

CARACTERIZACIÓN DEL POLLO COMO BIOMODELO EXPERIMENTAL EN ARTERIOSCLEROSIS: LESIONES EN TRONCOS SUPRA-AÓRTICOS

Use of the chicken as experimental biomodel in atherosclerosis: supra-aortic lesions

Sánchez-Polo M.T.¹, Castells M.T.², García Pérez B.³, Adánez G.³, Martín A.¹, Ayala I.*⁴

¹ Hospital General Universitario "Santa Lucía", Cartagena, Murcia. ² Dpto. Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. ³ Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca", El Palmar, Murcia. ⁴ Dpto. Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

***Autor para correspondencia:** Ignacio Ayala, Tel. 868-887070, Fax 868-884147, E-mail: iayape@um.es

RESUMEN

La enfermedad cardiovascular es hoy en día la primera causa de mortalidad en las sociedades desarrolladas. Dada la complejidad del desarrollo de la lesión aterosclerótica en el ser humano resulta interesante investigar en modelos animales en los que dicho proceso sea semejante a la enfermedad humana. El pollo, al igual que otras aves, es capaz de desarrollar arteriosclerosis aórtica y coronaria de forma natural o espontánea, e inducida por una dieta enriquecida en colesterol. Teniendo en cuenta que la mayoría de los trabajos publicados describen las lesiones en segmentos aórticos y la variedad de métodos de inducción de la arteriosclerosis, el objetivo de esta investigación es caracterizar de manera adecuada en el modelo aviar utilizado, las lesiones arterioscleróticas de troncos supra-aórticos en un grupo experimental con respecto a un grupo control. Se emplearon 20 pollos de la raza White Leghorn divididos en dos grupos (control y aterogénico) que recibían una dieta normal o hiperlipémica respectivamente durante un periodo de 6 meses. Se sacrificaron entonces los animales para llevar a cabo el estudio bioquímico del plasma (perfil lipídico), evaluación histológica de los troncos supra-aórticos y valoración semicuantitativa de las lesiones según la clasificación de Stary. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para los diferentes parámetros bioquímicos estudiados y para la cuantificación del grado de lesión de Stary. En el grupo aterogénico se observó un endotelio conservado, con íntimas muy aumentadas de tamaño (10 veces el tamaño del grupo control) y muy desorganizadas. En conclusión, estos hallazgos confirman el uso del pollo como biomodelo experimental para el estudio de la arteriosclerosis en troncos supra-aórticos, y podrían ser empleados como referencia para futuros estudios intervencionistas.

Palabras clave: arteriosclerosis experimental, pollo, troncos supra-aórticos.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are considered first cause of human mortality in developed countries. Animal models allow adequate research of atherosclerosis, given the similarities with the human lesions. Chickens may develop spontaneous and also induced atherosclerosis by use of a cholesterol-enriched diet. Most published findings describe aortic lesions in a variety of induction methods. Therefore, the aim of this research is to characterize the used avian model, describing supra-aortic trunk lesions in atherosclerotic chickens and to compare it with control animals. Twenty White Leghorn chickens were used (10 controls fed with a normal diet and 10 atherogenic animals fed with a hyperlipidemic diet, for 6 months). After sacrifice, lipid biochemical parameters were analysed, as well as histologic evaluation of supra-aortic vessels and quantification of lesions following the Stary classification. Statistically significant differences for each parameter were observed between the control and experimental groups. Increased intima layer width with disorganization was observed in atherogenic animals. These findings confirm the use of the chicken as an adequate experimental animal for atherosclerosis, and could be used as a reference for future interventional studies.

Key words: experimental atherosclerosis, chicken, supra-aortic vessels.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular es hoy en día la primera causa de mortalidad en las sociedades desarrolladas, llegando a ser del 80% por encima de los 60 años, tanto en hombres como en mujeres, seguida a distancia del cáncer (Kesteloot et al., 2002; Hajjar y Kotchen, 2003). Dada la complejidad del desarrollo de la lesión aterosclerótica en el ser humano, resulta interesante investigar en modelos animales en los que dicho desarrollo sea semejante a la enfermedad humana.

El pollo, al igual que otras aves, es capaz de desarrollar arteriosclerosis aórtica y coronaria de forma natural o espontánea, e inducida por una dieta enriquecida en colesterol, hecho descrito por primera vez de forma detallada por Dauber y Katz (1943). Las aves están pues entre los primeros modelos animales de arteriosclerosis que han sido estudiados con una gran contribución al conocimiento morfológico y bioquímico del proceso de la arteriosclerosis.

Horlick y Katz, en 1949, diseñaron en pollos el primer estudio de regresión de la arteriosclerosis, demostrando que los fenómenos de regresión en los pollos son más rápidos que en el conejo, ya que en éstos se precisan de 3 a 4 meses para una recuperación de los niveles

plasmáticos de colesterol tras la retirada de la dieta aterogénica y de 3 a 4 años para la regresión respecto a los 4-6 meses en el pollo.

Todos estos trabajos realizados en pollos desde los años cuarenta a los setenta por diversos autores y revisados por Wong (1975) destacan este modelo por ser un animal capaz de ingerir dietas muy variadas, pequeño, de fácil manejo, que puede presentar arteriosclerosis espontánea o inducida con cambios significativos en el colesterol plasmático y una composición de las lipoproteínas HDL, LDL y quilomicrones similares a la especie humana.

Por todo ello, y gracias a estudios propios (García Pérez, 2003; Ortega et al., 2004; Ayala et al., 2005) en los que se ha conseguido reproducir eficazmente el proceso de arteriosclerosis en la especie que nos ocupa y demostrar el efecto beneficioso de diversos fármacos en la regresión de la arteriosclerosis, nos parece el modelo animal más adecuado, pudiendo proporcionar además una herramienta útil para posteriores estudios.

Por otro lado, hemos llevado a cabo trabajos con el objetivo de estandarizar los métodos de inducción de la aterogénesis en este biomodelo aviar, de cara a plantear ensayos con diversos principios activos para conseguir la regresión de las lesiones arterioscleróticas (Ayala et al.,

2005). Se llegó a la conclusión de que resulta más conveniente el uso de colesterol puro añadido a una dieta estándar que la mezcla a base de huevo, junto con un vehículo como el aceite de palma líquido para facilitar la absorción del colesterol a nivel digestivo, y todo ello debe administrarse *ad libitum* (Ayala et al., 2005).

Posteriormente, Adánez et al. (2008) valoraron los cambios histológicos del riñón en pollos sometidos a dieta hiperlipémica utilizando modelos de progresión, regresión e intervención con atorvastatina. Martín Castillo et al. (2010) analizaron los acúmulos grasos en hígado en un modelo experimental en pollos, reproduciendo las características histológicas de la enfermedad grasa del hígado no alcohólica (EGHNA) en humanos, realizando una valoración semicuantitativa y cuantitativa por análisis de imagen, con el fin de determinar los cambios en los depósitos lipídicos y la infiltración inflamatoria en el mismo modelo de progresión, regresión e intervención con atorvastatina, demostrando la eficacia de la atorvastatina en la disminución de los acúmulos grasos en el hígado tanto en el grupo de progresión como en el de regresión.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los trabajos publicados describen las lesiones en segmentos aórticos y la variedad de métodos de inducción de la arteriosclerosis, el objetivo de esta investigación es caracterizar de manera adecuada en el modelo aviar utilizado las lesiones arterioscleróticas de troncos supra-aórticos en un grupo experimental con respecto a un grupo control.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon pollos de la raza White Leghorn (Pollos Pujante, S.A., Murcia, España), en 2 lotes de 10 animales cada uno. Tenían una edad de 21 días, y esas tres primeras semanas de vida se habían alimentado con una dieta estándar de crecimiento y engorde.

Los animales se mantuvieron en las dependencias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia, en salas con temperatura y humedad controlada (aproximadamente 22°C y 45% respectivamente).

Los procedimientos empleados se desarrollaron cumpliendo la legislación vigente en materia de protección animal, y con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Murcia (España).

Empleamos dos grupos de animales: 1) grupo control con dieta estándar de crecimiento; 2) grupo experimental con dieta aterogénica.

Las dietas suministradas durante un periodo de 6 meses fueron las siguientes, respectivamente:

a) Dieta normal para engorde-puesta (grupo control): Cereales (maíz y cebada), harina de soja, fosfato bicálcico, complemento vitamínico-mineral (4 Kg/tonelada de pienso para progenitores Broilers, cuya composición por kg es: Vitamina A, 3000000 UI; D3, 750000 UI; E, 12500 mg; B1, 1 g; B2, 3,75 g; B12, 12,5 mg; B6, 1,25 g; Ácido pantoténico, 5 g; Acido nicotínico, 12,5 g; Biotina, 75 mg; K3, 1,5 g; Acido fólico, 750 mg; Manganeso, 30 g; Zinc, 27,50 g; Hierro, 12,50 g; Cobre 3,75 g; Yodo, 750 mg; Selenio, 75 mg; Cobalto, 150 mg; Molibdeno, 250 mg; Excipiente c.s.p., 1000 gr).

b) Dieta hipercolesterolemia (grupo aterogénico): Dieta aterogénica con un 2% de colesterolina pura y aceite de palma líquido (20%) añadido al pienso normal, administrada *ad libitum*.

Sacrificio y disección de los animales

Los animales de los diversos lotes se sacrificaron al finalizar el periodo indicado. Se dejaban previamente 12 horas en ayunas. Antes del sacrificio se les extraían 10-15 cm³ de sangre de la vena del ala. Posteriormente, se centrifugaba a 3.000 revoluciones por minuto, durante 6 minutos, con lo que se obtenía el plasma para las determinaciones analíticas necesarias.

El sacrificio se realizaba incruentamente mediante la administración de 150 mg de pento-barbital sódico intraperitoneal. Posteriormente, se procedía a la disección del animal, mediante incisión longitudinal desde el cuello a la cloaca.

Se seccionaba la tráquea además del esófago y los troncos supra-aórticos. En bloque y hasta las arterias ilíacas, se liberaba el árbol vascular de todas las vísceras, y de su adherencia a las porciones dorsal y lumbar de la columna, respetando en todo momento la integridad de la aorta descendente. Una vez diseccionado, se realizaba una incisión sagital del ventrículo izquierdo, y una incisión longitudinal de todo el árbol arterial. Los troncos supra-aórticos se fijaban en formol al 10% para su procesado posterior. El tiempo transcurrido entre la parada cardiorrespiratoria y la obtención de todo el material no superaba los 30 minutos.

Determinaciones analíticas

Las muestras de plasma fueron procesadas mediante un analizador automático Hitachi-717 (Hitachi Ltd., Madrid, España), y se emplearon reactivos estándar de la casa Boehringer Mannheim (Boehringer, Barcelona, España), para la determinación de lípidos (triglicéridos, colesterol, HDL, LDL) y otros parámetros bioquímicos (urea, glucosa, ácido úrico, ASAT, ALAT, fosfatasa alcalina).

Análisis histológico

Para el estudio histológico se tomaron los troncos supra-aórticos de los distintos grupos y se procedió a su inmersión en formol al 10% para su procesado posterior e inclusión en parafina. Para ello se introducían dentro de unas rejillas previamente etiquetadas, en distintas concentraciones crecientes de alcohol para deshidratarlas y por último en tolueno y parafina. Posteriormente se preparaban los bloques de parafina. Una vez hechos estos bloques se les realizaron varios cortes de 5 μ m en un microto-

mo de rotación Microm (HM310) (Walldorf, Alemania), colocándolos en un portaobjetos impregnado con poli-L-lisina para evitar su desprendimiento, dejándolos secar para después realizar las distintas técnicas histológicas.

Tras desparafinar en xilol e hidratar en alcoholes decrecientes, las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina y van Giesson. Posteriormente se deshidrataron en alcoholes crecientes, se aclararon en xilol y se montaron los cubreobjetos con DPX.

Las tinciones de hematoxilina-eosina de los distintos grupos se observaron por microscopia de luz y se realizó una descripción histológica de los distintos grados de lesión de cada muestra, valorando la conservación del endotelio, la organización de la capa íntima y media, en cuanto a la celularidad, el incremento de fibras musculares, el depósito de vacuolas de lípidos y su tamaño.

Valoración semicuantitativa de los grados de lesión: grados de Stary

Según las características histológicas observadas en las muestras de los distintos grupos por microscopía óptica para la tinción de hematoxilina-eosina, se realizó una clasificación de las lesiones arterioscleróticas en troncos supra-aórticos con una puntuación desde cero a tres puntos, según el grado de intensidad de los hallazgos (grosor de la capa íntima, celularidad de la íntima y capa media, presencia de depósitos lipídicos, presencia de fibras musculares y existencia de placa de ateroma), imitando en lo posible los cortes histológicos definidos según la clasificación de la American Heart Association, basada en la clasificación de Stary (Stary et al., 1995). Según estos criterios la asignación de la puntuación fue la siguiente:

- Estadio I o normal: (Puntuación “0”). Intima de tamaño normal, organizada, sin presencia de células vacuoladas. Escasa celularidad.
- Estadio II o discreta afectación: (Puntuación “1”). Intima ligeramente aumentada de tama-

ño, aumento discreto de celularidad, con presencia de células vacuoladas subendoteliales aisladas (depósitos aislados de lípidos).

- Estadio III o notable afectación: (Puntuación “2”). Intima aumentada de forma moderada en su grosor, con aumento moderado de la celularidad, alguna fibra muscular aislada y depósitos de lípidos de forma moderada.
- Estadio IV o intensa afectación: (Puntuación “3”). Intima con aumento importante en su grosor, con core lipídico (placa de ateroma) que desorganiza la íntima, celularidad densa y fibras musculares.

Estudio estadístico

Una vez realizada la puntuación en cada grupo, se calculó la media de cada uno de ellos y se realizó el análisis estadístico. Los resultados se analizaron utilizando el paquete informático SPSS v15. Para la significación estadística de los resultados cuantitativos, se aplicó el test de ANOVA o el test de Welch según la prueba de homogeneidad de varianzas, y las correspondientes pruebas de comparaciones múltiples dos a dos. Para las pruebas no paramétricas se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones dos a dos por la prueba de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Resultados bioquímicos

Los valores analíticos obtenidos en los cinco grupos experimentales (colesterol total, LDL-

colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos) se recogen en la tabla 1. Como puede observarse hay una gran diferencia entre el nivel más alto de colesterol y triglicéridos del grupo B, con respecto a los bajos niveles del control sano, grupo A. Se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tras las pruebas de Anova y Bonferroni en el grupo experimental con respecto al control.

Descripción histológica

En el grupo control sano se observa un endotelio conservado, con ausencia de fibras musculares en la íntima, sin estar ésta aumentada de tamaño, ni la capa media. Se observan fibras musculares en la capa media, de una forma organizada, con poca celularidad (Fig 1a).

En el grupo aterogénico el endotelio está conservado, con íntimas muy aumentadas de tamaño (10 veces el tamaño del grupo control), muy desorganizada, con aumento de lípidos en placa de ateroma (Fig 1b), muy grandes ocupando toda la íntima (tejido muy laxo), y depósitos subendoteliales de fibras musculares de forma más homogénea, y entre el espesor de la íntima. Capa media con fibras musculares desorganizadas y mucha celularidad.

Grados de lesión de Stary

Según las características histológicas observadas en las muestras de los distintos grupos por microscopía óptica para la tinción de hematoxilina-eosina, se ha realizado una clasifica-

Tabla 1. Perfil lipídico en plasma

Grupo	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	HDL-colesterol (mg/dl)	LDL-colesterol (mg/dl)
<i>Control</i>	95.11 ± 5.93	79.55 ± 33.49	53.11 ± 8.42	26.00 ± 2.78
<i>Aterogénico</i>	1136.00 ± 196.2*	454.00 ± 165.9*	233.80 ± 33.74*	811.3 ± 162.35*

Los valores se expresan como media ± error típico, para $n = 10$ por grupo experimental. Prueba estadística de Anova y Bonferroni. *: Diferencia significativa entre el grupo control y el grupo aterogénico ($p < 0.05$). HDL: high density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein.

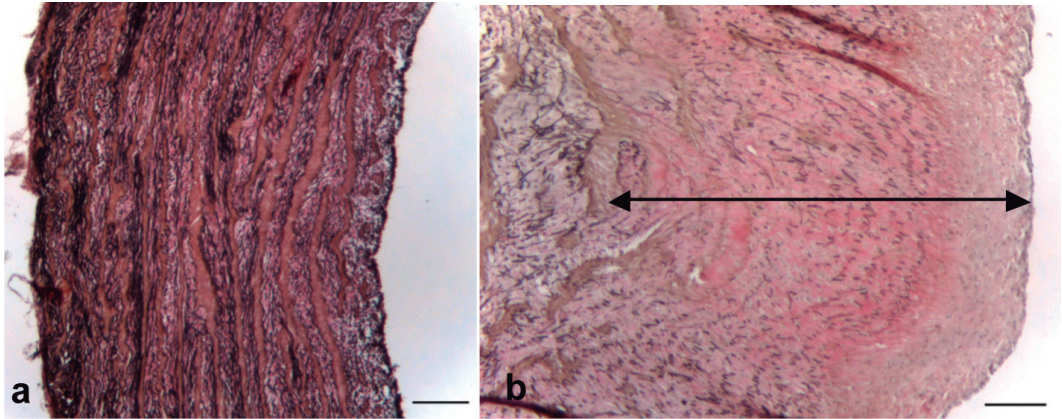


Figura 1. Sección longitudinal tronco supra-aórtico teñido con la técnica de van Giesson. a.- Grupo control sano. Se observa morfología normal, no existe placa de ateroma. b.- Grupo aterogénico, destaca el grosor de la placa de ateroma (flecha). Barra 100 μ m.

Tabla 2. Grados de lesión de Stary

Grupo	Media \pm error típico	Descripción
Control	0.00 \pm 0.00	Control con dieta normal
Aterogénico *	2.90 \pm 0.10	Dieta hiperlipémica

Los valores se expresan como rango promedio, para n=10 animales por grupo experimental. Prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de parejas por la prueba de Mann-Whitney.

*: Diferencia significativa entre el grupo control y el grupo aterogénico ($p < 0.05$).

ción imitando en lo posible los estadios de Stary (1995) según la clasificación de la American Heart Association. Se ha tenido en cuenta el grosor de la íntima, la celularidad de la íntima y de la capa media, la presencia de depósitos lipídicos, la presencia de fibras musculares y la existencia de placa de ateroma.

La Tabla 2 muestra el distinto grado de afectación de los grupos, valorado mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y la prueba de Mann-Whitney, observándose en el grupo control, con dieta normal, sin cambio en la composición normal de la pared vascular, una diferencia estadísticamente significativa con el grupo aterogénico.

DISCUSIÓN

Con la analítica realizada en ayunas en los distintos grupos experimentales se comprueba el perfil bioquímico inducido, objetivando una hiperliproteïnemia tipo IIb con aumento del colesterol-LDL y de los triglicéridos. Se ha comprobado un aumento importante del colesterol, colesterol-LDL y triglicéridos en el grupo aterogénico, con una diferencia significativa con respecto al control, atribuible al efecto de la dieta hiperlipídica.

La arteriosclerosis es una compleja enfermedad crónica de la pared vascular, que se inicia en las primeras décadas de la vida, y conduce

a la formación de la placa fibrosa, que consiste en una acumulación de material lipídico y proteoglicanos, elementos celulares, tejido fibroso y depósitos de calcio. En todo este proceso, la disfunción endotelial constituye el paso patológico más precoz, al estar implicado en la atracción de células inflamatorias hacia la pared vascular, iniciando así la arteriosclerosis (Daignon y Ganz, 2004).

Según la Asociación Americana del Corazón, basada en estudios realizados por Stary et al., (1994 y 1995), las lesiones ateroscleróticas humanas se clasifican en seis tipos en un primer lugar, según su grado de progresión, obteniendo los datos de estudios de arterias coronarias y aortas en localizaciones anatómicas definidas, de 1286 autopsias humanas desde niños a adultos, de distintas edades, con el fin de estudiar su progresión.

Primero definen la estría grasa inicial y las lesiones intermedias (tipo I, II, III). Ambas lesiones de los tipos I (lesión inicial) y II representan pequeños depósitos lipídicos (lipoproteínas y ésteres de colesterol) en la íntima arterial, y el tipo II incluye aquellas lesiones generalmente llamadas “estrías grasas”, siendo visibles por lo general a simple vista como estrías amarillentas sobre la superficie de la íntima. Los cambios en la composición de la matriz y arquitectura de la íntima, son mínimos o ausentes. Las lesiones tipo III representan una lesión intermedia (pre-ateroma), con las lesiones más avanzadas. En este tipo hay aislados acúmulos de lípidos extracelulares, por debajo de las capas de macrófagos.

Las lesiones arterioscleróticas son consideradas avanzadas (tipos IV, V y VI) por criterios histológicos cuando las acumulaciones de lípidos, células y componentes de la matriz, incluyendo minerales, provocan una desorganización estructural, daño y engrosamiento de la íntima, con deformidad de la pared arterial. En nuestro trabajo experimental con pollos se han reproducido las lesiones ateroscleróticas avanzadas, estudiadas en humanos, logrando una gran des-

estructuración y engrosamiento de la capa íntima, al administrar una dieta hiperlipémica.

Según Stary et al. (1994 y 1995) las lesiones tipo IV (ateroma) presentan una acumulación extensa y bien definida en la íntima de lípidos extracelulares (core lipídico), de tipo excéntrica, con desorganización de la íntima. Entre el core lipídico y la superficie endotelial, la íntima contiene macrófagos y aisladas células musculares lisas, con y sin inclusiones lipídicas, sobre todo en la periferia de la lesión, inmersos en una capa rica en proteoglicanos, con mínimo colágeno, lo que la hace susceptible a la formación de fisuras (tipo VI), de ahí su gran importancia en la clínica.

Debido a la desorganización del core lipídico en las células y en la estructura de la matriz intercelular de la íntima se forma nuevo tejido conectivo reparador formado por colágeno y células musculares lisas ricas en retículo endoplásmico rugoso (tipo V) con engrosamiento de la lesión. Cuando el nuevo tejido es parte de una lesión con core lipídico se denomina fibroateroma o tipo Va. Si predominan depósitos de minerales que reemplazan los restos acumulados de células muertas y los lípidos extracelulares, se denomina tipo Vb o lesiones calcificadas. Y si el core lipídico está ausente o es mínimo se denomina tipo Vc o lesiones fibróticas (Stary et al., 1995).

Por último, Stary ha actualizado la clasificación histológica de las lesiones arterioscleróticas basándose en los resultados de varios grupos de investigación con animales de experimentación y estudios de regresión (Stary, 2000). Así las lesiones morfológicas que fueron catalogadas como tipos Vb (lesiones calcificadas) y Vc (lesiones fibróticas) son reemplazados al final de la secuencia como lesiones tipo VII y VIII, pudiendo pasar de unas lesiones a otras al disminuir los niveles de lípidos en sangre.

Según esta clasificación, en nuestro estudio hemos reproducido concretamente las lesiones arterioscleróticas correspondientes al grado IV

y V, tras administrar una dieta hiperlipémica, sin necrosis ni calcificación.

Por otro lado, Williams et al. (2008) hacen una revisión de la literatura de la regresión de la arteriosclerosis en estudios animales, comenzando con Anitschow y Chatalow (1913) que empleaban conejos alimentados con colesterol pasando a una dieta normal baja en grasa durante 2-3 años, y demostraron que las lesiones arteriales comenzaban a ser más fibrosas con un contenido reducido en lípidos, lo que en la actual perspectiva sugiere estabilización de la placa.

Dado que el proceso de arteriosclerosis puede ser espontáneo en el pollo, llama la atención que en el grupo control sano se observa una pared vascular normal en los troncos supra-aórticos. En estudios previos de arteriosclerosis espontánea (Dauber y Kart, 1944) se observaban lesiones sobre todo en la aorta abdominal. Puede observarse por tanto, una íntima organizada, sin desestructurarse, ni estar aumentada de tamaño.

En el grupo control aterogénico es donde la íntima se encuentra muy aumentada de tamaño, y a la vez muy desorganizada, con agregados masivos de lípidos de forma extracelular (core lipídico), con aumento de fibras musculares lisas en todo el espesor de la íntima, lo que corresponde con un tipo IV (ateroma), según la clasificación de Stary (2000). La capa media a su vez, está desorganizada por aumento de fibras musculares y celularidad.

Según los componentes de la lesión de arteriosclerosis descrita previamente por Stary (2000), en los animales de nuestro grupo de experimentación se ha conseguido en las muestras histológicas el tipo IV y V, de forma similar a las lesiones encontradas en humanos. Ahora bien, basándonos en la composición histológica y en la afectación de la pared vascular, se ha realizado una escala de 0-3 puntos según el grado de severidad encontrado, teniendo en cuenta el grosor de la íntima, la celularidad de la íntima y capa media, la presencia de depó-

sitos lipídicos, las fibras musculares lisas y la placa de ateroma.

Previamente Wilson et al. (1982), en conejos alimentados con una dieta hiperlipémica con suplemento de colesterol durante cinco años, clasificaron los resultados en una escala de 0-3, según la cantidad de lípidos, células musculares lisas y colágeno, por observación microscópica en la íntima, sin conocimiento del grupo al que pertenecía. Mostraron también un comportamiento distinto de las lesiones aterocleróticas asociadas al estímulo aterogénico con altas cifras de colesterol en sangre (300 mg/dl). La proliferación de las células musculares lisas era rápida y los monocitos atraídos dentro de la pared vascular eran numerosos, con formación rápida de células espumosas y células musculares lisas con pequeña capacidad para la síntesis de colágeno. Cuando la dieta hipercolesterolémica se retiraba, las células musculares lisas proliferaban más lentamente con pequeña acumulación de macrófagos, y estimulación de las células musculares lisas en la síntesis de colágeno, con lesiones menos sudanófilas y más fibróticas.

Así, en nuestro estudio de experimentación se ha reproducido dicha escala, de 0 a 3, observando un menor grado de puntuación en el grupo control con dieta normal, el cuál presenta una pared vascular organizada, sin aumento de la celularidad, ni depósitos lipídicos, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo aterogénico, que obtiene la puntuación mayor, con mayor cantidad de lípidos, placas de ateroma, mayor engrosamiento de la íntima y mayor depósito de células musculares lisas.

En conclusión, estos hallazgos, y su comparación detallada con los resultados en otros modelos experimentales y en la propia especie humana, con los que guardan un estrecho paralelismo, confirman el interés del uso del pollo como biomodelo experimental para el estudio de la arteriosclerosis en troncos supra-aórticos. Su semejanza con la especie humana convierte

a este modelo aviar en un sujeto experimental adecuado para diferentes ensayos terapéuticos en un campo siempre en continua evolución y desarrollo.

En el trabajo actual se ha conseguido reproducir eficazmente el proceso de arteriosclerosis en pollos de raza White Leghorn, con dicha dieta, en troncos supra-aórticos, aportando valores medios semicuantitativos del grado de lesión, así como su descripción histológica, lo que puede ser de utilidad como referencia para posteriores trabajos experimentales de intervención farmacológica y/o dietética.

BIBLIOGRAFÍA

- ADÁNEZ G., CASTELLS M.T., GARCÍA PÉREZ B., SÁNCHEZ POLO M.T., MARTÍN CASTILLO A., MONTES A., AYALA I. 2008. Effects of atorvastatin on progresión-regression of renal injury in hyperlipidemic chickens *Histol. Histopathol.* 23: 1131-1142.
- ANITSCHOW N., CHATALOW A. 1913. Über experimentelle Cholesterin-statose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentralb. Allgem. Pathol. Anat.* 14: 1-9.
- AYALA I., GARCÍA PÉREZ B., DOMÉNECH G., CASTELLS M.T., VALDÉS M. 2005. Use of the Chicken as Experimental Animal Model in Atherosclerosis. *Avian Poultry Biol. Rev.* 16: 151-159.
- DAUBER D.V., KATZ L.N. 1943. Experimental atherosclerosis in the chick. *AMA Arch. Pathol.* 36: 473-92.
- DAVIGNON J., GANZ P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109 Suppl 3: 27-32.
- ELKIN R.G., ZHONG Y., DONKIN S.S., HENGSTSCHLÄGER-OTTNAD E., SCHNEIDER W.J. 2006. Effects of atorvastatin on lipid metabolism in normolipidemic and hereditary hyperlipidemic, non-laying hens. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 143: 319-29.
- GARCÍA PÉREZ B., AYALA I., CASTELLS M.T., MADRID J.F., ORTEGA M.R., ORTEGA J.V., BALLESTA J., FERNÁNDEZ PARDO J., VALDÉS M. 2003. Planimetric and histological study of the aortae in atherosclerotic chickens treated with nifedipine, verapamil and diltiazem. *Histol. Histopathol.* 18: 1027-1033.
- HAIJAR I., KOTCHEN A. 2003. Trends in Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in the United States, 1988-2000 *JAMA* 290: 199-206
- HORLICK L., KATZ L.N. 1949. Retrogression of atherosclerotic lesions on cessation of cholesterol feeding in the chick. *J. Lab. Clin. Med.* 34: 1427-1472.
- KESTELOOT H., SANS S., KROMHOUT D. 2002. Evolution of all causes and cardiovascular mortality in the age-group 75-84 years in Europe during the period 1970-1996. *Eur Heart J* 23: 384-98.
- MARTÍN CASTILLO A., CASTELLS M.T., ADÁNEZ G., SÁNCHEZ-POLO M.T., GARCÍA PÉREZ B., AYALA I. 2010. Effect of atorvastatin and diet on non-alcoholic fatty liver disease activity score in hyperlipidemic chickens *Biomed. Pharmacother.* 64: 275-281.
- ORTEGA J.V., AYALA I., GARCÍA PÉREZ B., SÁNCHEZ POLO M.T., CASTELLS M.T. 2004. Uso de estatinas en biomodelos experimentales de arteriosclerosis. *An. Vet. (Murcia)* 20: 49-57.
- ORTEGA J.V., GARCÍA PÉREZ B., FERNÁNDEZ PARDO J., CASTELLS M.T., ESCOBAR S., VALDÉS M. 2002. Efecto antiaterogénico de la atorvastatina en pollos alimentados con una dieta rica en colesterol. *Clin Invest Arterioscl* 14: 225-229.
- STARY H.C., CHANDLER A.B., DINSMORE R.E., FUSTER V., GLAGOV S., INSULL W. JR, ROSENFELD M.E., SCHWARTZ C.J., WAGNER W.D., WISSLER R.W. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological

- classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special Report. *Circulation* 92: 1355-1374.
- STARY H.C., CHANDLER A.B., GLAGOV S. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89:2462-2478.
- STARY H.C. 2000. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1177-1178.
- WILLIAMS K.J., FEIG J.E., FISHER E.A. 2008. Rapid regression of atherosclerosis: insights from the clinical and experimental literature. *Nature Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5: 91-102.
- WILSON R.B., MILLER R.A., MIDDLETON C.C., DINDEN D. 1982. Atherosclerosis in rabbits fed a low cholesterol diet for five years. *Arteriosclerosis* 2: 228-241.
- WONG H.Y. 1975. The cockerel as an animal model for atherosclerosis research. *Adv. Exp. Med. Biol.* 163: 381-391.