

Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana
Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

Características morfométricas de la aorta de conejos sometidos a ingestión de etanol y dieta hipercolesterolémica desde la adolescencia

Dra. Aleida Herrera Batista, Dra. Isis Lebrede Álvarez, Dr. Leonel Falcón Vilaú y Lic. Jorge Bacallao Gallestey

RESUMEN

Se determinaron los efectos del etanol sobre las variables morfométricas macroscópicas y microscópicas en las aortas de conejos que ingieren dieta hipercolesterolémica durante la adolescencia, para evaluar el posible efecto protector del etanol en relación con la aterosclerosis. Se utilizaron 22 conejos machos de 100 d de nacidos y se conformaron 4 grupos de animales tratados con etanol, dieta hipercolesterolémica, etanol y dieta hipercolesterolémica, y un grupo control. El experimento se extendió por 16 semanas. Se evaluaron las variables morfométricas: superficies relativas ocupadas por estrías adiposas, grosor de la íntima, así como el número de células espumosas. Los animales tratados con dieta hipercolesterolémica alcanzaron valores superiores a los no tratados con esta dieta, lo que evidencia mayores alteraciones en la íntima de la aorta. La ingestión de dosis moderadas de etanol no impidió el desarrollo de lesiones aórticas. Estos resultados revelan que el etanol no posee un efecto protector eficiente, al menos a las dosis y condiciones utilizadas.

Palabras clave: Adolescencia, alcoholismo, aorta, aterosclerosis, dieta hipercolesterolémica, morfometría.

El alcoholismo constituye la toxicomanía de mayor trascendencia universal hoy día y figura entre las principales amenazas para la salud, el bienestar y la vida.¹

En Cuba se ha producido, en los últimos 15 años, un incremento del consumo de bebidas alcohólicas.² Se ha planteado un aumento progresivo de bebedores entre los jóvenes y se ha señalado un incremento en la cantidad de bebedores de riesgo en el grupo de edades entre 15 a 19 años.²⁻⁴ Lo antes expuesto pone de manifiesto que a partir de la adolescencia aumenta el consumo de bebidas alcohólicas, lo cual es en extremo preocupante.²

Durante la adolescencia se producen cambios drásticos en el organismo por causa de las variaciones que ocurren en el sistema nervioso y endocrino. Como consecuencia de estos cambios, se producen transiciones significativas en el desarrollo cognitivo, psicológico y social del individuo.⁵ Todo esto hace que la adolescencia reúna características propias que la diferencian de otras etapas de la vida.

La aterosclerosis y sus principales consecuencias orgánicas se consideran la primera causa de muerte en todos aquellos países en los que las infecciones no ocupan este lugar preponderante.⁶⁻⁹ En investigaciones realizadas se ha planteado que los factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica están también presentes en los niños y adolescentes.¹⁰

La relación entre el consumo de alcohol y la aterosclerosis es un tema controversial entre diversos investigadores. Para muchos el consumo diario de alcohol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad coronaria,¹¹⁻¹³ para otros, el etanol tiene un efecto beneficioso y protector contra esta enfermedad.¹⁴

En el presente trabajo se pretende determinar los efectos del etanol sobre variables morfométricas macroscópicas y microscópicas en las aortas de conejos que ingieren dieta hipercolesterolémica durante la adolescencia.

MÉTODOS

Se emplearon 20 conejos raza Nueva Zelandia, machos, de 100 d de vida. Se conformaron 4 grupos de idéntico tamaño: Grupo A: tratado con etanol. Grupo B: tratado con dieta hipercolesterolémica. Grupo C: tratado con etanol y dieta. Grupo D: Control. La asignación de los animales a cada uno de los grupos se realizó utilizando una tabla de números aleatorios.

Para el tratamiento con etanol se utilizó este diluido a 40 % en agua, a razón de 3 g por kilogramo de peso corporal en una sola dosis diaria por un período de 16 semanas. La vía de administración fue la vía oral, *ad-libitum*. Para conocer la cantidad diaria de agua a suministrar se midió la cantidad de este líquido ingerida diariamente por los animales y se halló una media de esas cantidades. Se suministró esta cantidad de agua para garantizar que consumieran la dosis total de etanol/día prevista. Los conejos se pesaron todas las semanas y con los valores obtenidos se calculó la cantidad de etanol a suministrar cada día de la semana.

A los animales de los grupos C y B se les suministró pienso experimental código CME 1403, elaborado en la fábrica de pienso del centro para la producción de animales de laboratorios (CENPALAB). El pienso experimental contenía colesterol industrial a 1,5 %.

A los conejos de los grupos A y D se les suministró pienso habitual para conejos y agua *ad libitum*. Todos los conejos permanecieron en jaulas individuales y en iguales condiciones ambientales e higiénicas.

Al concluir la experiencia los conejos fueron sometidos a eutanasia. Luego se extrajo la aorta de cada animal, desde el arco aórtico hasta la bifurcación. Se realizó un corte longitudinal entre ambas hileras de agujeros intercostales y se colocaron en formol neutro 10 % y se colorearon con la técnica de Sudán IV para la visualización macroscópica de las lesiones de la íntima.

Después se trazaron los contornos de cada arteria y sus respectivas lesiones en un acetato transparente. Sobre este se realizaron las mediciones correspondientes a cada arteria. Se utilizó el sistema aterométrico cubano. Mediante este sistema se pudo

calcular la superficie relativa ocupada por la estría adiposa (X) mediante la fórmula: $X = x/S$. Donde (x) es la superficie ocupada por estría adiposa y (S) es la superficie endarterial total.

Para estudiar las variables morfológicas microscópicas se utilizó el sistema cubano para morfometría de imágenes MADIP del Instituto de Cibernética Matemática y Física (ICIMAF). Se analizaron las variables morfológicas siguientes: grosor intimal y número de células espumosas.

Grosor intimal: se consideró desde la superficie arterial (endotelio) hasta la lámina elástica interna (LEI). Para realizar la medición de manera precisa se emplearon las láminas teñidas con orceína donde se distinguen con claridad las membranas elásticas. Las imágenes se obtuvieron a pequeño aumento (10x). Se realizaron 3 mediciones en cada lámina; una cercana a cada extremo de la estría adiposa y una en el centro. Las mediciones de los extremos se realizaron siempre a la misma distancia de donde se iniciaba la estría adiposa. Luego las 3 mediciones de cada arteria fueron promediadas para obtener el valor medio del grosor intimal.

Número de células espumosas: Se utilizaron las láminas teñidas con hematoxilina y eosina. Se tomaron las zonas del subendotelio donde se observaran mayor cantidad de células espumosas. Se contaron todas las células con citoplasma de aspecto vacuolado y con núcleos bien visibles. El conteo se realizó siempre en la misma unidad de área.

Análisis de los datos: se utilizó ANOVA de 2 vías tomando las variables de estrés oxidativo como variables dependientes, y como variables independientes el alcohol y la dieta (como efectos principales) y su interacción.

RESULTADOS

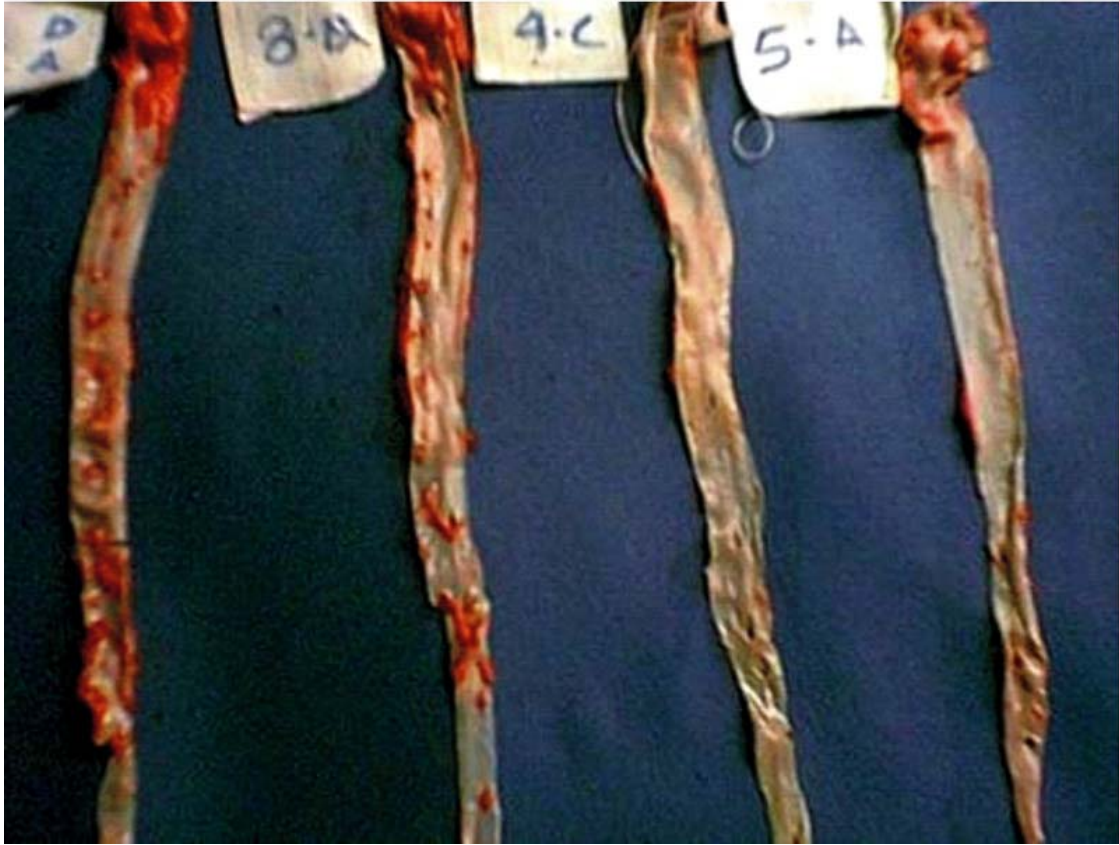
Los resultados de la morfometría macroscópica revelaron que la superficie relativa ocupada por estrías adiposas fue superior en los conejos que ingirieron dieta hipercolesterolémica (tabla 1). Aunque la diferencia no fue significativa, se acercó al umbral de significación ($p = 0,073$). La superficie relativa ocupada por estría adiposa no mostró diferencias significativas entre los animales que ingirieron dieta y los que ingirieron dieta y etanol (fig.).

Tabla 1. Superficie relativa ocupada por estrías adiposas

Variable	Control	Alcohol	Dieta	Alcohol y dieta
Superficie relativa ocupada por estría grasa	X= 0,010	X= 0,063	X= 0,199	X= 0,200
	DE= 0,014	DE= 0,082	DE= 0,141	DE= 0,194
	n= 4	n= 4	n= 4	n= 6

X: media, DE: desviación estándar, n: número.

Efectos	F	p
Dieta	4,123	0,073
Alcohol	0,019	0,893
Interacción dieta*alcohol	0,998	0,344



DA: grupo dieta y alcohol, D: grupo dieta, C: control, A: grupo alcohol.

Fig. Aortas. Coloración macroscópica de Sudán IV.

Los resultados obtenidos en la morfometría microscópica revelaron que los valores medios de grosor intimal no mostraron diferencias significativas entre alcohólicos y controles. Los animales tratados con dieta hipercolesterolémica mostraron valores muy superiores a los observados en alcohólicos y controles, con una diferencia significativa de $p < 0,05$. No se comprobó interacción dieta-alcohol (tabla 2).

Tabla 2. Valores de grosor intimal

Variable	Control	Alcohol	Dieta	Alcohol y dieta
Grosor intimal	X= 0,0	X= 11,675	X= 159,630	X= 210,105
	DE= 0,0	DE= 16,511	DE= 85,568	DE= 144,446
	n= 4	n= 4	n= 4	n= 6

X: media, DE: desviación estándar, n: número.

Efectos	F	p
Dieta	9,098	0,013
Alcohol	0,107	0,751
Interacción dieta*alcohol	0,274	0,612

Los animales alimentados con dieta hipercolesterolémica mostraron un incremento muy significativo en el número de células espumosas con respecto a los que no ingirieron dieta ($p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas en el número de células espumosas entre alcohólicos y controles. No se comprobó interacción dieta/alcohol (tabla 3).

Tabla 3. Número de células espumosas

Variable	Control	Alcohol	Dieta	Alcohol y dieta
Número de células espumosas	X= 2,0	x= 2,500	x= 37,000	x= 47,833
	DE= 2,828	DE= 3,536	DE= 6,164	DE= 12,090
	N= 4	n= 4	n= 4	n= 6

X: media, DE: desviación estándar, n: número.

Efectos	F	p
Dieta	52,643	0,000
Alcohol	1,048	0,330
Interacción dieta*alcohol	0,871	0,373

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que los conejos con dieta hipercolesterolémica, incluidos aquellos que ingirieron dieta y alcohol, desarrollaron lesiones ateroscleróticas en la aorta, principalmente en la porción torácica. Esto se comprobó al realizar la tinción macroscópica de Sudán con la cual se visualizaron las lesiones presentes en la íntima de las aortas. Las lesiones ateroscleróticas que presentaron pueden ser catalogadas como estrías adiposas teniendo en cuenta los datos reportados por la literatura.^{15,16}

Los hallazgos antes mencionados fueron corroborados por los resultados de la morfometría macroscópica y microscópica. Al observar la superficie ocupada por estrías adiposas, así como los valores de grosor intimal y el número de células espumosas, se comprobó que fueron superiores en los animales con dieta hipercolesterolémica.

En estudios realizados en animales a los cuales se les induce aterosclerosis, se plantea que con ayuda de una dieta rica en colesterol se desarrollan lesiones ateroscleróticas a las pocas semanas de haber iniciado el tratamiento.^{11,17} Más aún, la hipercolesterolemia es un factor de riesgo de la aterosclerosis sintomática en humanos.⁶

Todo esto evidencia que el consumo de una dieta rica en colesterol produce aterosclerosis tanto en animales de experimentación como en humanos,^{6,18} y confirma que el conejo es un modelo adecuado para el estudio de esta enfermedad como ha sido planteado por otros investigadores.^{11,18}

Los animales de la presente serie que ingirieron etanol presentaron alteraciones muy ligeras en la íntima de sus aortas. La morfometría macroscópica reveló un área pequeña ocupada por estrías adiposas. En los animales tratados con dieta y alcohol el área ocupada por estrías adiposas fue ligeramente mayor que la observada en el grupo dieta. Estos resultados hacen pensar que el alcohol no posee un efecto protector eficiente al menos a las dosis empleadas en el presente estudio.

Más aún, las alteraciones ligeras observadas en la íntima de las aortas de los animales tratados con etanol, hace pensar que quizás, con una dosis mayor o con un tiempo más prolongado de tratamiento, o ambos, pudieran desarrollarse lesiones ateroscleróticas severas en animales que ingieren alcohol. En estudios realizados en humanos se ha

reportado que el consumo crónico, así como de grandes cantidades de alcohol, se asocia con la presencia de lesiones ateroscleróticas de gran extensión.¹⁹

Al comparar los valores de grosor intimal y número de células espumosas, se comprobó que estos fueron mayores en los animales que ingirieron dieta y etanol. Estos hallazgos evidencian un mayor desarrollo de la lesión aterosclerótica en estos animales con respecto a los del grupo tratado solo con dieta, lo cual corrobora la idea de que el alcohol lejos de proteger provoca mayores alteraciones.

Los resultados del presente estudio son similares a otros reportes de la literatura;¹¹ sin embargo, difieren de los planteados por otros autores.²⁰ Las diferencias pudieran deberse a varios factores como son: la dosis, la vía y forma de administración del etanol. En el presente estudio se utilizó el etanol a razón de 3g/kg de peso corporal. La dosis diaria fluctuó entre 6-12 mL de etanol en 500mL de agua, de acuerdo con el peso del animal disuelto en agua a 40 %. En los trabajos mencionados se reportan dosis de 2,5 mL de etanol en 500 mL de agua²¹ o disuelto en agua a 5 %.²⁰ Estas dosis son más bajas que las utilizadas en el presente estudio, lo cual pudiera explicar las diferencias encontradas.

Otro de los factores que pudiera explicar las diferencias mencionadas, es el tiempo de tratamiento. En el presente trabajo los animales fueron tratados por 16 semanas. En los estudios de referencia se reporta efecto protector del alcohol y un tiempo de tratamiento de 10 semanas.^{20,21} Estudios recientes plantean que el efecto protector del alcohol disminuye con el transcurso del tiempo. Estos autores reportan una disminución del efecto protector del etanol después de las 12 semanas de tratamiento.²⁰ Se pudiera pensar entonces que el tiempo de tratamiento influye en los resultados obtenidos.

La vía y forma de administración en el presente estudio fue similar a la empleada en los estudios de referencia por lo que se puede pensar que este factor no influye en los resultados obtenidos.

Morphometric characteristics of the aorta of rabbits subjected to ethanol intake and hypercholesterolemic diet since adolescence

SUMMARY

The effects of ethanol on the macroscopic and microscopic morphometric variables in the aortas of rabbits that take hypercholesterolemic diet during adolescence were determined to evaluate the possible protective effect of ethanol against atherosclerosis. Twenty two 100 days-old male rabbits were divided into 4 groups and treated with ethanol, hypercholesterolemic diet, ethanol and hypercholesterolemic diet, and a control group. The experiment lasted 16 weeks. The following morphometric variables were evaluated: relative surfaces occupied by adipose streaks, intimal thickness and number of foamy cells. The animals treated with hypercholesterolemic diet showed higher values than those of untreated rabbits, which evidenced greater alterations in the aorta intima. The intake of moderate ethanol doses did not prevent the development of aortic

lesions. These results revealed that ethanol does not have an efficient protective effect, at least at the dose and conditions used in this experiment.

Key words: Adolescence, alcoholism, aorta, atherosclerosis, hypercholesterolemic diet, morphometrics.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Windle Michael. Alcohol use among adolescents and young adults. *Alcohol Res Health* 2003;27(1):79 -85.
2. Chang M, Cañizares M, Sandoval JE, Bonet M, González R. Características del consumo de bebidas alcohólicas en la población cubana. *Rev Hosp Psiq Hab* 1998;49(3):257-63.
3. Maddock J, Glanz K. The relationship of proximal normative belief and global subjective norms to collage student's alcohol consumption. *Addict Behav* 2005;30(2):315-23.
4. Andersen A, Due P, Holstein BF, Iverson I. Tracking drinking behavior from age 15-19 years. *Addiction* 2003;98(11):1505-11.
5. Witt ED. Mechanism of alcohol abuse and alcoholism in adolescents: A case for developing animal models. *Behav Neural Biol* 1994;62:168-77.
6. Arab G, Avilé J, Rivera M. Función de los inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa en la enfermedad cardiovascular. *AVFT* 2003;22(1):13-8. ISSN 0798-0264
7. Tedgui A, Mallat Z. La apoptosis, determinante principal de la aterotrombosis. *Arch Mal Coeur Vaisseaux* 2003;96(6):671-5.
8. Hidalgo Mesa CJ, Cepero Rodríguez I, Berrios Águila JE, Orestes Ulloa Quintanilla F, Polanco Rodríguez F. Infarto cerebral: complicaciones y causas de muerte. *Rev Cubana Med Milit* 2005;34(1):71-5.
9. Beattie JH, Kwun IS. Is Zinc deficiency a risk factor for Atherosclerosis? *British J Nut* 2004;91:177-81.
10. Casanueva V, Cid X, Cancino M, Borzone L, Cid L. Homocisteína en niños y adolescentes. Relación con historia familiar de enfermedad cardiovascular *Rev Méd Chile* 2003;131:997-1002.
11. Shaish A, Pape M, Rea T, Srivastava RA, Latour MA, Hopkins D, Schonfeld G. Alcohol increases plasma levels of cholesterol diet-induced atherogenic lipoproteins and aortic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(6):1091-7.
12. Del Risco Turino C, Álvarez Hernández M, Ferrer Padrón AL. Aterometría de las arterias de la pierna en pacientes con amputaciones por causas vasculares. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001;20(4):249-53. ISSN 0864-0300
13. Hermes Toros X, Castellanos R, Fernández-Britto JE La asociación de dislipidemia y trombosis en la inestabilización de la placa aterosclerótica. *Rev Cubana Invest Biomed* 2005;24(3). Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/indice.html>
14. Janszky I, Mukamal K, Orth-Gomer K El consumo moderado de alcohol disminuye la progresión de la aterosclerosis coronaria. *Atherosclerosis* 2004;176(2):311-9.

15. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993;362:801-9.
16. Fernández-Brito JE. Cronoanatomía de la lesión aterosclerótica. *Arch Med Int* 1996;18(1):13-9.
17. Merritt R, Guruge BL, Miller DD, Chaitman BR, Bora PS. Moderate alcohol feeding attenuates postinjury vascular cell proliferation in rabbit angioplasty model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30(1):19-25.
18. Aliev G, Burnstock G. Watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia: a model of atherosclerosis. *Histol-Histopathol* 1998;13(3):797-817.
19. Castelli WP, Doyle JT, Gordon T. Alcohol and blood lipids. The cooperative phenotyping study. *Lancet* 1997;2:153-5.
20. Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 1994;91:1182-8.
21. Merritt R, Guruge BL, Miller DD, Chaitman BR, Bora PS. Moderate alcohol feeding attenuates postinjury vascular cell proliferation in rabbit angioplasty model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30(1):19-25.

Recibido: 10 de febrero de 2007. Aprobado 12 de marzo de 2007.

Dra. *Aleida Herrera Batista*. Calle 194 número 1511, entre 15 y 17 Siboney, municipio Playa. Teléf. 2716492. Correo electrónico: candina@infomed.sld.cu