

MATERIAL Y MÉTODOS



6.1.-ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES.

Para la realización de los protocolos experimentales se utilizaron 100 pollos de la raza White-Leghorn, de 3 semanas de edad, aislados en una habitación con temperatura controlada (dependencias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia) y alimentados con la dieta usual para este tipo de animales. 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.

Grupos experimentales:

A los 21 días de edad se separaron de forma arbitraria en 2 grupos:

- Grupo A : 20 pollos
- Grupo B: 80 pollos

A partir de este momento, comenzó la fase de inducción y los animales eran sometidos a distintos regímenes de alimentación. Finalmente cada grupo experimental, descrito a continuación, constaba de 20 animales:

Grupo A: Alimentados con 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 12.500mg; B1, 1g; B2, 3,75g; B12, 12,5mg; B6, 1,25g; ácido pantoténico, 5g; ácido nicotínico,

12,5g; biotina, 75mg; K3, 1,5g; ácido fólico, 750mg; manganeso, 30,00g; zinc, 27,50g; hierro, 12,50g; cobre, 3,75g; yodo, 750mg; selenio, 75mg; cobalto, 150mg; molibdeno, 250mg; excipiente c.s.p., 1.000g (además de un coccidiostático, la monensina).

Grupo B: Alimentados con 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 realizó el sacrificio de 10 animales del grupo A y del B.

A continuación el grupo B fue dividido en 4 grupos al azar en una segunda fase de dieta (3 meses) para los estudios de progresión y regresión.

Grupo B: control con dieta grasa;

Grupo C: animales que reciben una primera fase de dieta grasa (3 meses) y segunda fase con dieta normal (3 meses);

Grupo D: primera fase de 3 meses de inducción con dieta grasa seguida de retirada de la dieta grasa con administración de atorvastatina durante 3 meses.

Grupo E: 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 empleó como placebo 2 ml de polietilenglicol en los grupos a los que no se administraba el fármaco.

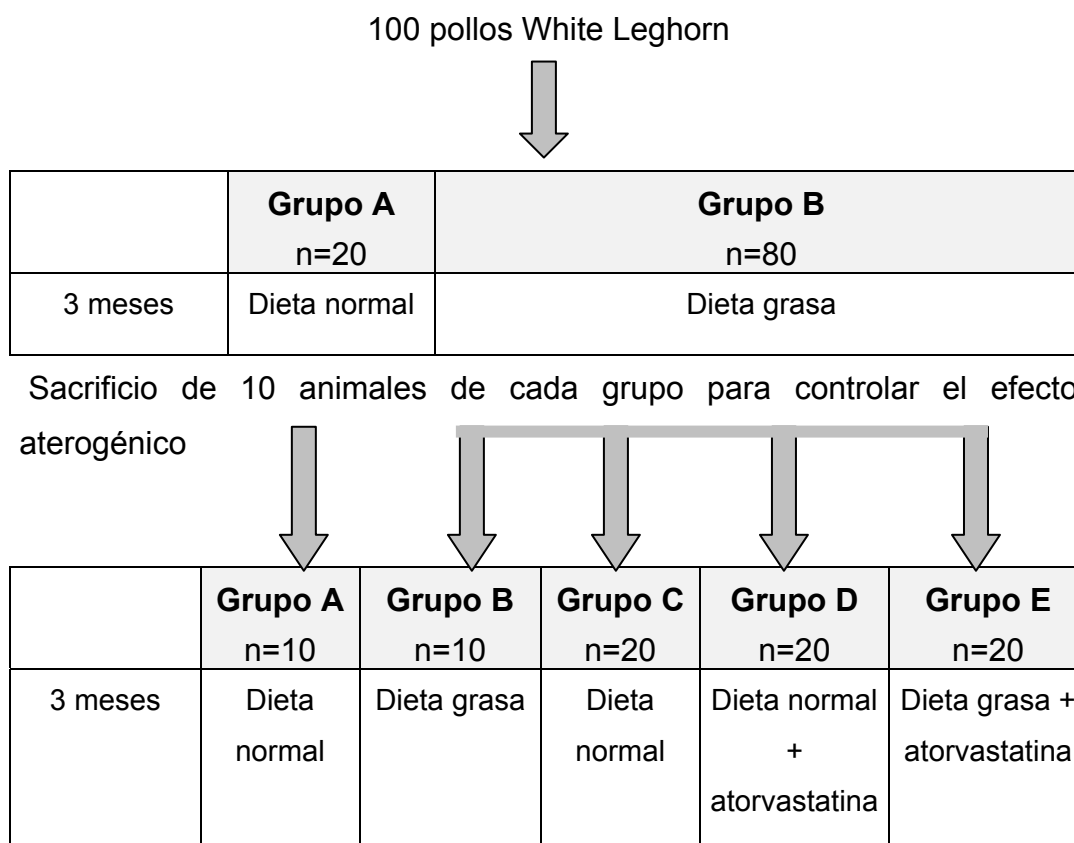


Fig. 1.- Esquema del diseño experimental empleado en el suministro de las dietas.

6.2.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL.

Previamente a la obtención del material de estudio, los animales se dejaron doce horas en ayunas. Posteriormente se les extrajo de la vena axilar o yugular, muestras de sangre (1ml) para las determinaciones del hemograma, coagulación y bioquímica centrifugando a 3000 r.p.m. durante 20 minutos para obtener el plasma.

Tras la obtención de las muestras de sangre, en cada una de las sesiones, se anestesiaron 10 animales de cada grupo con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (150 mg).

En la disección, se realizaba una incisión longitudinal desde el cuello hasta la cloaca, abriendo longitudinalmente el peritoneo y el esternón. Posteriormente se seccionaba la tráquea para producir la parada cardiorrespiratoria, se extraía el paquete digestivo y el árbol vascular para tener acceso a los riñones, que quedaban adosados a la columna vertebral. Finalmente se obtuvieron las muestras de riñón de 10 animales por grupo experimental.

Todo el proceso de extracción de sangre, anestesia, disección y fijación del material no excedió de treinta minutos.

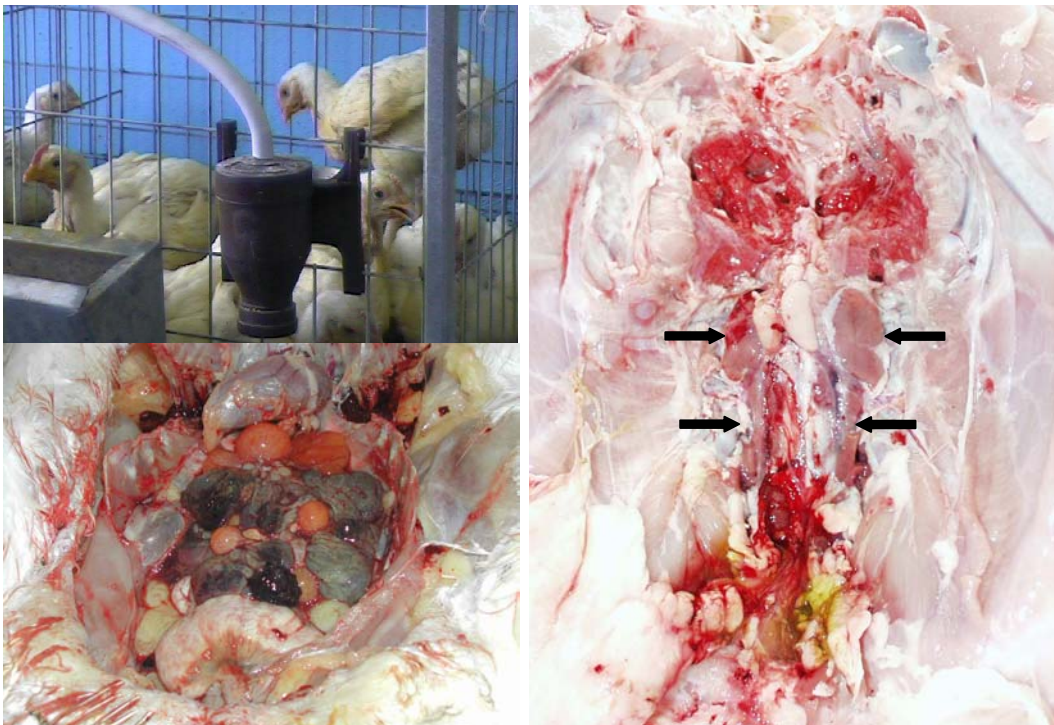


Fig. 2.- Disección de los animales para acceder a los riñones (flechas). Se encuentran protegidos por el synsacrum.

6.3.- ANÁLISIS DEL PLASMA.

En cada muestra de plasma se analizó colesterol total, lípidos de baja densidad (LDL), y de alta densidad (HDL), triglicéridos, y enzimas hepáticas, aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) y proteína C reactiva (PCR). Los lípidos y las enzimas hepáticas (AST, ALT) se midieron en el analizador D-2400 y P800 (Hitachi, LTD, Tokio, Japón) y el kit de ensayo de los laboratorios Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El colesterol se determinó mediante el test color-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. La PCR se determinó mediante la prueba Tina-quant de PCR (intensificada con látex), un test inmunoturbidimétrico potenciado con partículas. Se utilizaron los analizadores automáticos Roche/Hitachi y modular P:ACN 019.

6.4.- ESTUDIO HISTOLÓGICO. MICROSCOPIA DE LUZ.

Primeramente se realizó una descripción macroscópica tras la obtención de la muestra, atendiendo al color, forma y aspecto morfológico.

Para el estudio histológico se tomó una muestra de riñón por animal siempre de la misma región; estas muestras fueron fijadas por inmersión en 10% de formaldehído en tampón fosfato salino a pH 7.4 (PBS) durante 10 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se

procesaron para su inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 5µm en un microtomo de rotación Microm (HM310).

Las secciones se depositaron en un portaobjetos impregnado con poly-L-lisina para evitar su desprendimiento (Huang et al. 1983) y posteriormente se dejaron secar hasta el momento de la tinción. Se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina, Periodic Acid Schiff (PAS) (Martoja y Martoja, 1970) y Tricrómico de Masson (Martoja y Martoja, 1970)

6.5.- TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS

Se realizaron técnicas inmunocitoquímicas para determinar la presencia de α -actina, matriz de metaloproteinasa-9 e inhibidor de la matriz de la metaloproteinasa 3.

Brevemente, tras desparafinar e hidratar, se procede al bloqueo de la peroxidasa endógena con 0.3 % H₂O₂ en PBS. Tras lavados en PBS, las secciones preparadas para incubar con anticuerpos contra MMP9 e IMP3 fueron sometidas al pretratamiento de desenmascaramiento de antígenos manteniéndolas en Tris 10 mmol/l edta 1 mmol/l pH9, durante 20 min a punto de ebullición. Tras dejar enfriar a temperatura ambiente, todas las secciones fueron incubadas en cámara húmeda con suero normal de conejo (NRS, 1:20), 20 min, posteriormente se depositó el correspondiente anticuerpo primario, dejándose toda la noche a 4°C. Tras lavados en PBS, se deja incubar en la segunda capa anticuerpo policlonal de conejo conjugado con peroxidasa, durante 1h a temperatura ambiente. Tras lavar en PBS se procede al revelado de la peroxidasa con 0.05%

3,3´diaminobencidina (DAB) y 0.015% H₂O₂ en PBS durante 7 min. Se lavan en agua, se contrastan ligeramente con hematoxilina, se deshidratan aclaran y montan en DPX. Los anticuerpos fueron diluidos en PBS con 1% albúmina de suero bovino (BSA).

Controles: la especificidad de la técnica se realizó por sustitución de la primera capa por PBS en secciones seriadas de las anteriores y teñidas conjuntamente al resto de secciones. No se obtuvo ningún marcaje y estos son los controles de la técnica propiamente dichos.

Hemos empleado los siguientes anticuerpos primarios contra:

- α -actina (act). Pondrá de manifiesto la activación de la matriz mesangial por proliferación o acúmulo de α -actina.
- Matriz metaloproteinasa 9 (MMP9) Es una gelatinasa y está implicada en la degradación de la matriz extracelular tiene afinidad entre otros por colágeno, gelatina y fibronectina.
- Inhibidor de la matriz de metaloproteasa 3 (IMP3) Inhibe la acción de la metaloproteinasa 3, una estromalisina con afinidad para colágeno, gelatina.

Fig. 3.- Características de los anticuerpos empleados.

Anticuerpo Primario	Dilución de trabajo	Generado en	Casa comercial
Anti-act	1:100	ratón	DakoCytomation
Anti-MMP9	1:40	ratón	Novocastra
Anti- IMP3	1:50	ratón	Novocastra
Anticuerpo secundario		Origen animal	
Anti-Ig ratón	1:100	conejo	DakoCytomation

6.6.- TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Otras muestras fueron fijadas en 2% glutaraldehído en PBS durante 2 horas a 4°C y procesadas para su inclusión en la resina LR White. Se obtuvieron secciones semifinas de 1 µm en un ultramicrotomo UC-4 (Leica, Barcelona). Estas secciones fueron teñidas con azul de toluidina al 0.3% en solución acuosa, para conseguir una descripción histológica mas detallada.

A partir de estos cortes semifinos se realizaron secciones ultrafinas que se recogieron con rejillas de cobre cubiertas de formvar y posteriormente se realizó el contraste de las mismas con acetato de uranilo (6 min) y citrato de plomo (3 min) y fueron observadas en el microscopio electrónico Zeiss EM/ 10c.

6.7.- ANÁLISIS CUANTITATIVO POR ANÁLISIS DE IMAGEN.

Posteriormente se realizó una descripción de los riñones de cada grupo según sus características histológicas y análisis cuantitativo de diversos parámetros. Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo mediante una cámara Sony DXC151-AP acoplada a un microscopio Zeiss Axioskop conectado a un ordenador con el software de análisis de imagen MIP-4.5 (Microm Image Processing software, Digital Image System, Barcelona).

Los parámetros valorados fueron los siguientes:

-Grasa

-Inflamación

- Fibrosis
- Daño glomerular
- Marcadores inmunocitoquímicos
- Sistema vascular

6.7.1.-Valoración de la grasa.

En la evaluación de la grasa recogimos tres tipos de datos:

- a- Ausencia/ presencia de grasa
- b-Tipo de depósito
- c-Tamaño y forma del acúmulo graso.

a y b: Ausencia/ presencia y tipo de depósito.

Para la valoración de ausencia/presencia y tipo de depósito, se asignaron puntuaciones numéricas con finalidad estadística a cada campo de observación, en un total de 100 campos (cuadrados de 134 μm de lado) por grupo experimental. Se corresponde con 10 campos de observación por animal en muestras teñidas con hematoxilina-eosina y muestras marcadas con IMP3.

Las puntuaciones asignadas fueron las siguientes:

0: ausencia, 1: presencia, 0, inclusión lipídica aislada; 1, acúmulo graso y 2 tipo mixto, combinación de los dos anteriores.

c-Tamaño y forma del acúmulo graso.

Los grandes acúmulos grasos, fueron valorados por análisis de imagen. Tras la digitalización de la imagen, se seleccionaron los acúmulos mediante selección interactiva de los mismos, empleando el software MIP4.5 evaluando el área, diámetro máximo y forma circular. El factor de forma circular correspondiente al círculo es 1, mientras que 0 corresponde a una línea.

En todos los casos posteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos en SPSS 11, realizando una ANOVA y test de comparaciones múltiples.

6.7.2.- Valoración de la inflamación.

No se realizó valoración cuantitativa de focos dada la escasa representatividad de muestras con inflamación, se realizó una descripción cualitativa incluida en el punto 8.3.1.

6.7.3.-Valoración de la fibrosis

En el grupo B, no se llegó al estadio de fibrosis, por lo tanto no se realizó una valoración cuantitativa.

6.7.4.- Valoración del daño glomerular.

6.7.4.a.-Análisis semicuantitativo del grado de lesión de los glomérulos

Para la valoración del grado de lesión glomerular se empleó una modificación de la valoración semicuantitativa de Boffa et al. 2003. Ésta se basa en estudiar la esclerosis glomerular y el daño microvascular según los depósitos de matriz extracelular en el glomérulo.

Se utilizaron muestras teñidas con hematoxilina-eosina en campos cuadrados de 267 μm de lado valorando 100 campos de cada grupo experimental.

El estudio se realizó en dos fases:

A.- Muestreo de glomérulos renales en todo el riñón.

B.- Muestreo por separado en los glomérulos tipo reptiliano y mamífero.

Los grados de lesión glomerular se estimaron según las siguientes características:

- Grado 0. -Normal, interior laxo, sin grandes depósitos de matriz extracelular en glomérulo.
- Grado 1. -1-25% de incremento de matriz extracelular respecto al grado normal
- Grado 2.-26-50% de incremento de matriz extracelular respecto al grado normal
- Grado 3.- 51-75% de incremento de matriz extracelular respecto al grado normal
- Grado 4.- 76-100% de incremento de matriz extracelular respecto al grado normal

6.7.4.b.- Análisis morfométrico de glomerulos tipo reptiliano y mamífero.

Tras la digitalización de las imágenes en campos cuadrados de 134 μ m de lado, mediante análisis de imagen se segmentó por niveles de gris el área de los glomérulos renales. Los diámetros equivalentes de los corpúsculos renales se obtuvieron interactivamente. El estudio se realizó por separado en glomérulos reptilianos y tipo mamífero.

6.7.5.- Valoración de marcadores inmunocitoquímicos.

a.- α -Actina.

Las imágenes de diversos campos de riñón fueron digitalizadas y evaluadas en campos de observación cuadrados de 134 μ m de lado. El estudio cuantitativo se realizó empleando el software MIP 4.5 sobre imágenes en color RGB, que fueron transformadas a escala de grises. El canal verde provocó un mayor contraste de los grises, por tanto fue este canal el que se utilizó para el análisis del nivel de gris. La imagen digital se compone de una matriz de 512x512 pixels, en la que cada píxel contiene un número entre 0 (negro) y 255 (blanco) que representa la intensidad de la luz transmitida o el nivel de gris en un punto. Queremos que el nivel de gris esté relacionado con el contenido en α actina en una relación directa. El análisis se realizó con la imagen invertida (la imagen negativa) de forma que los valores mas altos se correspondieran con los de mayor contenido en α actina. Por un lado se segmentaron automáticamente los niveles de gris correspondientes a la inmunorreactividad a α actina en el corpúsculo renal e interactivamente

se seleccionó la máscara correspondiente al corpúsculo renal en otra imagen de referencia. En cada una de las imágenes se cuantificó el área y el nivel de gris invertido.

El contenido de α actina se evaluó de diferentes formas:

1.- La proporción entre el área inmunorreactiva a α actina (actA) multiplicada por su nivel de gris medio invertido (actG) y dividido por el área correspondiente a su corpúsculo (CA).

Contenido en α actina=(actA x actG / CA).

2.- La proporción entre los cocientes de los productos de área inmunorreactiva a α actina (actA) por su correspondiente gris medio invertido (actG) entre el producto del área (CA) por gris medio invertido del corpúsculo de referencia (CG)

Contenido en α actina=(actA x actG / CG x CA).

3.- Cociente entre el área inmunorreactiva a (actA) y el área del corpúsculo de referencia (CA)

Contenido en α actina=(actA / CA).

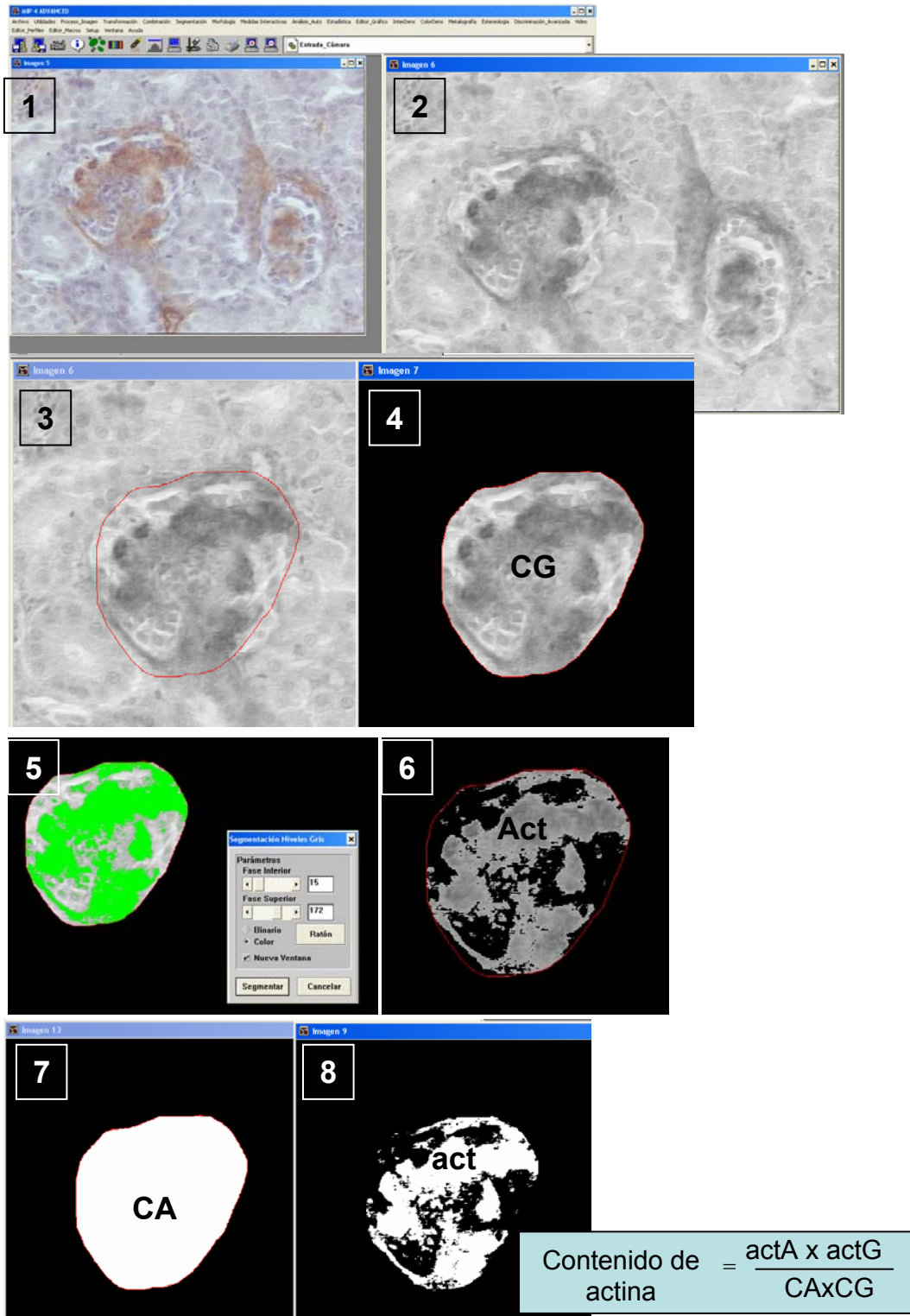


Fig.4.- Pasos de análisis de imagen de obtención de la inmunorreactividad a α -actina según la fórmula indicada. ActA: área de actina, actG: gris invertido de actina, CA: área del corpúsculo; CG: gris invertido del corpúsculo

b- MMP9 y IMP3

Las imágenes de diversos campos de riñón fueron digitalizadas y evaluadas en campos de observación cuadrados de 134 μm de lado. El estudio cuantitativo se realizó empleando el software MIP 4.5 sobre imágenes en color RGB, que fueron transformadas a escala de grises, 8 bits, 256 niveles. El canal verde provocó un mayor contraste de los grises, por tanto fue este canal el que se utilizó para el análisis del nivel de gris. Se tomaron muestras de los niveles de gris en los túbulos proximales y distales en corteza y médula. Dado que no se observó ningún tipo de distribución o cambios de área, se valoró exclusivamente el nivel de gris de la imagen invertida como estimación del contenido de MMP9 y IMP3. Se empleó el gris invertido para que a mayor valor numérico correspondiera una mayor reactividad.

6.7.6.- Valoración del sistema vascular

Tras la digitalización de la imagen se evaluaron las características de los vasos: arterias intralobulares y arteriolas, en 10 campos de observación por animal, (campos cuadrados de 134 μm de lado) en muestras inmunorreactivas a α -actina. Se realizó la segmentación de las áreas del vaso y de la luz con el software MIP 4.5 determinando los parámetros siguientes:

- El diámetro externo del vaso
- Diámetro de la luz (diámetro interno del vaso)

- Área del vaso (incluyendo la luz)
- Área de la luz

Posteriormente en la hoja de cálculo excel se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Área de la pared (resta de área de vaso y área de la luz)
- Grosor de la pared (resta de diámetro externo e interno del vaso)
- Relación pared/ luz (cociente entre grosor de la pared y el diámetro de la luz)

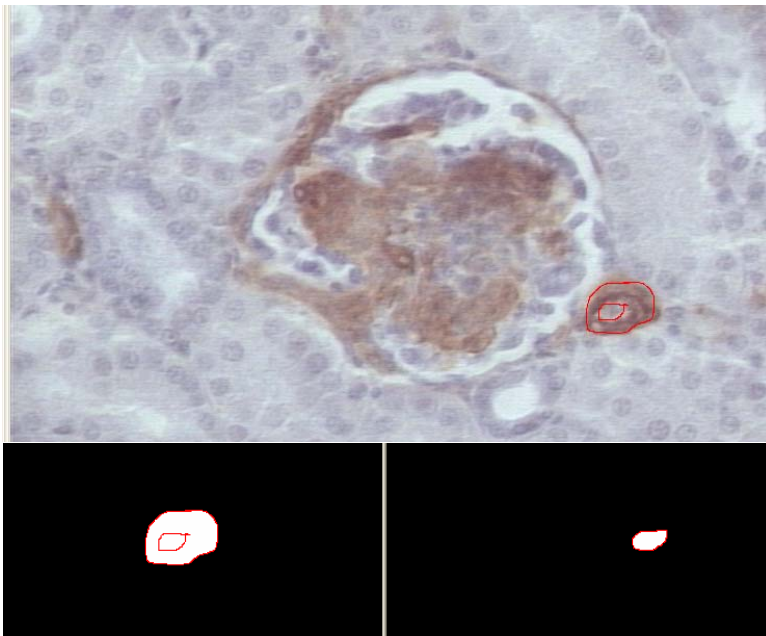


Fig 5.- Análisis de imagen de los vasos

6.8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados se analizaron utilizando el paquete informático SPSS v11. Se aplicó el test de ANOVA y pruebas de comparaciones múltiples dos a dos.