

Comparación de citología mediante aspirado de aguja fina e histología en el diagnóstico de lipidosis hepática en bovinos de matadero.

Carolina Ríos P. MV, MSc¹, Michael M Fry, MV, MSc², Carolyn N Grimes MV², Linden E Craig, MV PhD², Pedro Melendez R, MV, MSc, PhD¹

¹Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Santiago, Chile;

²Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Tennessee, Knoxville, EEUU.

Email: crios@santotomas.cl

Resumen

El objetivo de este estudio fue comparar resultados de citología e histología en la detección de acúmulo de lípido hepatocelular en bovinos. La lipidosis hepática en ganado lechero es una enfermedad de gran importancia clínica y económica. La citología de aspirado de aguja fina (AAF) ha sido descrita como una técnica capaz de identificar lipidosis hepática en bovinos, sin embargo se carece de estudios que evalúen la exactitud del método. Este estudio corresponde a un primer paso para probar nuestra hipótesis de que la citología de AAF es un método de una exactitud razonable, económico y practicable para diagnosticar lipidosis hepática en bovinos. Se obtuvo 73 muestras a partir de hígados de matadero inmediatamente post mortem. Utilizando una escala de 1 a 4 se determinó la severidad de la lesión tanto para el porcentaje de células afectadas como para el promedio de citoplasma afectado. Se utilizaron muestras pareadas que representaron un espectro de las lesiones. La correlación entre el grado de afección de hepatocitos y citoplasma entre citología e histología fue altamente significativa.

El puntaje dado para porcentaje de hepatocitos afectados fue diferente en ≤ 1 punto entre citología e histología en el 73% de los casos. Para el caso de porcentaje de citoplasma afectado esta diferencia de ≤ 1 punto entre ambas técnicas se presentó en el 95% de los casos. La prueba de concordancia de Kappa entre citología e histología fue adecuada. Estos hallazgos sugieren que la citología de aspirado de aguja fina puede ser un método aceptable para diagnosticar hígado graso en ganado bovino. Se requieren más estudios en animales vivos con sospecha clínica de lipidosis hepática.

Palabras clave: bovino, citología, lipidosis hepática, hígado.

1. Introducción

La lipidosis hepática, también conocida como hígado graso, es una condición en la cual existe un acúmulo de triglicéridos en los hepatocitos. En bovinos, esta condición se desarrolla en forma secundaria a un balance energético negativo, lo que ocurre más comúnmente en bovinos lecheros durante el periodo post parto temprano, a inicios de la lactancia. Esta situación es consecuencia de ocurre de una movilización de las reservas grasas que conlleva a un aumento de ácidos grasos no esterificados sanguíneos que son transportados a hígado, quien que no es capaz de exportar los triglicéridos en forma de lipoproteínas en la misma proporción (Bobe y col., 2004; Herdt, 1988).

Cuando esta movilización grasa es severa, el exceso de lípido acumulado se asocia con el síndrome de hígado graso, que pueden llevar a incluso la muerte del animal (Herdt, 1988). Existen anormalidades clínicas que se pueden encontrar asociadas a este cuadro, como mastitis, metritis, desplazamiento del abomaso, cetosis y baja en la producción, lo que conlleva a una baja en la productividad del rebaño con la consecuente pérdida económica. En una revisión realizada por Bobe y col. (2004), se estimó que las pérdidas económicas relacionadas con este síndrome en Estados Unidos podrían ascender a US\$60 millones al año.

En la actualidad no existe una prueba diagnóstica en cuanto a bioquímica clínica que sea precisa y confiable para el diagnóstico de este síndrome

(Cebra y col., 1997; Herdt, 1988; Kalaitzakis y col., 2007). El contenido de lípidos en hígado puede ser determinado mediante métodos bioquímicos, mediante histopatología o por flotación de trozos de biopsia en una solución de sulfato de cobre (Bobe y col., 2004, Gaal y col., 1983, Herdt, 1988). Adicionalmente, literatura de hace varios años describe el uso de citología de aspirado de aguja fina (AAF) para el diagnóstico de hígado graso en bovinos (Frerking y col., 1991; Hoff y Cote, 1996; Holtenius, 1961, 1963; Holtenius y col., 1962). A pesar de lo anterior, no se han encontrado estudios que evalúen la exactitud de la citología comparada con la histopatología u otras pruebas.

En la práctica clínica, el diagnóstico de hígado graso es principalmente presuntivo, raramente se obtiene muestras para evaluación histológica puesto que la obtención de ellas no está exenta de riesgos para el animal, sumado al tiempo que implica la obtención de resultados. La citología de AAF es técnicamente factible de realizar en la práctica clínica, menos invasiva que la obtención de una biopsia para histopatología, de bajo costo y de interpretación rápida. El objetivo de este estudio es comparar los resultados de la citología de AAF versus histopatología para determinar el contenido de lípidos hepatocelulares en bovinos. Lo anterior a modo de evaluar en forma preliminar una prueba diagnóstica que permita su eventual utilización futura a nivel de campo y forme parte del conjunto de pruebas diagnósticas disponibles para la práctica clínica.

2. Materiales y métodos

Se trabajó con 76 muestras de hígado de bovinos obtenidos en matadero en la ciudad de Santiago de Chile. No se contó con antecedentes de edad, sexo, ni clínicos de los animales. En términos macroscópicos, se seleccionaron hígados libres de neoplasias, parásitos y abscesos, desde sin alteraciones en su color, textura y morfología hasta con distintos niveles de infiltración grasa (color blanquecino-amarillento, brillante, bordes redondeados) (Reid y Roberts, 1982). Las muestras fueron obtenidas en un plazo no superior a los 10 minutos de la insensibilización del animal. Se obtuvo una muestra del mismo sitio del hígado tanto para citología como para biopsia. Para la obtención de biopsia se utilizó una aguja de biopsia de 16 g x 15 cm (Jorgenson Laboratories, Loveland, CO, EEUU) y el

trozo obtenido fue conservado en una solución de formalina al 10%. Posterior a la fijación, las muestras fueron procesadas mediante técnicas estándares para la obtención de bloques de parafina. Las muestras para citología fueron obtenidas mediante una aguja espinal de 20g, depositadas en un portaobjetos y secadas al aire. Éstas fueron teñidas mediante tinción rápida (Hemacolor, Merck Chemicals, Darmstadt, Alemania) durante las primeras 2 a 4 horas de obtenidas. Los bloques de parafina y muestras citológicas fueron transportados a la Universidad de Tennessee (EEUU) en donde se finalizó el procesamiento de las preparaciones histológicas (corte y tinción con hematoxilina-eosina) y se analizaron microscópicamente ambas preparaciones.

Los evaluadores asignaron una puntuación tanto para el porcentaje de hepatocitos afectados como para el porcentaje de citoplasma afectado. Para ello se utilizó una escala de 0 a 4 puntos: puntuación de "0" indicando no afectado, "1" para 0,5 a 25% afectado, "2" para 26 a 50% afectado, "3" para 51 a 75% afectado y "4" para 76- 100% afectado. Ambas preparaciones (histología y citología) fueron evaluadas por un mismo evaluador apropiadamente entrenado y certificado en su especialidad (Dres. L. Craig y M. Fry, respectivamente). Para la evaluación, se contaron 200 hepatocitos (utilizando microscopía directa) y se estimó el porcentaje de citoplasma con presencia de vacuolas. El puntaje final se calculó basándose en el número de células afectadas ponderado por el porcentaje de citoplasma afectado. Las muestras fueron evaluadas en forma ciega, es decir, los evaluadores desconocían la evaluación del otro, además de no tener información acerca de la descripción macroscópica de la muestra. Los puntajes obtenidos en citología e histopatología fueron analizados mediante el coeficiente de Correlación de Pearson (r), prueba de Kappa (Kw) para concordancia, Chi cuadrado para normalidad y Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas (Medcalc Version 8.2.1.0, <http://medcalc.be>). La concordancia entre citología e histología fue considerada aceptable si el puntaje era idéntico en ambas o difería por 1 punto e inaceptable si difería por más de 1 punto.

3. Resultados y Discusión

Se evaluaron muestras pareadas (histología y citología) provenientes de 73 animales. Tres muestras fueron excluidas del análisis por baja calidad de las preparaciones. Los resultados de los puntajes obtenidos se presentan en los cuadros 1 y 2. Los puntajes obtenidos no se distribuyeron en forma normal ($P < 0.001$ para los 4 grupos de datos). La correlación entre los puntajes obtenidos mediante citología e histología fue significativa tanto para porcentaje de hepatocitos afectados ($P < 0.0001$, $r = 0.64$) como para porcentaje de citoplasma afectado ($P < 0.0001$, $r = 0.53$). La concordancia entre ambos métodos fue definida como adecuada (Kappa de 0,21-0,40) tanto para porcentaje de hepatocitos afectados ($Kw = 0.382$) como para el

porcentaje de citoplasma afectado ($Kw = 0.262$). La concordancia entre citología e histología para porcentaje de hepatocitos afectados fue considerada aceptable en el 73% de los casos (idéntica en 28/73 casos y con diferencia de 1 punto en 25/73 casos). Para el porcentaje de citoplasma afectado, la concordancia entre ambas técnicas fue de un 95% (idénticos en 34/73 de casos, diferencia de un punto 1 en 35/73 casos). Los puntajes obtenidos mediante citología fueron significativamente más altos que en histología para el porcentaje de hepatocitos afectados ($P < 0.0001$), no así para el porcentaje de citoplasma afectado, donde no se encontraron diferencias entre ambas técnicas ($P = 0.5030$).

Cuadro 1: Resumen de puntajecitológico (Cito) e histológico (Histo) para % de hepatocitos afectados.

	Cito = 0	Cito = 1	Cito= 2	Cito= 3	Cito= 4
Histo = 0	0	11	1	2	0
Histo = 1	0	9	6	5	8
Histo = 2	0	0	4	3	3
Histo = 3	0	0	1	3	4
Histo = 4	0	0	1	0	12

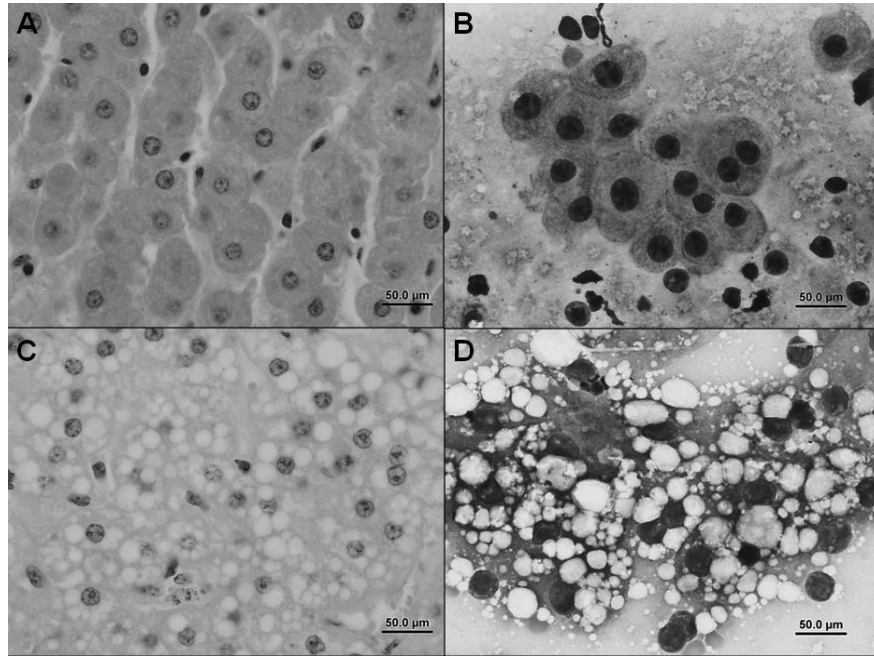
El valor en cada casilla indica número de casos. Los campos oscuros representan puntajes con concordancia aceptables (diferencia < 1 punto) y campos claros, baja concordancia. El puntaje refleja porcentaje de hepatocitos afectados: 0 = ninguno, 1 = 0.5-25%, 2 = 26-50%, 3 = 51-75%, 4 = 76-100%.

Cuadro 2: Resumen de puntajecitológico (Cito) e histológico (Histo) para % de citoplasma afectado.

	Cito = 0	Cito = 1	Cito = 2	Cito = 3	Cito = 4
Histo = 0	0	14	0	0	0
Histo = 1	0	30	5	0	0
Histo = 2	0	12	2	0	0
Histo = 3	0	1	4	0	0
Histo = 4	0	2	1	0	2

El valor en cada casilla indica número de casos. Los campos grises representan puntajes con concordancia aceptables (diferencia < 1 punto) y los en blanco, baja concordancia. El puntaje refleja porcentaje de citoplasma afectado: 0 = ninguno, 1 = 0.5-25%, 2 = 26-50%, 3 = 51-75%, 4 = 76-100%.

Figura 1: Microfotografías de histología y citología hepática. Microfotografías de histología (A,C) y citología hepática (B, D) representando muestras levemente afectadas (arriba) a severamente afectadas (abajo) en relación al acumulo de lípidos. Barra = 50 µm.



Las diferencias entre citología e histología pueden deberse a numerosos factores, entre ellos los biológicos, como variación focal de la severidad de la lesión (Mohamed y col., 2004) o a factores analíticos como la diferencia entre sensibilidad, especificidad o precisión entre ambos métodos. El hecho de que muchos casos obtuvieran un puntaje “0” en el análisis histológico, mientras que no se encontraran casos “0” en citología, sumado a que el puntaje obtenido en citología para el caso de porcentaje de hepatocitos afectados fuera mayor, sugiere que esta técnica podría constituir un método diagnóstico más sensible.

Este estudio por tratarse de un trabajo preliminar, tiene una serie de limitaciones como lo son un número relativamente reducido de muestras, la falta de antecedentes clínicos de los animales y la falta de un análisis cuantitativo para la determinación de lípidos. Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, los resultados indican que la citología de AAF es una técnica factible y de exactitud adecuada para ser utilizada en el diagnóstico de lipidosis hepática en el bovino. Estos resultados deben ser complementados a futuro con análisis cuantitativos de lípidos e “in vivo” con animales con sospecha clínica de hígado graso

4. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte por fondos del Office of Research, University of Tennessee College of Veterinary Medicine. Los autores agradecen al Dr. Oscar López (Universidad Santo Tomás) y Sharon Schlosshan (University of Tennessee) por su colaboración en el proyecto.

5. Referencia

1. Bobe G, J Young, D Beitz. 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 87 10:3105-3124.
2. Cebra C, F Garry, D Getzy, M Fettman. 1997. Hepatic lipidosis in anorectic, lactating holstein cattle: a retrospective study of serum biochemical abnormalities. *J Vet Intern Med* 11 4:231-237.
3. Frerking H, J Hecking, F Kaup, H Ernst. 1991. Which evidence permits a liver cell smear in

- cattle with metabolic disorder. *Tierarztl Prax* 19 6:624-629.
4. Gaal T, I Reid, R Collins, C Roberts, B Pike. 1983. Comparison of biochemical and histological methods of estimating fat content of liver of dairy cows. *Res Vet Sci* 34 2:245-248.
 5. Herdt T. 1988. Fatty liver in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 4 2:269-287.
 6. Hoff B, J Cote. 1996. Fine needle aspiration and liver cytology -- a simple method for diagnosis and prognosis of fatty liver in cattle. *The Bovine practitioner* 30:53-55.
 7. Holtenius P. 1961. Cytological puncture. A new method for the study of bovine hepatic disease. *Cornell Vet* 51:56-63.
 8. Holtenius P. 1963. On the occurrence of intranuclear PAS-positive material in liver cells of cattle. *Cornell Vet* 53:322-327.
 9. Holtenius P, O Knudsen, L. Ullberg. 1962. Cytological studies of the liver in cows with puerperal paresis. *Cornell Vet* 52(185-191):185-191.
 10. Kalaitzakis E, N Roubies, N Panousis, K Pourliotis, E Kaldrymidou, H Karatzias. 2007. Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. *J Vet Intern Med* 21 4:835-845.
 11. Mohamed T, S Oikawa, T Kurosawa, K Takehana, Y Hosaka, H Okada, M Koiwa, H Sato. 2004. Focal fatty liver in a heifer: utility of ultrasonography in diagnosis. *J Vet Med Sci* 66 3:341-344.
 12. Reid I, J Roberts. 1982. Fatty liver in dairy cows. *In Pract* 11:164-169.