

Estudios morfológicos en el corazón de ratas alimentadas con dieta rica en azúcares refinados (DRS) *

Costamagna, Alicia; Minella, Kyrian; Fuentes, Marta.
Con la colaboración técnica de Gallo José E.

Cátedra de Morfología Normal. FBCB. UNL. Paraje El Pozo. C.C. 530 - (3000) Santa Fe. República Argentina. TE: 54-42-571138.
FAX: 54-42-604688. E-Mail costamag@fbc.unl.edu.ar.

RESUMEN: Ratas Wistar normales alimentadas con dieta rica en sacarosa durante quince semanas desarrollan hipertrigliceridemia, hiperglucemia y normoinsulinemia. En el músculo cardíaco se incrementa el contenido de triglicéridos y sus intermediarios, favoreciendo la oxidación de ácidos grasos, perturbando el metabolismo global de los carbohidratos. Esta función bioquímica y metabólica cardíaca anormal podría acompañarse de alteraciones morfológicas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar hipertrofia cardíaca y evaluar un incremento del tejido conectivo, signos de degeneración miocítica y estado del sistema microvascular.

Los resultados obtenidos muestran una ligera proliferación fibrocítica que no se relaciona con un incremento de fibras reticulares ni colágenas, sugiriendo la existencia de una incipiente alteración tisular. Se obtuvo evidencia de activación angiogénica, expresada en un aumento de densidad numérica capilar. Pudo visualizarse asimismo un incremento de PAS positividad en membranas basales e íntima de los capilares coronarios. Ambos fenómenos podrían interpretarse como respuestas a posibles efectos de hipoxia en este modelo experimental.

SUMMARY: Normal Wistar rats fed a sucrose rich diet (SRD) developed hypertriglyceridemia, hyperglycemia and normoinsulinemia. There was an increase in the level of triglycerides and their intermediate compounds, fatty acid oxidation being thus favoured with a concomitant alteration of the whole carbohydrate metabolism. These metabolic and biochemical disturbances affecting cardiac function could occur along with morphological disturbances.

The aim of this work was to found out whether cardiac hypertrophy existed and to evaluate an increase in connective tissue, signes of muscle cell degeneration and the microvascular sistem state.

Our results show a slight fibrocytic proliferation, not related to an increase in either reticular or collagen fibers, which suggests incipient tissue alteration. An increase in capillary numerical density was taken as evidence of angiogenetic activation. The P.A.S. positivity of coronary capillary basal and intimate membranes was also shown to increase. In this experimental model, both phenomena could be interpreted as a response to possible effects of hypoxia.

Introducción

Un persistente incremento de triglicéridos plasmáticos (hipertrigliceridemia: Hiper-Tg) es considerado como un factor de riesgo adicional de enfermedades cardiovasculares. La hiper-Tg endógena puede ser inducida en el hombre y en animales de experimentación mediante una ingesta crónica de dietas ricas en carbohidratos simples. Se ha implicado al consumo iterativo de azúcar refinado (sacarosa) en el hombre, como uno de los factores que, a través de la hiper-Tg podría incrementar el riesgo de enfermedad coronaria (1,2).

Trabajos recientes (3) han demostrado que la administración a ratas machos normales de una

dieta rica en sacarosa (63% p/p) (DRS), origina hipertrigliceridemia e incremento de ácidos grasos libres, asociados a resistencia insulínica. Los cambios que ocurren varían desde una normoglucemia e hiperinsulinemia, a las 3 semanas de administración, hasta una hiperglucemia y normoinsulinemia luego de transcurridas 13 a 15 semanas de ingesta.

A nivel experimental la hiper-Tg incrementa el contenido de triglicéridos en músculo cardíaco, favoreciendo la oxidación de ácidos grasos y perturbando el metabolismo global de los carbohidratos.

En el músculo cardíaco, la acumulación de triglicéridos y sus intermediarios se relaciona estrechamente con una bifurcación del combustible energético. Randle y col. (4) postularon que una excesiva oxidación de ácidos grasos de cadena larga, ya sea por hidrólisis de los triglicéridos endógenos o por captación de los mismos a través del plasma, serían los responsables de la disminuida oxidación de la glucosa en el corazón de animales diabéticos.

* Este trabajo fue realizado en el marco de un Proyecto de investigación CAI + D 94-95. Nº 12/B011. UNL El modelo experimental utilizado fue desarrollado por el grupo de Química Biológica del Departamento de Ciencias Biológicas de la FBCB UNL (Dra. Y. B. Lombardo).

La función bioquímica y metabólica cardíaca anormal podría reflejarse en diferentes grados de alteraciones morfológicas macro y/o microscópicas. Sin embargo los mecanismos íntimos involucrados en este síndrome - en particular a nivel del músculo cardíaco - no han sido bien dilucidados, ni su real alcance cuando la ingesta rica en sacarosa es consumida por períodos prolongados.

En el presente trabajo nos propusimos, en primer lugar, determinar en forma macroscópica la posible existencia de hipertrofia ventricular izquierda, como expresión de una patología cardíaca ya desarrollada.

En una segunda etapa el propósito fue determinar, mediante estudios microscópicos, distintas expresiones posibles de diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad, a saber: a) incremento de tejido conectivo con y sin colagenogénesis y/o reticulogénesis, b) signos de degeneración miocítica y c) estado del sistema microvascular, en cuanto a su actividad angiogénica y al incremento de la PAS positividad de las membranas basales.

Materiales y Métodos

Animales y dietas

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de aproximadamente 180-200 gramos de peso inicial, las cuales fueron divididas al azar en dos grupos: experimental y control.

El grupo experimental recibió una dieta semisintética rica en sacarosa (DRS) conteniendo por peso (g/100g): sacarosa 63%, caseína libre de vitaminas 17%, aceite de maíz 5%, celulosa 10%, mezcla de sales (AIN-76A) 1%, clorhidrato de colina 0.2%, y metionina 0.3%. El grupo control (DC) recibió la misma dieta semisintética que el grupo DRS con la excepción que la fuente de hidratos de carbono, sacarosa, fue reemplazada por almidón de maíz. Ambas dietas proveen aproximadamente 15,28 Kjoule/g de comida. Los animales fueron alimentados "ad libitum" durante 15 semanas, realizándose el control de peso durante todo el período.

Detalles de la metodología usada fueron descritos previamente (5).

Estudio macroscópico

Ambos grupos con un número de 12 ratas cada uno fueron mantenidos en dichas condiciones

durante 15 semanas, al término de las cuales fueron sacrificados.

Los corazones fueron removidos, lavados con agua corriente y pesados, previo secado con papel absorbente, y fijados durante 24 hs. en formol tamponado.

Luego fueron seccionados mediante un corte longitudinal, según el plano de simetría que atraviesa a la aurícula y al ventrículo izquierdo (VI) hasta el ápice, poniendo en evidencia la cavidad del VI, su pared libre, el septo interventricular y el ápice, como muestra la copia fotográfica (Figura 1).

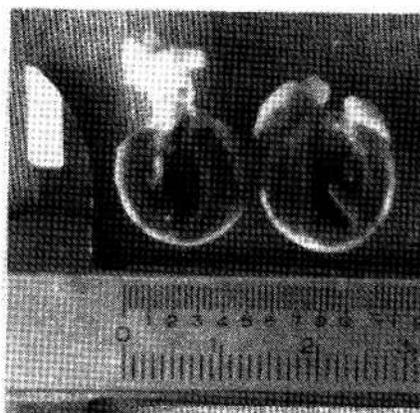


Figura 1. Sección longitudinal de corazón para medición de grosor de septo, ápice y pared libre del ventrículo izquierdo, y longitud mayor y menor de la cavidad del mismo.

Se realizaron mediciones utilizando un vernier, con la ayuda de una lupa de aumento 8X. Para las determinaciones de grosor de pared libre del VI, septo y ápice se usaron las reglas del instrumento. Para determinar la cavidad del VI se midieron, con las partes curvas del vernier, la longitud mayor (ápico-basilar) y menor o transversal (a nivel de la inserción del músculo papilar posterior), asumiéndose a esta cavidad como un elipsoide que presenta simetría respecto de sus ejes.

Utilizando las fórmulas del elipsoide descritas por Troy et. al. (1972) y adaptadas por Jenkins y Medeiros (1993), se obtuvieron datos del volumen de la cavidad ventricular y de la masa del mismo (6,7).

Estudio microscópico

Trozos de 2 mm. de espesor de septo y pared del ventrículo izquierdo de los corazones removidos a ratas de ambos lotes fueron fijados en formol bufferado al 10%. Luego de procesarlos mediante la técnica de inclusión en parafina, cortes longitudinales y coronarios de 7 micras fueron obtenidos para posterior coloración según técnicas de Hematoxilina y Eosina (HE), Tricrómico de Gomori, Picrosirius Red, Ácido Periódico - Schiff (PAS) e Impregnación Argéntica de Wilder.

Análisis cualitativo:

Cortes coloreados con HE y Tricrómico de Gomori fueron analizados por tres observadores que resolvieron mediante consenso las apreciaciones cualitativas con respecto a la presencia o ausencia de fibrosis focal, de acumulación de colágeno intersticial, subendocárdico y/o perivascular, así como a la presencia o ausencia de edema intersticial.

De igual manera se visualizaron posibles signos de necrosis como: presencia o no de adipocitos, células inflamatorias y macrófagos en el tejido conectivo, así como pérdida o alteraciones de los núcleos y de las estriaciones transversales de los miocitos.

Cortes teñidos con Picrosirius Red fueron observados con microscopía de polarización para analizar cualitativamente la proporción de colágeno Tipo I y Tipo III, así como el alineamiento estructural de las fibras que pudiera verse alterado en procesos de reconstitución y remodelación (8, 9).

Información complementaria acerca de la proporción y disposición de ambas variantes de las fibras colágenas fue alcanzada mediante el análisis de cortes teñidos con coloración argéntica.

Con la coloración de PAS se pretendió evaluar la acumulación de glicoproteínas en el intersticio, ya sea en forma focal o difusa, así como en la lámina basal de los capilares de la arteria coronaria. (10, 11)

Análisis morfométrico:

Utilizando ocular con cuadrícula se semicuantificó el colágeno intersticial, contando los puntos de intersección de perpendiculares coincidentes con colágeno, en 80 campos de 100X, considerando el 50% de cortes longitudinales y 50% de cortes transversales de las fibras, en zonas equivalentes

determinadas al azar de septo y pared, tanto de corazones del lote DRS como del lote DC.

Con el mismo ocular se determinó la densidad de núcleos de miocitos frente a núcleos de los fibroblastos contenidos en la cuadrícula, seleccionando el mismo número de campos microscópicos, y con idéntico criterio.

El diámetro de los miocitos y de sus núcleos se calculó en base a su observación con ocular reglado, siguiendo el mismo criterio de selección de campos.

Asimismo se determinó la densidad numérica capilar contando en 10 campos microscópicos con 100X frente a cortes longitudinales y otros 10 campos frente a cortes transversales, a nivel de septo y de pared ventricular.

Los resultados fueron expresados como $\bar{X} \pm DS$.

Resultados

Estudio macroscópico

El análisis comparativo de la masa y volumen ventricular determinados en los corazones de ambos lotes de ratas no expresó diferencias que pudieran interpretarse como hipertrofia concéntrica o excéntrica, al menos desde el punto de vista macroscópico.

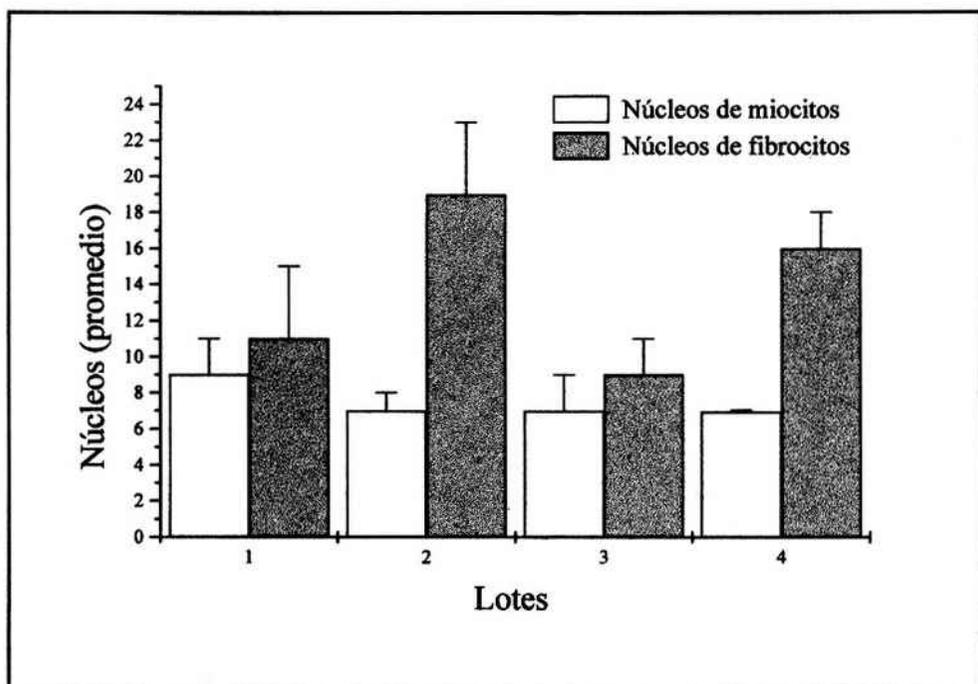
Estudio microscópico

El análisis cualitativo expresa una histoarquitectura conservada, sin focos de fibrosis de sustitución, en los corazones de ratas tratadas con dieta experimental.

La acumulación de colágeno intersticial dispuesto entre las células musculares, así como el incremento del mismo en distribución subendocárdica y perivascular no es significativa en las ratas correspondientes al lote DRS con respecto al lote control.

No se visualizan áreas considerables de edema intersticial entre las hileras de fibras musculares, ni es significativa la presencia de acúmulos de adipocitos en el lote experimental con respecto al lote control.

En muestras de ratas tratadas con DRS se observa una ligera proliferación fibrocítica, lo cual es corroborado cuantitativamente, como se deduce de la Gráfica 1, en la que se expresa número de núcleos de miocitos frente a número de núcleos de fibrocitos.

Gráfico 1. Relación entre núcleos de miocitos y fibrocitos por unidad de superficie

La gráfica representa el promedio de núcleos contados en 20 campos por rata en: 1 y 3 Lote DC., 2 y 4 Lote DRS. Las barras de los lotes 1 y 2 corresponden a la pared de ventrículo izquierdo y las 3 y 4 al septo interventricular.

Este signo de génesis del tejido fibroso no se relaciona con un incremento de fibras reticulares, ya que el análisis de la impregnación argéntica denota una malla de reticulina normotrófica en las ratas tratadas. No obstante podría considerárselo como una alteración incipiente del colágeno.

La observación comparativa al microscopio de luz polarizada de cortes de corazones de ambos lotes de ratas, coloreados con Rojo Sirio - ácido pícrico, confirma la conservación de la estructura del esqueleto fibroso con predominancia de colágeno Tipo I, apreciándose las fibrillas de colágeno Tipo III rodeando los capilares, en concentración normal.

Con respecto al parénquima, el hallazgo de algunos miocitos con ligeros cambios nucleares se compatibiliza con la aparición de incipientes signos de hipoxia. Núcleos con tamaño ligeramente aumentado, hiperchromasia y pleomorfismo fueron ob-

servados en miocitos aislados. Las diferencias de tamaño nuclear en ambos lotes son escasamente significativas, al igual que el incremento del diámetro de los miocitos del lote DRS, como pudo demostrarse con la determinación cuantitativa de ambos parámetros.

Cualitativamente no se observan en la fibra muscular depósitos amarillos de lipofucsina, ni alteraciones visibles a la microscopía óptica de sus estriaciones transversales, que denoten un mayor grado de perturbación de la capacidad funcional en las ratas tratadas.

Por otra parte el análisis morfométrico comparativo de los capilares coronarios en cortes pertenecientes al lote experimental y al lote control, muestra un apreciable incremento en el número de capilares por área en las ratas alimentadas con DRS (Tabla 1), (Microfotografía 1). Pág. 169.

Tabla 1. Densidad numérica capilar por unidad de superficie

Tejidos \ N° de rata	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
Pared V.I. (DRS)	4.5	4.8	3.9	4.3	5.6	4.6
Pared V.I. (DC)	2.7	2.7	3.2	1.9	1.2	1.6
Septo (DRS)	4.1	5.2	5	5.2	4.1	4.4
Septo (DC)	1.9	1	1	1.5	1.1	1.7

Los valores están expresados como la media individual de 6 animales de cada lote, correspondientes a 10 campos microscópicos contados.

Asimismo, la observación de cortes coloreados con PAS, permite visualizar un incremento de positividad a esta coloración en las membranas basales y en la matriz de la íntima de los capilares intramurales en las ratas alimentadas con sacarosa. (Microfotografía 2). Pág. 170.

No es evidente, en cambio, una proliferación endotelial en estos capilares, que mantienen la morfología de su epitelio.

Discusión y conclusiones

Los hallazgos anatómicos no aportan elementos de substanciación de la hipótesis de hipertrofia macroscópica en este modelo, con una ingesta de 15 semanas de duración.

Trabajos reportados sobre ratas alimentadas con dietas deficientes de cobre sumada a la incorporación de diferentes tipos de grasas - aceite de maíz, aceite de coco y colesterol - durante 6 semanas demuestran hipertrofia cardíaca (12).

Asimismo, fueron reportados casos de alteraciones morfológicas evidentes, con lipodosis cardíaca y el subsecuente desarrollo de lesiones necróticas y fibrosis, en corazones de ratas luego de una alimentación a largo plazo (períodos de hasta 12 meses) con diferentes tipos de dietas suplementadas con aceites de girasol, grasas saturadas y aceite de pescado (13).

En el modelo utilizado, la evidencia de hipertrofia cardíaca se relacionaría con un período más prolongado de administración de la dieta DRS, donde podrían acentuarse incipientes signos de deficiente oxigenación y manifestarse, consecuentemente, expresiones macroscópicas de tejido fibroso de reemplazo.

La demostración de hiperplasia fibroblástica aporta una evidencia de estimulación de la actividad tisular, que posiblemente pueda complementarse con la presencia de un incremento de colágeno, en ratas tratadas con DRS durante un período de mayor duración. Podría también expresar una estimulación en la síntesis de alguno de los glucosaminoglucanos constituyentes de la matriz. Medeiros et. al. demostraron mayor dispersión de las fibras colágenas inmersas a su vez la presencia fundamental amorfa del tejido conectivo, en las válvulas tricúspides de ratas tratadas con dieta deficiente de cobre (11).

La proliferación fibroblástica podría asimismo corresponderse con un incremento en la síntesis de algunos componentes de las paredes de los pequeños vasos sanguíneos. Esta última posibilidad podría explicar a su vez la presencia de PAS positividad incrementada en membranas basales y/o íntima de los capilares, que fuera observada en el lote de ratas DRS, sin que se asociara a una proliferación de células endoteliales.

Recientes estudios en pacientes con miocardiopatía diabética demuestran la presencia de depósitos de glicógenos ácidos en el subendotelio de los capilares coronarios intramurales, acompañados de hiperplasia de las células endoteliales.

Quizá el hallazgo más interesante consista en la evidencia de proliferación angiogénica en este modelo de ratas.

El desarrollo de circulación colateral fue observado, en forma moderada, en algunos trabajos con ratas sometidas a preconditionamiento (14), con episodios breves de isquemia, que aumentan la tolerancia del miocardio frente a un episodio isquémico posterior más prolongado (15).

Una hipótesis válida podría consistir en interpretar este fenómeno en el modelo estudiado, como

una expresión de respuesta a incipientes efectos de hipoxia.

Diferentes alteraciones morfológicas podrían ser compatibles con este modelo de rata alimentada con DRS, que comparte en algunos aspectos bioquímicos y metabólicos las anomalías observadas en pacientes con dislipidemias e intolerancia a la glucosa y/o diabetes Mellitus Tipo II no insulino dependiente que, asociadas a otros factores de riesgo como: hipertensión, niveles elevados de colesterol plasmático, obesidad, sedentarismo, desencadenan enfermedades cardiovasculares.

En el paciente con diabetes Tipo II de relativamente corta duración, anomalías sugestivas de cardiomiopatías aparecen como más prominentes que en pacientes con diabetes Tipo I con una larga duración de su enfermedad. En algunas ocasiones, sin embargo, no es posible visualizar lesiones características en pacientes con diabetes no insulino dependientes (16, 17).

Las alteraciones observadas en este modelo podrían representar signos incipientes de patologías comparables a las del humano, cuyas características histopatológicas han sido descritas en estadios avanzados de la enfermedad.

Agradecimientos:

A la Dra. Adriana Albertengo, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital J.B. Iturraspe, por aportar su opinión especializada sobre aspectos histopatológicos cualitativos.

Bibliografía

- Mancini, M.; Matlock, M.; Rabaya, E.; Chait, A.; Lewis, B. (1973). Studies of the mechanism of carbohydrates induced lipemia in normal man. *Atherosclerosis*. **17**: 445-454.
- Reaven, G.M.; Riser, T.R.; Chen, Y.D.I.; Reaven, E.P. (1979). Characterization of a model of dietary induced hypertriglyceridemia in young non obese rats. *J. Lipid Res.* **20**: 371-378.
- Gutman, R.; Basilio, M.L.; Bernal, C.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. (1987). Long term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism*. **36**: 1013-1020.
- Randle, P.J.; 1986. Fuel selection in animals. *Biochem. Soc. Trans.* **14**: 799-806.
- Lombardo, Y.B.; Chicco, A.; DAlessandro, M. E.; Martinelli, M.; Soria, A.; Gutman, R. (1996). Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochem. Biophys. Acta.* **1299**: 175-182.
- Troy, B.L.; Pombo, J.; Rackley, C. E. (1972). Measurement of left ventricular wall thickness and mass by echocardiography. *Circulation*. **45**: 602-611.
- Jenkins, J.E.; Medeiros, D. (1993). Diets containing. Corn oil, coconut oil and cholesterol alter ventricular hypertrophy, dilatation and function in hearts of rats fed copper - deficient diets. *J. Nutr.* **123**: 1050-1060.
- Jailil, J.; Doering, C.; Janicki, J.; Pick, R.; Shroff, S.; Weber, K. (1989). Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circulation Research*. **64**: 1041-1050.
- Doering, C. Jailil, J.; Janicki, J.; Pick, R.; Aghili, S.; Abrahams, C.; Weber, K. (1988). Collagen network remodelling and distolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovascular Research*. **22**: 686-695.
- Regan, T. J.; Lyons, M.M.; Amhed, S.; Levinson, G.; Oldewurtel, H.; Amhad, M.; Haider, B. (1977). Evidence of cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *The J. of Clinical Inv.* **60**: 855-899.
- Medeiros, D.M.; Bagby, D.; Ovecka, G.; Mc Cormick, R. (1991). Myofibrillar, mitochondrial and valvular morfolological alterations in cardiac hypertrophy among copper-deficient rats. *J. Nutr.* **121**: 815-824.
- Medeiros, D. M.; Liao, Z.; Hamlin, R.L. (1991). Copper deficiency in a genetically hypertensive cardiomyopathic. Rat: electrocardiogram, functional and ultrastructural aspects. *J. Nutr.* **121**: 1026-1034.
- Charnock, J.S.; Turner, J.; McIntosh, G. H. (1986). The occurrence fo cardiac lipidosis and necrotic lesions in the hearts of rats following long-term feeding of different lipid supplemented diets. *J.Nutr.Sci., Vitaminol.* **33**: 75-87.
- Murry, C.E.; Jennings, R.B.; Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. **74**: 11224-11236
- Irazola, V. E.; Lerman, J. (1994). Precondicionamiento miocárdico. ¿La isquemia protege al músculo cardiaco?. *Medicine* **20**: 85-96.
- Robillon, J.F.; Sadoul, J.L.; Jullien, D.; Morand, P.; Freychet, P. (1994). Abnormalities suggestive of cardiomyopathy in patients whith type II diabetes of relatively short duration. *Diab. Metab.* **20**: 5. 473-480.
- García Aguilar, J.; Lerman, J.; Aranda Frausto, A.; Posadas Romero, C. (1993). Ausencia de lesiones características en la microcirculación de pacientes diabéticos no insulino dependientes. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* **63**: 3. 209-221