: Células estrelladas del hígado

CRM: Cadena respiratoria mitocondrial

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAmt: DNA mitocondrial

EGHNA: Enfermedad grasa del hígado no alcohólica

EHA: Esteatohepatitis alcohólica

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

FA: Fosfatasa alcalina

FADH₂: Dinucleotido de flavina adenina

FDA: Food and Drug Administration

FLS: Fatty liver syndrome (síndrome de hígado graso)

GGT: Gammaglutamiltransferasa

gr: gramos

H&E: Hematoxilina y eosina

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HAIR: Hipertensión, ALT, Insulin resistente (Hipertensión, ALT, resistencia a insulina)

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HMG-CoA: 3-OH-3-metilglutaril-CoA

HMG-CoA: Hidroxi-metil-glutaril-CoA

HNF-4: Factor hepático nuclear 4

IC: Intervalo de confianza

IL-8: Interleuquina 8

IMC: Índice de masa corporal

IMP3: inhibidor de la matriz de la metaloproteínasa 3

L-CPT-1: Carnitina palmitoil transferasa-I hepática

LDH: Lactato deshidrogenasa

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

MCAD: Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media

MDA: Malondialdehído

MMPs: Matriz de Metaloproteinasas

MMP9: Matriz de metaloproteínasa 9

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease (Enfermedad grasa del hígado no alcohólica)

NAS: NASH Activity Score (Índice de actividad de la esteatohepatitis no alcohólica)

NASH: Nonalcoholic steatohepatitis (Esteatohepatitis no alcohólica)

NASH CRN: Clinical Research Network (Red de investigación clínica)

O₂^{·-}: Radical superóxido

OH[·]: Radical hidróxilo

OR: odds ratio

PAS-d: Tinción ácido Periodico-Schiff tras digestión con diastasa

PCR: Proteína C reactiva

PMN: polimorfonuclear

PPAR: Receptores del peroxisoma proliferante activado

RER: Retículo endoplasmático rugoso.

RLO: radicales libres de oxígeno

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Reactive oxygen species (Especies reactivas del oxígeno)

TGF-β: Factor de crecimiento tumoral β

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TOH: Trasplante ortohepático

TZDs: Tiazolidinedionas

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD GRASA DEL HÍGADO NO ALCOHÓLICA (EGHNA).....	9
2.1) Diagnóstico diferencial con la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)...	9
2.2) Enfermedad grasa del hígado no alcohólica (EGHNA) secundaria.....	11
3. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA EGHNA.....	17
3.1) Diabetes.....	18
3.2) Obesidad.....	19
3.3) Hiperlipemia.....	20
4. PREVALENCIA EN LA POBLACIÓN GENERAL DE LA EGHNA PRIMARIA.....	21
5. FACTORES DE RIESGO DE PROGRESIÓN E HISTORIA NATURAL DE LA EGHNA.....	25
6. PRESENTACIÓN CLÍNICA	29
6.1) Signos y síntomas.....	29
6.2) Pruebas de laboratorio.....	29
6.3) Pruebas de imagen.....	30
6.4) Papel de la biopsia hepática.....	30
6.5) Diagnóstico.....	31
7. PATOGENIA DE LA EGHNA	
7.1) Funciones del hígado.....	33
7.2) Teoría del doble impacto.....	35
7.2.1) Primer impacto: Desde la resistencia a la insulina al hígado graso.....	37
7.2.2) Segundo impacto: Desde la esteatosis a la esteatohepatitis. Estrés Oxidativo.....	42
7.3) Otros mecanismos potencialmente implicados.....	53
8. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EGHNA	
8.1) Anatomía e histología hepática.....	55
8.2) Ultraestructura del hígado.....	60
8.3) Histología hepática de las aves.....	61

8.4) Características histológicas de la EGHNA.....	65
8.4.1) Lesión parenquimatosa en la EGHNA.....	67
8.4.2) Lesión portal / periportal de la EGHNA.....	73
8.4.3) Otros hallazgos histológicos de la EGHNA.....	74
8.4.4) Diferencias entre esteatosis y esteatohepatitis.....	75
8.4.5) Criterios mínimos requeridos para hacer el diagnóstico de EHNA.....	76
8.5) Evaluación de la severidad de la enfermedad. Gradación y estadificación.....	78
8.5.1) Gradación de la EGHNA.....	79
8.5.2) Estadificación de la EGHNA.....	81
8.5.3) Sistema de puntuación histológica de la EGHNA.....	82
8.5.4) Índice de actividad histológica de la EGHNA (NAS).....	86
8.6) EGHNA en los niños.....	89
8.7) Diferencias histológicas según su etiología	89
8.7.1) Esteatohepatitis alcohólica (EHA) vs ENA.....	89
8.7.2) Con otras formas secundarias de EGHNA.....	90
9. MODELOS ANIMALES DE ESTEATOSIS HEPÁTICA.....	91
9.1) Alteraciones genéticas que incrementan la lipogénesis.....	91
9.2) Factores ambientales que causan incremento de ácidos grasos.....	92
9.3) Causas genéticas que dificultan la eliminación de grasa hepática.....	94
9.4) Causas ambientales que disminuyen la eliminación de grasa hepática	95
10. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA EGHNA Y ESTATINAS.....	98
10.1) Tratamiento del sobrepeso y de la obesidad.....	98
10.2) Tratamiento de la hiperlipemia.....	99
10.3) Tratamiento de la resistencia a la insulina.....	100
10.4) Tratamiento del estrés oxidativo.....	102
10.5) Otros fármacos.....	103
10.6) Citoprotectores.....	103
10.7) Estatinas.....	105
10.7.1) Síntesis de colesterol y mecanismos de acción.....	105
10.7.2) Descubrimiento y desarrollo de las estatinas.....	110
10.7.3) Posible efecto de las estatinas sobre la EGHNA.....	112

10.7.4) Empleo de las estatinas en la EGHNA.....	115
10.7.5) Efectos secundarios.....	119
11. OBJETIVOS.....	125
12. MATERIAL Y MÉTODOS.....	129
12.1) Animales y dieta.....	131
12.2) Etapas y grupos de estudio.....	132
12.3) Recogida de muestras.....	135
12.4) Variables objeto de estudio.....	136
12.5) Técnicas analíticas del plasma.....	136
12.6) Análisis macroscópico del hígado.....	137
12.7) Caracterización histológica. Valoración morfológica cuantitativa por análisis de imagen.....	139
12.7.1) Valoración de la esteatosis.....	140
12.7.2) Valoración de la inflamación.....	143
12.7.3) Valoración de la lesión hepatocelular.....	146
12.7.4) Valoración del índice de actividad de la enfermedad (NAS)...	147
12.8) Técnicas inmunocitoquímicas.....	148
12.9) Microscopía electrónica.....	149
12.10) Análisis estadístico de datos.....	150
13. RESULTADOS.....	151
13.1) Resultados bioquímicos.....	153
13.2) Análisis macroscópico.....	155
13.3) Caracterización histológica. Valoración morfológica cuantitativa.....	159
13.3.1) Descripción histológica de cada grupo experimental.....	159
13.3.2) Valoración de la esteatosis.....	160
13.3.3) Valoración de la inflamación.....	168
13.3.4) Valoración del daño hepatocelular.....	179
13.4) Índice de actividad de la enfermedad (NAS). NAS cualitativo y cuantitativo.....	180
13.5) Resumen de las características histológicas. Análisis cuantitativo.....	183
13.6) Estudio inmunocitoquímico.....	185
13.7) Microscopía electrónica.....	188

14. DISCUSIÓN	203
14.1) Modelo animal.....	205
14.2) Análisis bioquímico del plasma.....	207
• Lípidos plasmáticos.....	207
• Pruebas de función hepáticas y otros marcadores.....	209
14.3) Estudio de la lesión hepática.....	212
14.3.1) Evaluación macroscópica y NAS.....	213
14.3.2) Valoración del análisis histológico.....	214
• Esteatosis.....	214
• Inflamación.....	217
• Balonización.....	219
• Puntuación NAS.....	219
• Fibrosis.....	221
• Inmunocitoquímica.....	222
• Microscopía electrónica.....	223
15. CONCLUSIONES	227
16. BIBLIOGRAFÍA	231