



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE EXTRACTO DE *AZORELLA COMPACTA*
SOBRE LA HIPERTROFIA CARDIACA DIABETICA

PROYECTO DE MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA.

ALUMNA: MICHELLE NICOLE BUSTOS PALAVECINO.

PROFESOR GUÍA: ULISES NOVOA FLORES, PhD

TALCA- 2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

ÍNDICE

TITULO

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCION | 2 |
| 3. MARCO TEORICO | 5 |
| 3.1. DIABETES MELLITUS | 5 |
| 3.2. COMPLICACIONES DE LA DIABETES | 7 |
| 3.3. MIOCARDIOPATIA DIABETICA | 7 |
| 3.4. HIPERTROFIA DE LOS CARDIOMIOCITOS | 8 |
| 3.5. EFECTOS CARDIOPROTECTORES <i>AZORELLA COMPACTA</i> | 9 |
| 3.6. MODELO EXPERIMENTAL | 10 |
| 4. HIPOTESIS | 11 |
| 5. OBJETIVO GENERAL | 11 |
| 6. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 11 |
| 7. MATERIALES Y METODO..... | 12 |
| 7.1. COHORTE DE RATONES EN ESTUDIO | 12 |
| 7.2. INDUCCIÓN DE DIABETES TIPO 2 | 13 |
| 7.3. PROTOCOLO DE ALIMENTACIÓN | 14 |
| 7.4. ANESTESIA, EUTANASIA Y EXTRACCION DE CORAZON | 16 |
| 7.5. DETERMINACION HIPERTROFIA DE LA BOMBA CARDIACA..... | 16 |
| 7.6. CORTES E INCLUSION DE LOS TEJIDOS..... | 16 |
| 7.6.1. DESHIDRATACION..... | 17 |
| 7.7. INCLUSIÓN EN PARAPLAST..... | 17 |
| 7.8. PREPARACION DE TACOS | 17 |
| 7.9. CORTES HISTOLOGICOS..... | 18 |
| 7.10. TINCIONES..... | 18 |
| 7.10.1. PROCESO DE DESPARAFINADO..... | 18 |
| 7.10.2. TINCION HEMATOXILINA EOSINA..... | 18 |
| 7.10.3. PROCESO DE DESHIDRATADO..... | 19 |

| | |
|--|----|
| 7.10.4. PROCESO DE MONTAJE | 19 |
| 7.11. ANALISIS MORFOMETRICO | 19 |
| 7.12. ANALISIS ESTADISTICO | 20 |
| 8. RESULTADOS..... | 21 |
| 8.1 TABLA 1. DATOS DE GLICEMIAS | 22 |
| 8.1.2. GRÁFICO 1. MEDIAS DE LAS GLICEMIAS | 23 |
| 8.2. TABLA 2. DATOS DE PESOS CORPORALES..... | 24 |
| 8.2.1. GRÁFICO 2. MEDIAS DE LOS PESOS CORPORALES FINALES | 25 |
| 8.3. TABLA 3. DATOS RAZON PESO CORAZÓN VS PESO CORPORAL..... | 27 |
| 8.3.1. GRÁFICO 3. MEDIAS DE LA RAZON ENTRE PESO CORAZÓN VS PESOS CORPORAL | 28 |
| TIBIAS REPRESENTATIVAS | 29 |
| 8.4. TABLA 4. DATOS RAZÓN LARGO DE TIBIA VS PESO CORAZÓN POR GRUPO EXPERIMENTAL..... | 30 |
| 8.4.1. GRÁFICO 4. MEDIAS DE LA RAZON ENTRE PESO CORAZÓN VS LARGO TIBIA DE RATONES..... | 31 |
| CORTES HISTOLÓGICOS DE LA BOMBA CARDIACA | 32 |
| 8.5. TABLA 5. DATOS DEL ÁREA DE CARDIOMIOCITOS (μM^2) | 33 |
| 8.5.1. GRÁFICO 5. MEDIAS DE LAS ÁREAS DE CARDIOMIOCITOS | 34 |
| 9. DISCUSION | 36 |
| 10. CONCLUSION..... | 43 |
| 11. BIBLIOGRAFIA | 44 |

1. RESUMEN

Ancestralmente se han utilizado diversas infusiones de plantas nativas para mejorar las condiciones de salud de las personas con restringido acceso a farmacología convencional, junto con una deficiencia hospitalaria que existe actualmente. Dentro de los fitofármacos introducido oficialmente en el Reglamento del Sistema Nacional de Control de Productos Farmacéuticos las categorías de fitofármaco y de medicamento herbario tradicional encontramos la Llaretta (*Azorella compacta*) distribuida en la alta cordillera de la región de Coquimbo hasta la zona del Maule, así como también, en la Cordillera de Nahuelbuta y en el área andina de la Región Metropolitana de Santiago.

Los pueblos originarios andinos, específicamente atacameños, han reportado efectos beneficiosos del uso de la Llaretta para el tratamiento de diversas patologías, como por ejemplo la diabetes y su efecto antihiperlipémico.

Los objetivos de este trabajo son dar un sustento científico mediante la evaluación de los efectos asociados al consumo de extractos de *Azorella compacta* en el remodelado cardiovascular en ratones C57BL6 susceptibles a diabetes tipo 2 inducida por alimentación rica en grasas.

Los resultados obtenidos sugieren un aumento del tamaño del músculo cardíaco cuando el extracto disuelto en metanol es ingerido *ad libitum*. Sin embargo, se necesitan investigaciones posteriores para validar los resultados de este ensayo.

2. INTRODUCCIÓN

Durante el año 2014 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó el último informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles (ENT), que lleva por título: “Cumplimiento de las nueve metas mundiales relativas a las enfermedades no transmisibles: una responsabilidad compartida”. Como su nombre lo indica se definen 9 metas a cumplir con fecha límite al año 2025.

La séptima meta lleva por título “Detención del aumento de la diabetes y la obesidad para 2025”; se hace de gran relevancia incrementar el número de pacientes fuera de riesgos como la obesidad visceral e insulino resistencia, ya que de estos estados deriva un conjunto de factores de riesgo, conocido como síndrome metabólico, que se asocian a una probabilidad aumentada de padecer diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, esto debido a la lipotoxicidad dirigida hacia el hígado que mientras más oxidación de ácidos grasos menos oxidación de la glucosa, generando un aumento de la gluconeogénesis, produciendo insulino resistencia.

La octava meta mundial persigue asegurar el tratamiento farmacológico y asesoramiento (incluido el control de la glicemia) de al menos un 50% de las personas que lo necesitan, para prevenir ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares para el 2025. La enfermedad coronaria, la hipertensión arterial y la diabetes son factores de riesgo independientes para el desarrollo de insuficiencia cardíaca y muerte. La cardiomiopatía diabética (CMD) es una de las etiologías frecuentes de cardiopatía en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2. Los accidentes cerebrovasculares formaron parte de la principal causa de defunción por ENT en 2012 y fueron responsables de 17,5 millones de fallecimientos, o el 46% de las muertes. Esta meta encaminada a la reducción de los ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, tiene por objetivo el mejoramiento de la

cobertura del tratamiento farmacológico y del asesoramiento de las personas expuestas a un riesgo cardiovascular elevado o que ya padecen la enfermedad. Se trata de una intervención asequible que puede llevarse a cabo a nivel de la atención primaria de salud incluso en entornos de recursos limitados.

Por último, de entre las metas de interés para el estudio, la novena busca disponibilidad de tecnologías básicas y medicamentos esenciales asequibles, incluidos los genéricos, necesarios para tratar las principales enfermedades no transmisibles, en centros hospitalarios tanto públicos como privados, dado que la misma OMS estipuló que el determinante social socioeconómico de bajo o mediano ingreso es un gran factor de riesgo para el padecimiento de obesidad y futura adquisición de diabetes mellitus tipo 2.

Se destaca la importancia de la diabetes por ser una enfermedad compleja desde el punto de vista metabólico y del bienestar del individuo que la padezca. Disminuye la calidad y expectativa de vida, ya que conlleva innumerables complicaciones funcionales como estructurales en variados órganos.

Por su complejidad y su estadio crónico, rápidamente se globalizó el uso de la medicina convencional como tratamiento base. Desde siglos, diversas culturas han buscado métodos alternativos para tratar enfermedades con elementos naturales disponibles a su alcance. En Chile por ejemplo, se encuentra ubicada la “Llaretá” planta que ha sido utilizada en un comienzo principalmente por los atacameños debido a su ubicación geográfica y por sus facultades como estimulante gástrico, diurética, analgésicas en caso de resfriado, migraña y neuralgia, neumonía y reumatismo(1) y últimamente descrita, su propiedad antihiperlicemiante.

Por lo tanto, el presente estudio busca dar sustento científico a los tratamientos alternativos en base a infusión de Llaretá, con la intención de buscar el principio activo involucrado en los efectos antihiperlipémicos ya descritos en la literatura(2).

3. MARCO TEORICO

3.1. DIABETES MELLITUS

La diabetes es una enfermedad crónica grave de gran impacto a nivel mundial, se genera como consecuencia de una falla pancreática al momento de sintetizar insulina o por sobre exigencia de las células beta pancreáticas por una constante y forzada mantención de la euglicemia, causando una disfunción generalizada donde el organismo no puede utilizar de manera eficaz la insulina que produce.

Abarca un problema de salud pública importante, ya que genera muerte prematura, si la esperanza de vida de una persona en promedio a nivel mundial es de 72 años, la última cifra revelada por Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2012 indica que la diabetes causó 1,5 millones de muertes donde el 43% de dicha cifra se produce antes de la edad de 70 años. Actualmente no solo se encasilla como una enfermedad longeva, sino también cada vez es mayor la proporción de diagnosticarla en menores. La diabetes forma parte de las cuatro enfermedades no transmisibles de mayor morbilidad a nivel mundial. Además se observa el aumento de casos en la población adulta con diagnóstico de diabetes entre los años 1980 y el año 2014, declarando cifras preocupantes debido al aumento global de un 4,7% a un 8,5%, 108 millones y 422 millones de adultos, respectivamente(3).

Existe concordancia que hay un aumento de los factores de riesgo, tales como el sobrepeso y la obesidad. El determinante social socioeconómico fue considerado como un factor de riesgo, puesto que la prevalencia de diabetes ha aumentado con mayor rapidez en los países de ingresos medianos que en los de ingresos altos³.

Como es de conocimiento general, existen varios tipos de diabetes: diabetes mellitus 1 (DM1), diabetes mellitus 2 (DM2) y diabetes gestacional (DG). La DM1 Representa el 5-10% de los casos de DM en el mundo, por lo que su frecuencia se expresa mejor como incidencia. Es la más frecuente entre niños y adolescentes. Se desarrolla como consecuencia de la destrucción de las células beta del páncreas, por lo que el individuo afectado debe recibir insulina como tratamiento de sustitución hormonal(4).

La DM2 habitualmente se diagnostica cuando ya se ha producido una serie de trastornos que se podrían tratar si se pesquisarán antes de que se presente la hiperglicemia. Dentro de estos factores se encuentran los aumentos del fibrinógeno, PAI-1, proteína C reactiva, presión arterial, triglicéridos, disminución del colesterol HDL y glicemia en rango intermedio. Tiene un componente genético muy importante que alteraría la secreción de la insulina a través de regeneración deficiente de las células beta, resistencia a la insulina o ambas. Si a lo anterior se suman factores ambientales como obesidad, sedentarismo, tabaquismo y estrés, entre otros, se presentará la intolerancia a la glucosa o un estado prediabético que finalmente desarrollará en DM2(5).

Según lo estipulado anteriormente, la DM2 es una patología que posee detonadores ambientales tales como la dieta, haciéndola una patología relativamente sencilla de inducir de manera experimental facilitando su estudio *in vivo*.

La obesidad aumenta la probabilidad de diabetes, hipertensión, cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular y ciertos tipos de cáncer. A nivel mundial, la obesidad casi se ha duplicado desde 1980. En 2014, el 10% de los hombres y el 14% de las mujeres de 18 años o más eran obesos. Más de 42 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso en 2013(6).

3.2.COMPLICACIONES DE LA DIABETES

Existen otras complicaciones a las cuales se les ha asociado la diabetes como desencadenante, estas pueden ser micro y macrovasculares. Las complicaciones microvasculares son lesiones oculares (retinopatía) que desembocan en ceguera; lesiones renales (nefropatía) que acaban en insuficiencia renal, y lesiones del sistema nervioso periferico que ocasionan impotencia y pie diabético que muchas veces termina en amputación de la zona afectada por infecciones graves.

Las complicaciones macrovasculares son las enfermedades cardiovasculares, como los ataques cardiacos, los accidentes cerebrovasculares y la insuficiencia circulatoria en los miembros inferiores. En ensayos aleatorizados se ha comprobado que un buen control metabólico, tanto en la diabetes de tipo 1 como en la de tipo 2 puede retrasar el inicio y la evolución de estas complicaciones(7).

3.3.MIOCARDIOPATIA DIABETICA

El objetivo de este estudio se encuentra dirigido a una de las complicaciones macrovasculares más importante y de mayor morbi-mortalidad, la cardiomiopatía diabética (CMD). Esta forma parte de las etiologías frecuentes de cardiopatía en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2. Hasta 50% de las personas con diabetes tipo 2 pueden desarrollar insuficiencia cardíaca y en ausencia de manifestaciones hasta dos tercios de los pacientes con insuficiencia cardíaca presentan resistencia a la insulina. Aún persisten múltiples incógnitas acerca de los mecanismos patogénicos de una enfermedad tan prevalente hoy día como es la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), básicamente es la incapacidad del miocardio para utilizar eficientemente los sustratos (lípidos o carbohidratos) que subyace a la CMD(8).

3.4.HIPERTROFIA DE LOS CARDIOMIOCITOS

En modelos experimentales animales y en personas con diabetes, se han demostrado diversos cambios metabólicos, moleculares, funcionales y estructurales del miocardio que ocurren en el desarrollo de la CMD(7). Como se mencionó anteriormente la incapacidad del miocardio para utilizar eficientemente los sustratos (lípidos o carbohidratos) subyace a la CMD. En reposo el sustrato principal del miocardio son los ácidos grasos libres y, con el ejercicio, el miocardio sano cambia a carbohidratos, los cuales generan más ATP para un valor dado de oxígeno(9) a este mecanismo se le conoce como flexibilidad metabólica. Esta flexibilidad se encontraría disminuida en individuos con diabetes, dando paso a una oxidación de ácidos grasos incompleta, incrementando la producción de aldehídos y sustancias reactivas de oxígeno, generando daño en el miocardio.

La captación de glucosa por las células musculares cardíacas requiere de insulina, sin embargo, este proceso se encuentra comprometido en la DM2 por la resistencia a la insulina. Como consecuencia se genera un aumento del estrés oxidativo, manejo defectuoso del calcio, alteración de la función mitocondrial, inflamación y fibrosis(10).

El estrés oxidativo aumentado o desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y su degradación por antioxidantes endógenos, ha estado implicado tanto en el inicio como en la progresión de la insuficiencia cardíaca congestiva y de la disfunción cardíaca de la CMD(10). Así, de igual modo ocurre en la adventicia de las paredes vasculares arteriales, provocando una mayor rigidez arterial, que es otro factor de disfunción cardíaca. La disfunción contráctil por la acumulación de lípidos en los miocardiocitos, la reactivación de genes fetales y la hipertrofia ventricular izquierda(11), son otros factores asociados a la diabetes.

La hipertrofia de los miocardiocitos se produce como medida compensatoria por la disminución de la superficie funcional del músculo cardíaco, ya que como se mencionó los

metabolitos con alto potencial toxico celular generan básicamente apoptosis y fibrosis, dejando un exceso de tejido conectivo fibroso metabólicamente no funcional en el lugar donde hubo perdida celular.

En Chile, según la Guía de Práctica Clínica Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus tipo 2 publicada por el Ministerio de la Salud (MINSAL) del año 2016 – 2017, el tratamiento que se le debe administrar a un paciente al cual se le diagnostique DM2 consta de un buffet de fármacos hipoglicemiantes de vía oral e insulina NPH, el algoritmo en su etapa final (paciente diabético crónico) es el uso irrefutable de insulina NPH la cual puede variar según la necesidad del paciente. Sus valores bordean los \$30.000 a \$70.000 pesos chilenos, siendo un tratamiento que cada vez más utilizado, generando más inversión por parte del estado, ya que la DM2 pertenece al grupo de enfermedades cubiertas por el GES.

3.5.EFECTOS CARDIOPROTECTORES *AZORELLA COMPACTA*

Azorella compacta o comúnmente conocida como Llareta, es una planta silvestre que crece en regiones altiplánicas de los Andes en la zona norte de Chile, aproximadamente a unos 4000 metros sobre el nivel del mar. La población indígena (atacameños) usaba la Llareta como planta medicinal para el tratamiento de la diabetes asociada a la obesidad(2).

En el año 2003, el Dr. Aurelio San Martín, académico del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Antofagasta, dirigió investigaciones para probar como numerosos diterpenos de la especie *Apiaceae* generan efectos antihiperlipemicos(12). Luego en el año 2005, generó distintos extractos de *A. compacta*, donde los solventes utilizados fueron seleccionados por su polaridad creciente diclorometano (DCM), éter y metanol dirigidos a la extracción compuestos activos en las diversas preparaciones.

3.6.MODELO EXPERIMENTAL

Es bien sabido que la experimentación en humanos es un método de investigación limitado y regularizado para resguardar la vida del participante experimental, pudiendo obtenerse muestras no representativas para el propósito del estudio, lo que nos llevó a continuar el proceso de investigación en ratones modificados genéticamente para emular un ambiente patológico lo más cercano al paciente y tener acceso a muestras de significancia clínica y experimental bajo las normas bioéticas que rigen la investigación en animales. En el presente estudio se utilizaron ratones de la cepa C57BL6 genéticamente propensos a padecer obesidad y diabetes por medio de la dieta. Por lo tanto, el avance en la prevención y tratamiento de la misma dependerá en gran parte de la comprensión de estos mecanismos y para ello es imprescindible seguir utilizando modelos animales para realizar experimentos que serían éticamente inaceptables en humanos(13).

4. HIPOTESIS

La administración oral de extractos de *Azorella compacta* disminuye el remodelado cardiovascular en un modelo de ratón diabético.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de extractos de *Azorella compacta* sobre el remodelado cardiaco en un modelo de ratón diabético.

6. OBJETIVO ESPECIFICO

Evaluar la hipertrofia de la bomba cardiaca producida por la ingesta de una dieta alta en grasas saturadas.

Evaluar la hipertrofia de cardiomiocitos producida por la ingesta de una dieta alta en grasas saturadas.

Evaluar los efectos generados en la hipertrofia cardiaca diabética por la ingesta de diferentes extractos de *Azorella compacta*.

7. MATERIALES Y METODO

7.1. COHORTE DE RATONES EN ESTUDIO

Se utilizó un grupo de 96 ratones machos de 6 -8 semanas de la cepa C57BL6 con un peso inicial de 30 ± 13 g. Las cuales fueron mantenidas siguiendo las normas bioéticas de la experimentación animal. Los protocolos fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Talca. Todos los animales se hospedaron en jaulas conteniendo de 8 a 9 ejemplares cada una, en un cuarto con temperatura entre los 21 a 25°C, además de tener ciclos alternados de luz/ oscuridad de 12 horas. Los animales se agruparon y alimentaron en una primera instancia con 3 dietas estrictas: dieta normal con alimento estandar, dieta baja en grasas saturadas y dieta alta en grasas saturadas (la composición se detalla más adelante), las cuales se mantuvieron durante 8 semanas. Transcurrido ese tiempo se evaluó la concentración de glucosa en sangre de los ratones de los distintos grupos. Posteriormente los ejemplares que poseían una glicemia mayor o igual a 150 mg/dl fueron alimentados por 8 semanas con dieta hipercalórica y tratamiento. El tratamiento se basó en la ingesta *ad libitum* de infusiones de extractos de *A. compacta* con distinta polaridad (metanol, éter y diclorometano) y el vehículo (Tween 20). Finalmente, los grupos para el estudio quedaron distribuidos de la siguiente manera:

Grupo 1: (n=6) Ratones con alimentación convencional sin tratamiento.

Grupo 2: (n=6) Ratones con alimentación hipocalórica sin tratamiento.

Grupo 3: (n=6) Ratones con alimentación hipercalórica sin tratamiento

Grupo 4: (n=6) Ratones con alimentación hipercalórica tratados con extracto de *Azorella compacta* en metanol.

Grupo 5: (n=6) Ratones con alimentación hipercalórica tratados con extracto de *Azorella compacta* en éter.

Grupo 6: (n=6) Ratones con alimentación hipercalórica tratados con extracto de *Azorella compacta* en diclorometano.

Grupo 7: (n=6) Ratones con alimentación hipercalórica tratados con vehículo (Tween 20).

Al cabo de la semana 24, se procedió a la eutanasia de todos los animales dispuestos en la investigación.

7.2.INDUCCIÓN DE DIABETES TIPO 2

La diabetes se indujo mediante administración por vía oral de alimento comercial con una composición alta en grasas saturadas, administrada *ad libitum*. Como criterio de inclusión para la investigación se requirió que los grupos diabéticos tengan un nivel de glucosa en plasma igual o superior a 150 mg/dl. Se verificó la glicemia con extracciones de sangre a las 8 semanas de administrada la dieta.

La medición de la glicemia fue registrada al inicio y posterior a las 8 semanas de la administración de la dieta hipercalórica, así como, antes de la eutanasia. Las muestras sanguíneas fueron extraídas por un profesional, desde la sección anterior de la cola animal.

7.3.PROTOCOLO DE ALIMENTACIÓN

Los ratones ya agrupados en sus determinados grupos experimentales se alimentaron periódicamente en base a: Dieta normal sin tratamiento (Prolab Rat/ Mouse / Hamster 3000), dieta hipocalórica y dieta hipercalórica.

| NUTRITIONAL PROFILE ¹ | | | |
|---|-------------|----------------------------|-------|
| Protein, % | 20.8 | Minerals | |
| Arginine, % | 0.81 | Calcium, % | 0.71 |
| Histidine, % | 0.60 | Phosphorus, % | 0.53 |
| Isoleucine, % | 1.11 | Phosphorus (available), % | 0.53 |
| Leucine, % | 2.02 | Potassium, % | 0.70 |
| Lysine, % | 1.69 | Magnesium, % | 0.06 |
| Methionine, % | 0.60 | Sodium, % | 0.14 |
| Cystine, % | 0.44 | Chloride, % | 0.24 |
| Phenylalanine, % | 1.11 | Fluorine, ppm | 1.1 |
| Tyrosine, % | 1.18 | Iron, ppm | 58 |
| Threonine, % | 0.90 | Zinc, ppm | 41 |
| Tryptophan, % | 0.26 | Manganese, ppm | 68 |
| Valine, % | 1.33 | Copper, ppm | 7.0 |
| Alanine, % | 0.64 | Cobalt, ppm | 0.0 |
| Aspartic Acid, % | 1.50 | Iodine, ppm | 0.24 |
| Glutamic Acid, % | 4.76 | Chromium (added), ppm | 2.3 |
| Glycine, % | 0.45 | Molybdenum, ppm | 1.90 |
| Proline, % | 2.75 | Selenium, ppm | 0.27 |
| Serine, % | 1.29 | | |
| Taurine, % | 0.00 | Vitamins | |
| Fat, % | 23.6 | Vitamin A, IU/g | 4.7 |
| Cholesterol, ppm | 197 | Vitamin D-3 (added), IU/g | 1.2 |
| Linoleic Acid, % | 3.48 | Vitamin E, IU/kg | 60.6 |
| Linolenic Acid, % | 0.32 | Vitamin K, ppm | 0.59 |
| Arachidonic Acid, % | 0.04 | Thiamin Hydrochloride, ppm | 7.1 |
| Omega-3 Fatty Acids, % | 0.32 | Riboflavin, ppm | 7.8 |
| Total Saturated Fatty Acids, % | 9.05 | Niacin, ppm | 35 |
| Total Monounsaturated Fatty Acids, % | 9.32 | Pantothenic Acid, ppm | 19 |
| | | Folic Acid, ppm | 2.5 |
| Fiber (max), % | 5.8 | Pyridoxine, ppm | 6.8 |
| | | Biotin, ppm | 0.2 |
| Carbohydrates, % | 41.2 | Vitamin B-12, mcg/kg | 16 |
| | | Choline Chloride, ppm | 1,165 |
| Energy (kcal/g) ² | 4.60 | Ascorbic Acid, ppm | 0.0 |
| From: | kcal | % | |
| Protein | 0.833 | 18.1 | |
| Fat (ether extract) | 2.124 | 46.1 | |
| Carbohydrates | 1.648 | 35.8 | |

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As Fed basis except where otherwise indicated.
2. Energy (kcal/gm) - Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate x 4,9,4 kcal/gm respectively.

Figura 1. Dieta hipercalórica. DIO Rodent Purified Diet w/45% Energy From Fat – Red. Van Heek(14).

| NUTRITIONAL PROFILE | | | |
|---|-------------|-------------|------|
| Protein, % | | 17.3 | |
| Arginine, % | | 0.66 | |
| Histidine, % | | 0.49 | |
| Isoleucine, % | | 0.91 | |
| Leucine, % | | 1.64 | |
| Lysine, % | | 1.38 | |
| Methionine, % | | 0.49 | |
| Cystine, % | | 0.35 | |
| Phenylalanine, % | | 0.91 | |
| Tyrosine, % | | 0.96 | |
| Threonine, % | | 0.73 | |
| Tryptophan, % | | 0.21 | |
| Valine, % | | 1.08 | |
| Alanine, % | | 0.52 | |
| Aspartic Acid, % | | 1.22 | |
| Glutamic Acid, % | | 3.87 | |
| Glycine, % | | 0.37 | |
| Proline, % | | 2.23 | |
| Serine, % | | 1.05 | |
| Taurine, % | | 0.00 | |
| Fat, % | | 4.3 | |
| Cholesterol, ppm | | 18 | |
| Linoleic Acid, % | | 1.39 | |
| Linolenic Acid, % | | 0.19 | |
| Arachidonic Acid, % | | 0.00 | |
| Omega-3 Fatty Acids, % | | 0.19 | |
| Total Saturated Fatty A | | 1.14 | |
| Total Monounsaturated | | | |
| Fatty Acids, % | | 1.30 | |
| Polyunsaturated Fatty Acids, % | | 1.59 | |
| Fiber (max), % | | 4.7 | |
| Carbohydrates, % | | 67.4 | |
| Energy (kcal/g) ² | | 3.78 | |
| From: | kcal | % | |
| Protein | 0.692 | 18.3 | |
| Fat (ether extract) | 0.384 | 10.2 | |
| Carbohydrates | 2.697 | 71.5 | |
| Minerals | | | |
| Calcium, % | | | 0.57 |
| Phosphorus, % | | | 0.43 |
| Phosphorus (available), % | | | 0.43 |
| Potassium, % | | | 0.57 |
| Magnesium, % | | | 0.05 |
| Sodium, % | | | 0.12 |
| Chloride, % | | | 0.21 |
| Fluorine, ppm | | | 0.9 |
| Iron, ppm | | | 44 |
| Zinc, ppm | | | 34 |
| Manganese, ppm | | | 55 |
| Copper, ppm | | | 5.7 |
| Cobalt, ppm | | | 0.0 |
| Iodine, ppm | | | 0.20 |
| Chromium, ppm | | | 1.9 |
| Molybdenum, ppm | | | 1.55 |
| Selenium, ppm | | | 0.15 |
| Vitamins | | | |
| Vitamin A, IU/g | | | 3.8 |
| Vitamin D-3 (added), IU/g | | | 0.9 |
| Vitamin E, IU/kg | | | 49.3 |
| Vitamin K (as menadione), ppm | | | 0.48 |
| Thiamin Hydrochloride, ppm | | | 5.7 |
| Riboflavin, ppm | | | 5.7 |
| Niacin, ppm | | | 28 |
| Pantothenic Acid, ppm | | | 14 |
| Folic Acid, ppm | | | 1.9 |
| Pyridoxine, ppm | | | 5.5 |
| Biotin, ppm | | | 0.2 |
| Vitamin B-12, mcg/kg | | | 9 |
| Choline Chloride, ppm | | | 950 |
| Ascorbic Acid, ppm | | | 0.0 |
| 1. Based on the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies, analysis will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As-Fed basis except where otherwise indicated. | | | |
| 2. Energy (kcal/gm) - Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate x 4,9,4 kcal/gm respectively. | | | |

Figura 2. Dieta hipocalorica. DIO Rodent Purified Diet w/10% Energy From Fat – Yellow. Van Heek(15).

7.4.ANESTESIA, EUTANASIA Y EXTRACCION DE CORAZON

Los ratones fueron pesados y anestesiados según peso del animal, administrándoles una sobredosis Ketamina/Xilacina (Ketamina 80 mg/kg y Xilacina 12 mg/kg) vía intraperitoneal y exanguinación en plano anestésico profundo con abolición total de reflejos motores autónomos. Se comprobó mediante estímulos nociceptivos el efecto de la anestesia y se procedió al sacrificio del animal por disección cardiaca. Cada corazón extraído fue fijado en solución de Bouin, compuesto de 65% de solución de ácido pícrico saturado, 30% de formalina y 5% ácido acético glacial.

7.5.DETERMINACION HIPERTROFIA DE LA BOMBA CARDIACA

Para determinar si existió hipertrofia cardiaca se calculó el cociente entre el peso drenado del corazón y la longitud de la tibia a cada ratón de los grupos de investigación alimentados bajo una dieta hipercalórica.

7.6.CORTES E INCLUSION DE LOS TEJIDOS

Los cortes se realizaron manualmente con bisturí a un grosor de 3 a 5 mm. Estos fueron fijados con Bouin por 12 a 24 horas. Luego se procedió a la deshidratación e inclusión detallada a continuación (los números romanos indican la cantidad y el orden de los solventes en la batería de desparafinación y tinción):

7.6.1 DESHIDRATACION

Una vez que los tejidos fueron fijados, se lavaron con agua corriente, agitando y renovando el agua. Posteriormente se sumergieron a temperatura ambiente 30 minutos en cada una de las siguientes soluciones: alcohol 70% (I), alcohol 70° (I), alcohol 95° (I) y alcohol 95° (II); luego 60 minutos en alcohol 100° (I), alcohol 100° (II) y alcohol xilol (I) y finalmente, 45 minutos en alcohol xilol (II) y 15 minutos en alcohol xilol (III). Los compuestos fueron reciclados.

7.7.INCLUSION EN PARAPLAST

En seguida de la deshidratación se procedió a la inclusión en Paraplast. En primer lugar con Paraplast (I) por 60 a 120 minutos, luego en Paraplast (II) por 60 a 120 minutos y finalmente, en Paraplast (III) por 180 minutos. Todos se mantuvieron en la estufa a 60°C . Paraplast fue reciclado.

7.8.PREPARACION DE TACOS

Los cortes se dejaron hasta Paraplast (II), en la estufa a 60°C por 3 – 4 horas. Luego, se procedió a realizar el taco con el corte de corazón. Para ello se usaron unas placas metálicas como molde para el taco. Se colocaron los cortes dentro del molde y se procedió a incorporar el Paraplast caliente hasta el borde del molde, y se eliminaron las burbujas. Ayudado de una pinza previamente calentada al mechero. Luego, los moldes se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

7.9.CORTES HISTOLOGICOS

Los cortes histológicos fueron realizados con micrótomos de rotación de 5 micrometros de espesor, fueron dejados con pinzas en un baño termorregulado a 37°C para que se estiraran y finalmente fueron recogidos sobre un portaobjetos recubierto con polisina al 0,1%. Estos cortes histológicos son los que finalmente nos permitieron realizar las diferentes tinciones que se detallan a continuación.

7.10. TINCIONES

Para realizar las tinciones utilizadas, previamente se realizó el proceso de desparafinado y luego la etapa de teñido. Posteriormente se realizó el proceso de deshidratación de las muestras y finalmente el montaje.

7.10.1 PROCESO DE DESPARAFINADO

Los cortes histológicos fijados en los portaobjetos fueron desparafinados con xilol (I), xilol (II), alcohol 100% (I) y alcohol 100% (II), durante 10 minutos cada uno; luego se aplicó alcohol 96%, alcohol 80% y alcohol 60% durante 5 minutos cada uno. Los reactivos fueron reciclados. Posterior a lo anterior, se realizó lavado con agua corriente por 5 minutos y finalmente lavado con agua destilada

7.10.2. TINCION HEMATOXILINA EOSINA

Antes de comenzar se constituyó la solución de eosina pensando 1 gramo de eosina en 100 ml de agua destilada. Una vez constituido el reactivo, fue filtrado al igual que la

hematoxilina, la cual ya se encontraba reconstituida con anterioridad al momento de ser utilizada en el presente trabajo experimental.

Los corte histológicos se mantuvieron sumergidos en Hematoxilina por 90 segundos, luego se lavaron con agua corriente por 5 minutos y agua destilada. Posteriormente los cortes fueron sumergidos en Eosina 1% por 30 segundos, lavando con agua corriente por 1 minuto y agua destilada.

7.10.3. PROCESO DE DESHIDRATADO

Los cortes histológicos una vez teñidos fueron deshidratados sumergiéndolos en alcohol 100% (I), alcohol 100%(II), xilol (II) durante 10 minutos en cada reactivo. Los compuestos fueron reciclados.

7.10.4. PROCESO DE MONTAJE

Consecutivamente a la deshidratación de los cortes histológicos se eliminó el exceso de xilol con papel absorbente, por las orillas sin secar el tejido, se agregaron 3 gotas del medio de montaje Entellan®, se colocó el cubreobjetos presionando para eliminar las burbujas y se dejó secar.

7.11. ANALISIS MORFOMETRICO

Los montajes de cortes histológicos de tejido cardiaco teñidos bajo la técnica de tinción hematoxilina-eosina se observaron en un microscopio de luz LEICA ® DM500. Las imágenes fueron captadas con cámara digital integrada y digitalizada mediante el software Leica Application Suite versión 3.4.0.

Las imágenes resultantes fueron analizadas mediante el programa ImageJ ® delineando el cardiomiocito para poder determinar área y perímetro de las células mediante el programa señalado.

7.12. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron recopilados y analizados mediante IBM SPSS Statistics ®. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar de la media (SD) y con un nivel de significancia del 5% ($p= 0,05$).

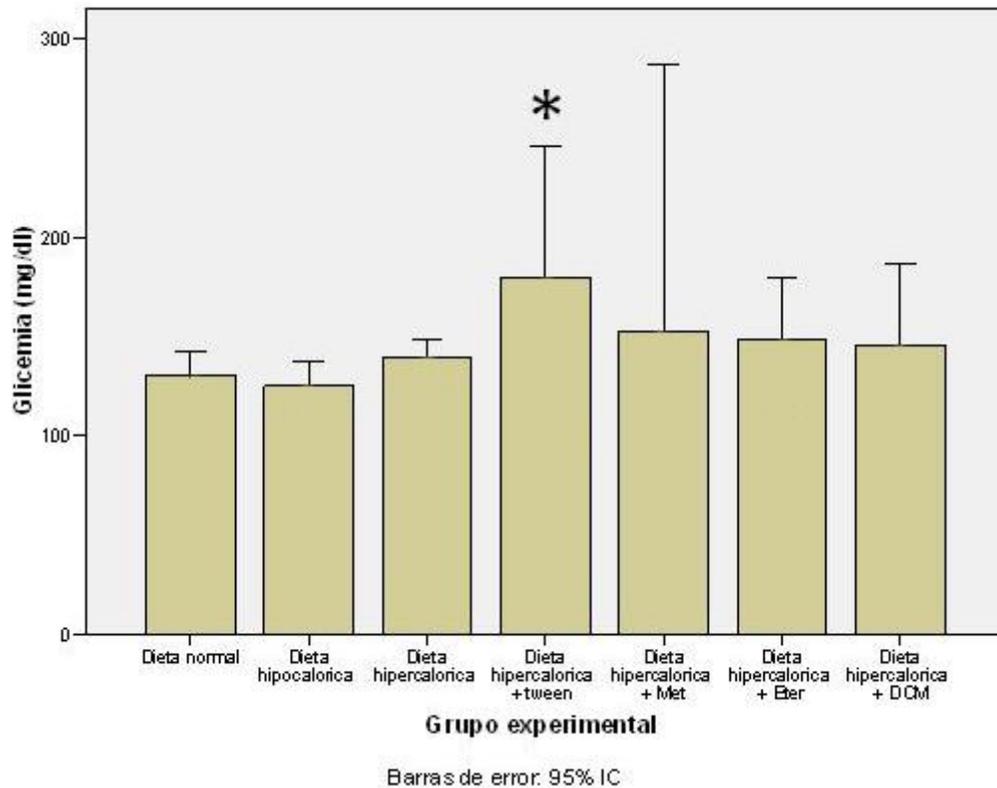
8. RESULTADOS

La hipertrofia y/o remodelo cardiaco puede ser evaluado por técnicas que revelan distintos aspectos morfofuncionales. En el presente estudio las variables morfológicas que fueron utilizadas para caracterizar los animales fueron: pesos corporales finales (PCF) del ratón, del corazón (PC), largo de la tibia (LT) y las relaciones PC/PCF y PC/LT. Además se registra de forma tentativa las medias perimetrales de los cardiomiocitos y la glicemia de cada ratón experimental.

8.1. Tabla 1. Datos de glicemias (mg/dl) por grupo experimental de ratones C57BL6 machos.

| Grupo Experimental | I.D. | Glicemia (mg/dl) | Promedio glicemia (mg/dl) | SD |
|--------------------------------|--------|------------------|---------------------------|-------|
| Dieta normal | EC -27 | 125 | 130,5 | ±11,6 |
| | EC -28 | 112 | | |
| | EC -29 | 142 | | |
| | EC-30 | 127 | | |
| | EC-31 | 135 | | |
| | EC-32 | 142 | | |
| Dieta hipocalórica | EC -18 | 132 | 125,2 | ±11,9 |
| | EC -19 | 125 | | |
| | EC -20 | 145 | | |
| | EC -21 | 112 | | |
| | EC -22 | 117 | | |
| | EC -23 | 120 | | |
| Dieta hipercalórica | EC - 1 | 137 | 139,8 | ±8,1 |
| | EC - 2 | 142 | | |
| | EC - 3 | 132 | | |
| | EC - 4 | 155 | | |
| | EC - 5 | 135 | | |
| | EC - 6 | 138 | | |
| Dieta hipercalórica + Tween 20 | EC -82 | 192 | 179,7 | ±26,7 |
| | EC -83 | 149 | | |
| | EC -84 | 198 | | |
| Dieta hipercalórica + Met | EC -71 | 125 | 152,7 | ±54,1 |
| | EC -72 | 215 | | |
| | EC -73 | 118 | | |
| Dieta hipercalórica + Eter | EC -74 | 156 | 148,5 | ±19,8 |
| | EC -75 | 161 | | |
| | EC -76 | 119 | | |
| | EC -77 | 158 | | |
| Dieta hipercalórica + DCM | EC -78 | 132 | 145,8 | ±25,8 |
| | EC -79 | 148 | | |
| | EC -80 | 122 | | |
| | EC -81 | 181 | | |

I.D: Identificador; EC: Código experimental; SD: Desviación estándar; Met: Metanol; DCM: Diclorometano.



8.1.2. GRÁFICO 1. MEDIAS DE LAS GLICEMIAS DE RATONES C57BL6 MACHOS DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL

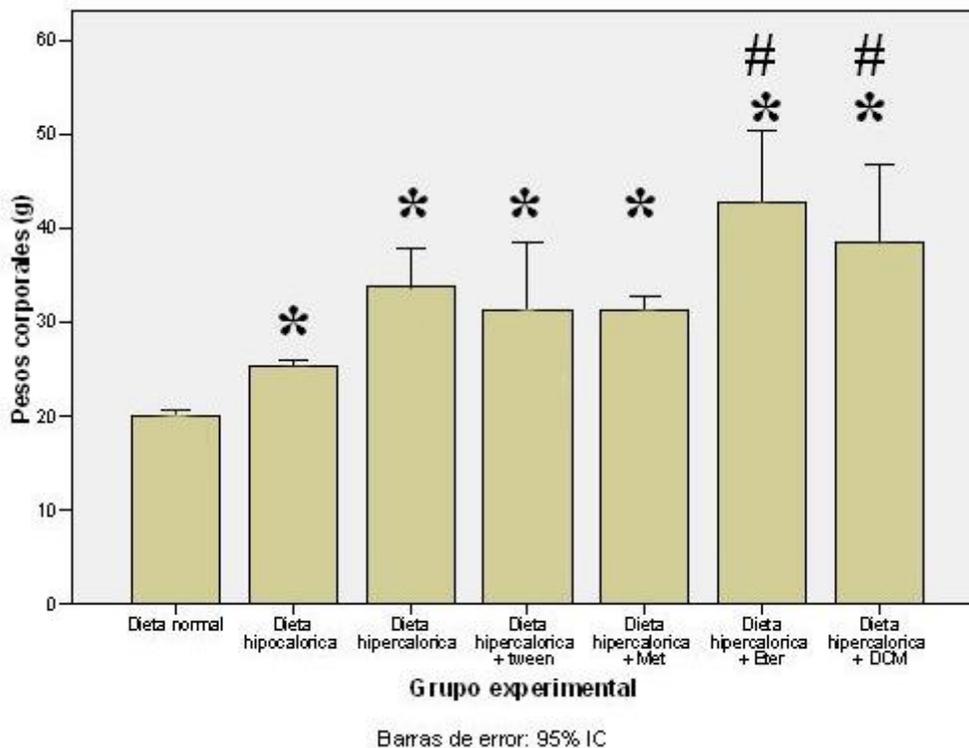
El gráfico muestra las medias de las glicemias de los distintos grupos experimentales. Las barras representan promedios \pm SD. Símbolos: * = $p < 0,05$ vs Dieta normal. Se realiza test de ANOVA seguido de un análisis t-Student-Newman-Keuls para comparación de medias entre grupos.

La totalidad de los grupos experimentales presentaron una variación de la glicemia semejante al final del proceso no significativa (0,480), a excepción del grupo experimental control de tratamiento, que registra una diferencia significativa en contraste al grupo que mantuvo su dieta normal sin tratamiento.

8.2.Tabla 2. Datos de pesos corporales (g) por grupo experimental de ratones C57BL6 machos.

| Grupo Experimental | I.D. | Peso corporal (g) | Promedio peso corporal (g) | SD |
|--------------------------------|--------|-------------------|----------------------------|------|
| Dieta normal | EC -27 | 20 | 20,0 | ±0,6 |
| | EC -28 | 20 | | |
| | EC -29 | 21 | | |
| | EC-30 | 20 | | |
| | EC-31 | 20 | | |
| | EC-32 | 19 | | |
| Dieta hipocalórica | EC -18 | 26 | 25,3 | ±0,5 |
| | EC -19 | 25 | | |
| | EC -20 | 26 | | |
| | EC -21 | 25 | | |
| | EC -22 | 25 | | |
| | EC -23 | 25 | | |
| Dieta hipercalórica | EC - 1 | 29 | 33,8 | ±3,8 |
| | EC - 2 | 30 | | |
| | EC - 3 | 36 | | |
| | EC - 4 | 34 | | |
| | EC - 5 | 35 | | |
| | EC - 6 | 39 | | |
| Dieta hipercalórica + Tween 20 | EC -82 | 33 | 31,3 | ±2,9 |
| | EC -83 | 33 | | |
| | EC -84 | 28 | | |
| Dieta hipercalórica + Met | EC -71 | 32 | 31,3 | ±0,6 |
| | EC -72 | 31 | | |
| | EC -73 | 31 | | |
| Dieta hipercalórica + Eter | EC -74 | 38 | 42,8 | ±4,9 |
| | EC -75 | 44 | | |
| | EC -76 | 40 | | |
| | EC -77 | 49 | | |
| Dieta hipercalórica + DCM | EC -78 | 40 | 38,5 | ±5,2 |
| | EC -79 | 43 | | |
| | EC -80 | 40 | | |
| | EC -81 | 31 | | |

I.D: Identificador; EC: Código experimental; SD: Desviación estándar; Met: Metanol; DCM: Diclorometano.



8.2.1. GRÁFICO 2. MEDIAS DE LOS PESOS CORPORALES FINALES DE RATONES C57BL/6 MACHOS, RESPECTIVAS A CADA GRUPO EXPERIMENTAL

El gráfico muestra el peso promedio de los distintos grupos experimentales. Las barras representan promedios \pm SD. Símbolos: * = $p < 0,05$ vs Dieta normal, # = $P < 0,05$ vs Dieta hipercalórica + tween 20. Se realiza test de ANOVA seguido de un análisis t-Student-Newman-Keuls para comparación de medias entre grupos.

Existe una diferencia significativa entre el grupo de ratones con dieta normal y los sometidos a dieta hipercalórica con y sin tratamiento por vía enteral.

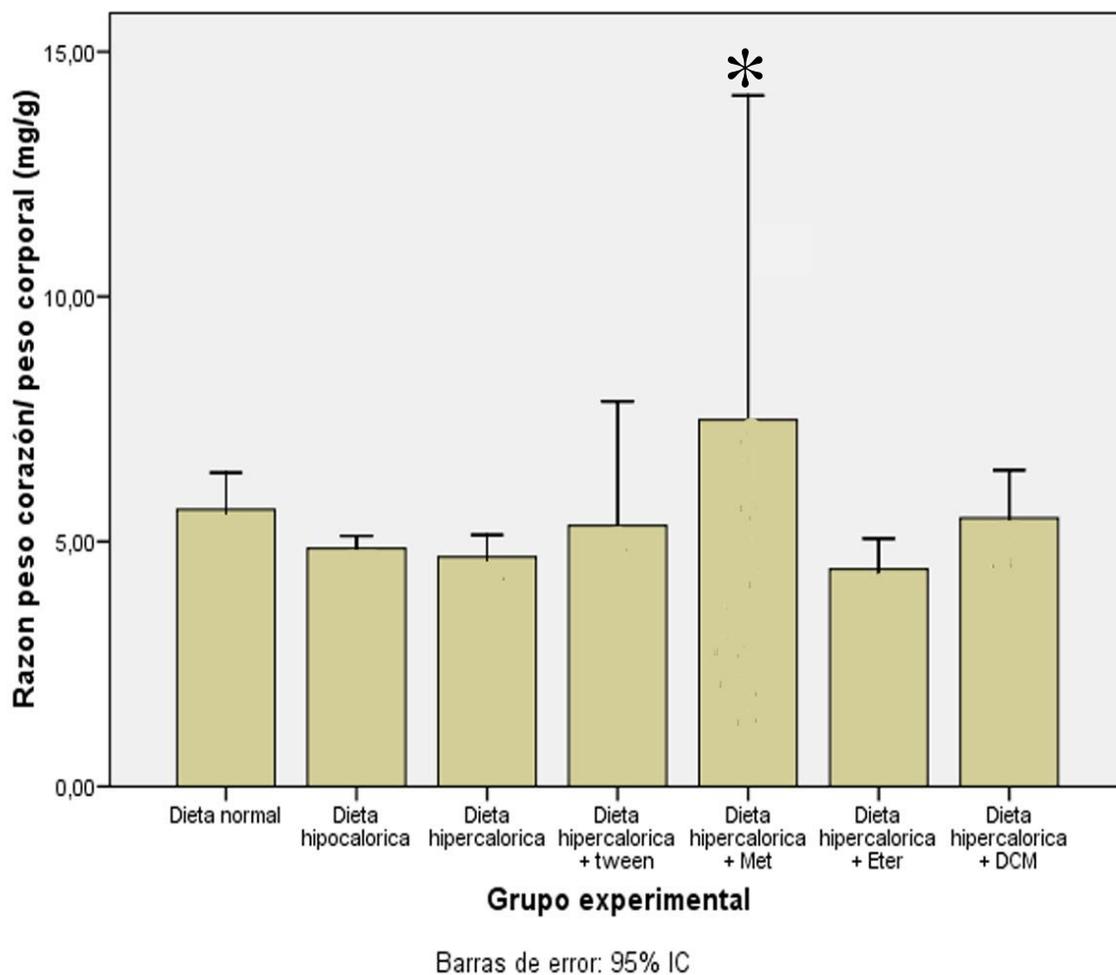
Al comparar las medias de los pesos corporales finales (PCF) de los ratones con tratamiento, se aprecia un aumento significativo del peso corporal de los ratones que consumieron agua con extracto de *A. compacta* suspendido en éter y diclorometano, en comparación a su grupo control (Dieta hipercalórica + tween 20).

Ambos presentan diferencia significativa en relación al tratamiento con metanol, pero no entre ellos (0,487).

8.3. Tabla 3. Datos peso corazón (mg) de ratones C57BL6 machos y razón vs peso corporal por grupo experimental (mg/g).

| Grupo Experimental | I.D. | Peso corazón (mg) | Promedio peso corazón (mg) | Razón peso corazón vs peso corporal (mg/g) | SD |
|--------------------------------|--------|-------------------|----------------------------|--|--------|
| Dieta normal | EC -27 | 99 | 113 | 5,64 | ±12,11 |
| | EC -28 | 101 | | | |
| | EC -29 | 116 | | | |
| | EC -30 | 110 | | | |
| | EC -31 | 120 | | | |
| | EC -32 | 131 | | | |
| Dieta hipocalórica | EC -18 | 120 | 123 | 4,86 | ±5,22 |
| | EC -19 | 119 | | | |
| | EC -20 | 124 | | | |
| | EC -21 | 125 | | | |
| | EC -22 | 132 | | | |
| | EC -23 | 118 | | | |
| Dieta hipercalórica | EC - 1 | 157 | 157 | 4,65 | ±7,87 |
| | EC - 2 | 150 | | | |
| | EC - 3 | 159 | | | |
| | EC - 4 | 153 | | | |
| | EC - 5 | 153 | | | |
| | EC - 6 | 172 | | | |
| Dieta hipercalórica + Tween 20 | EC -82 | 137 | 166 | 5,30 | ±30,05 |
| | EC -83 | 197 | | | |
| | EC -84 | 164 | | | |
| Dieta hipercalórica + Met | EC -71 | 161 | 233,7 | 7,46 | ±80,38 |
| | EC -72 | 320 | | | |
| | EC -73 | 220 | | | |
| Dieta hipercalórica + Eter | EC -74 | 186 | 189 | 4,42 | ±22,20 |
| | EC -75 | 202 | | | |
| | EC -76 | 159 | | | |
| | EC -77 | 209 | | | |
| Dieta hipercalórica + DCM | EC -78 | 209 | 209,5 | 5,44 | ±27,11 |
| | EC -79 | 248 | | | |
| | EC -80 | 190 | | | |
| | EC -81 | 191 | | | |

I.D: Identificador; EC: Código experimental; SD: Desviación estándar; Met: Metanol; DCM: Diclorometano.



8.3.1. GRÁFICO 3. MEDIAS DE LA RAZÓN ENTRE PESO CORAZÓN VS PESOS CORPORAL DE RATONES C57BL6 MACHOS, RESPECTIVAS A CADA GRUPO EXPERIMENTAL

El gráfico muestra la razón promedio de los distintos grupos experimentales. Las barras representan promedios +/- SD. Símbolos: * = $p < 0,05$ vs Dieta hipercalorica + tween 20. Se realiza test de ANOVA seguido de un análisis t-Student-Newman-Keuls para comparación de medias entre grupos.

Se observa diferencia significativa por parte de la administración por vía enteral de extracto de *A. compacta* suspendida en metanol con su grupo experimental control (dieta hipercalórica + Tween 20) y el resto de los grupos experimentales.

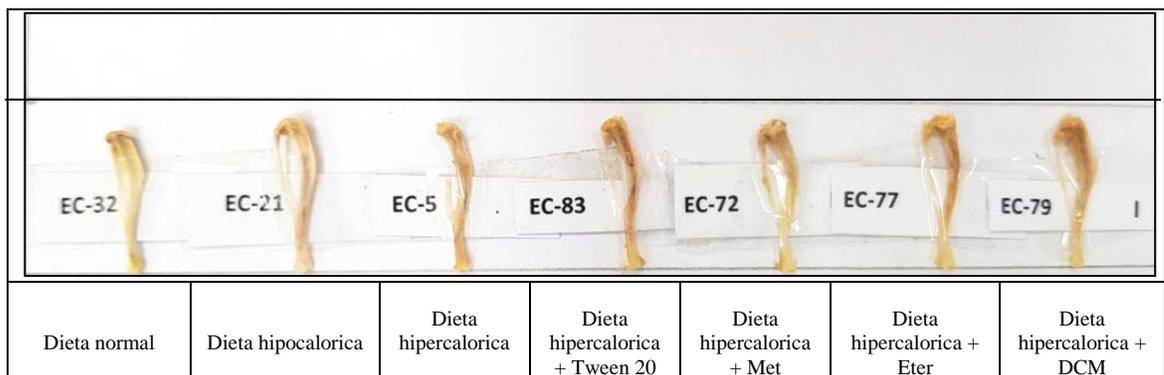


Figura 3. Tibias representativas de cada grupo experimental.

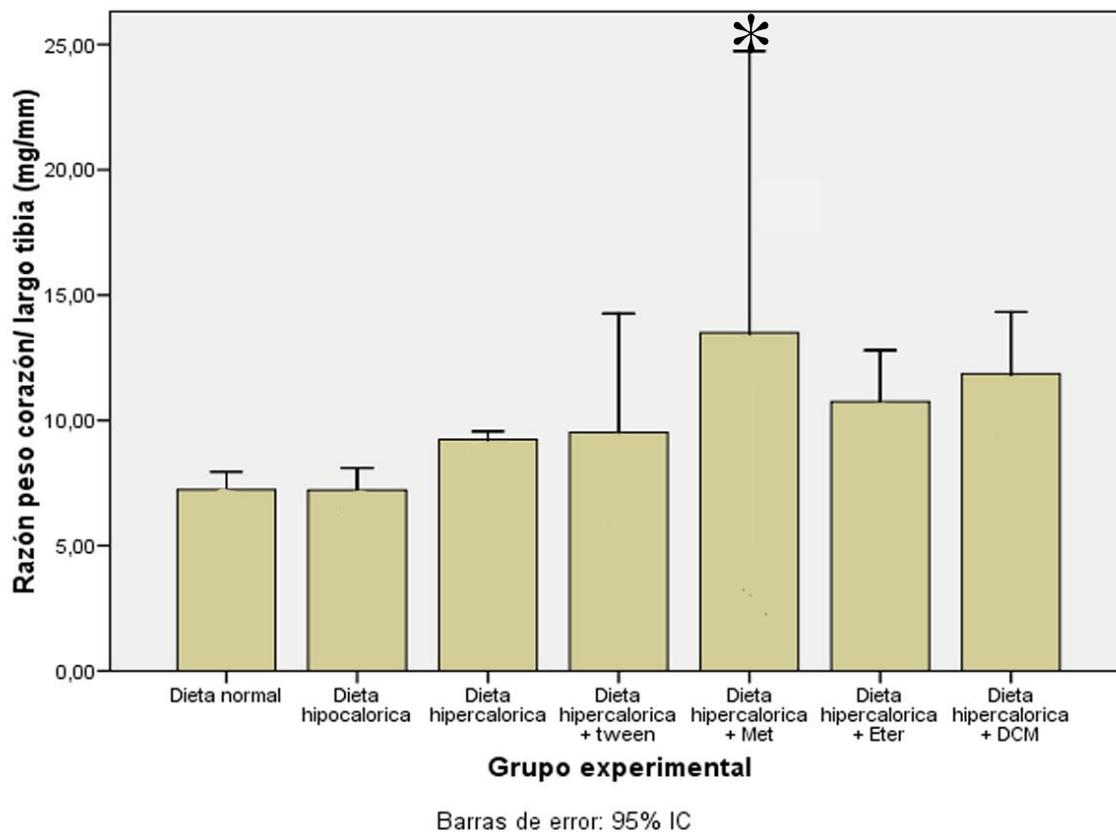
La línea trazada determina un largo de 20 mm. EC-32: 15, 9 mm. EC- 21: 17,9. EC-5: 17 mm. EC-83: 17, 3. EC- 72: 17, 4 mm. EC-77: 17, 8. EC- 79: 17, 6 mm.

8.4. Tabla 4. Datos largo de tibia (mm) correspondientes a ratones C57BL6 machos y razón vs peso corazón por grupo experimental (mg/mm).

| Grupo Experimental | I.D. | Largo tibia (mm) | Promedio largo tibia (mm) | Razón peso corazón vs largo tibia (mg/mm) | SD |
|--------------------------------|--------|------------------|---------------------------|---|-------|
| Dieta normal | EC -27 | 15,3 | 15,8 | 7,15 | ±0,50 |
| | EC -28 | 15,5 | | | |
| | EC -29 | 16,6 | | | |
| | EC -30 | 15,4 | | | |
| | EC -31 | 16,1 | | | |
| | EC -32 | 15,9 | | | |
| Dieta hipocalórica | EC -18 | 18 | 17,8 | 6,92 | ±0,26 |
| | EC -19 | 17,7 | | | |
| | EC -20 | 18,1 | | | |
| | EC -21 | 17,9 | | | |
| | EC -22 | 17,4 | | | |
| | EC -23 | 17,6 | | | |
| Dieta hipercalórica | EC - 1 | 16,8 | 17 | 9,22 | ±0,49 |
| | EC - 2 | 16,9 | | | |
| | EC - 3 | 17,4 | | | |
| | EC - 4 | 16,3 | | | |
| | EC - 5 | 17,1 | | | |
| | EC - 6 | 17,7 | | | |
| Dieta hipercalórica + Tween 20 | EC -82 | 18,1 | 17,5 | 9,49 | ±0,53 |
| | EC -83 | 17,3 | | | |
| | EC -84 | 17,1 | | | |
| Dieta hipercalórica + Met | EC -71 | 17 | 17,3 | 13,53 | ±0,23 |
| | EC -72 | 17,4 | | | |
| | EC -73 | 17,4 | | | |
| Dieta hipercalórica + Eter | EC -74 | 17,4 | 17,6 | 4,42 | ±0,23 |
| | EC -75 | 17,4 | | | |
| | EC -76 | 17,8 | | | |
| | EC -77 | 17,8 | | | |
| Dieta hipercalórica + DCM | EC -78 | 18 | 17,7 | 11,85 | ±0,43 |
| | EC -79 | 17,6 | | | |
| | EC -80 | 18 | | | |
| | EC -81 | 17,1 | | | |

I.D: Identificador; EC: Código experimental; SD: Desviación estándar; Met: Metanol; DCM: Diclorometano.

Tibias seleccionadas para representación gráfica de los tamaños promedio se encuentran destacadas en negrita.



8.4.1. GRÁFICO 4. MEDIAS DE LA RAZON ENTRE PESO CORAZÓN VS LARGO TIBIA DE RATONES C57BL6 MACHOS, RESPECTIVAS A CADA GRUPO EXPERIMENTAL

El gráfico muestra la razón promedio de los distintos grupos experimentales. Las barras representan promedios +/- SD. Símbolos: * = $p < 0,05$ vs Dieta hipercalórica + tween 20. Se realiza test de ANOVA seguido de un análisis t-Student-Newman-Keuls para comparación de medias entre grupos.

Se observa una diferencia significativa del grupo experimental con tratamiento de extractos de *A. compacta* suspendido en metanol con respecto a su grupo control. Mas no son hay diferencia significativa entre los grupos con tratamiento (0,055).

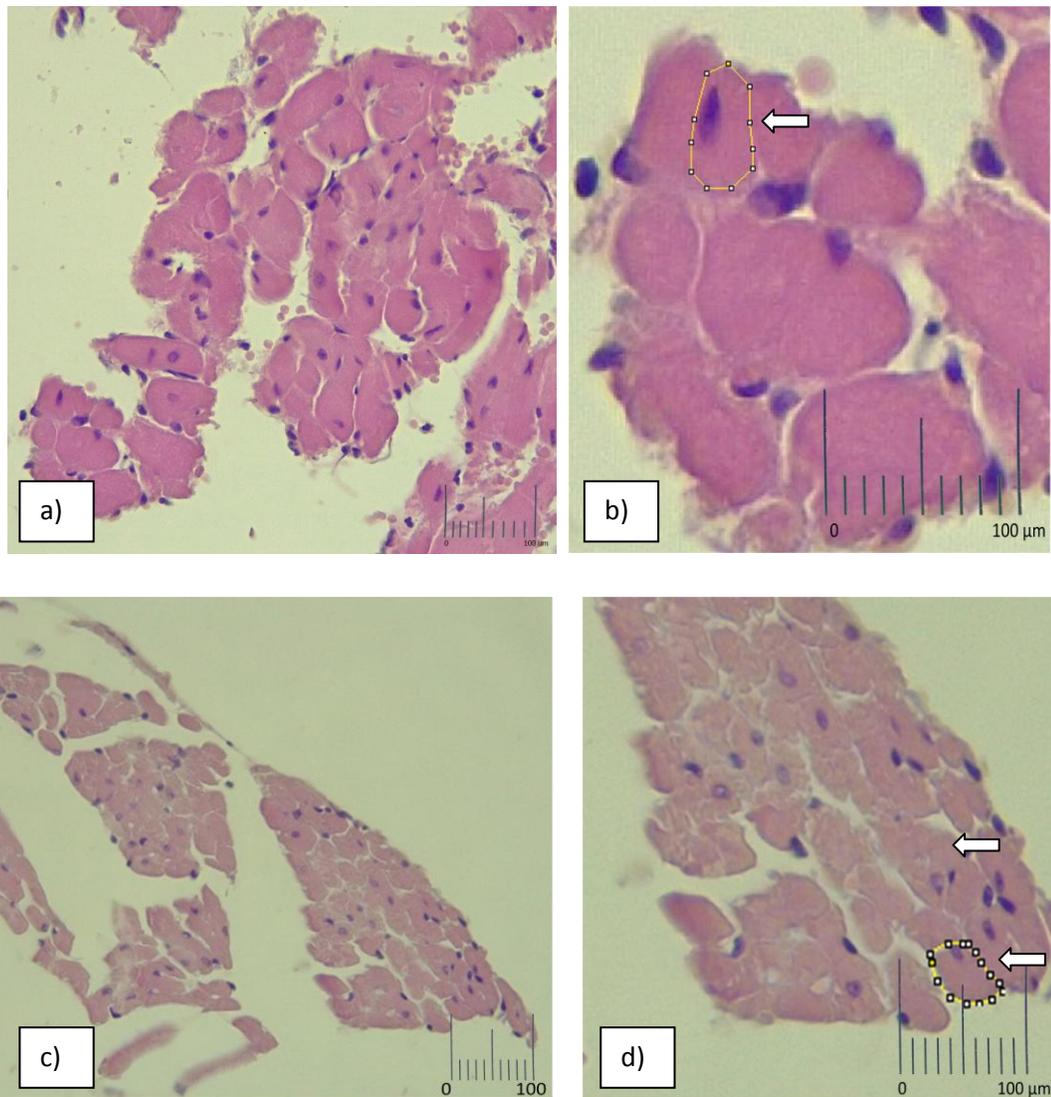


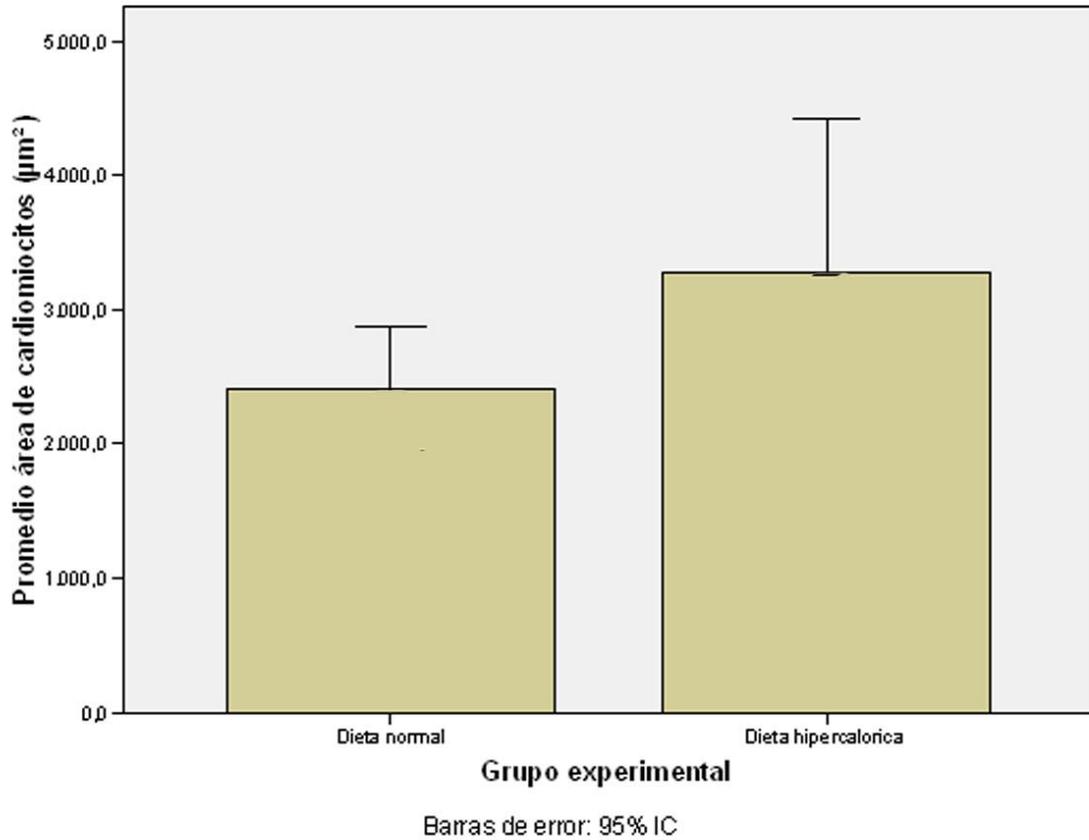
Figura 4. Cardiomiocitos teñidos con tinción hematoxilina-eosina. Se analizó área y perímetro celular de todos los individuos correspondientes a cada grupo experimental.

Cortes histológicos de la bomba cardiaca de ratones machos C57BL6 observados con objetivo de 40x. **a)** Corte histológico de la bomba cardiaca de ratón macho C57BL6 sometido a dieta normal. **b)** Cardiomiocito representativo del grupo experimental con dieta normal (EC – 32). **c)** Corte histológico de la bomba cardiaca de ratón macho C57BL6 sometido a dieta hipercalórica. **d)** Cardiomiocito representativo del grupo experimental con dieta hipercalórica (EC – 3).

8.5. **Tabla 5. Área del cardiomiocitos (μm^2) de ratones C57BL6 machos por grupo y subgrupo experimental.**

| Grupo Experimental | I.D. | Área cardiomiocitos (μm^2) | Promedio área de cardiomiocitos (μm^2) | SD |
|---------------------|--------|---|---|--------------|
| Dieta normal | EC -27 | 2517,5 | 2407,0 | $\pm 446,2$ |
| | EC -28 | 2335 | | |
| | EC -29 | 2500,1 | | |
| | EC-30 | 1629,7 | | |
| | EC-31 | 3009,7 | | |
| | EC-32 | 2449,9 | | |
| Dieta hipercalórica | EC - 1 | 1985,7 | 3283,6 | $\pm 1078,8$ |
| | EC - 2 | 3680,5 | | |
| | EC - 3 | 3441,7 | | |
| | EC - 4 | 3073,8 | | |
| | EC - 5 | 2445,5 | | |
| | EC - 6 | 5074,1 | | |

I.D: Identificador; EC: Código experimental; SD: Desviación estándar.



8.5.1 GRÁFICO 5. MEDIAS DE LAS ÁREAS DE CARDIOMIOCITOS CORRESPONDIENTES A RATONES C57BL6 MACHOS, RESPECTIVAS A CADA GRUPO EXPERIMENTAL

El gráfico muestra el área promedio de los cardiomiocitos de los dos grupos experimentales analizados. Las barras representan promedios +/- SD. $p > 0,05$ dieta hipercalórica vs dieta normal. Se realiza test de ANOVA seguido de un análisis t-Student-Newman-Keuls para comparación de medias entre grupos.

Dentro del análisis de la hipertrofia cardíaca diabética se encuentra la medición perimetral de las células estructurales que componen la bomba cardíaca, los cardiomiocitos.

No se aprecia una diferencia significativa (0,057) entre la media del área de los cardiomiocitos de los ratones machos C57BL6 alimentados con una dieta hipercalórica y consumo de agua sin tratamiento vs los alimentados con dieta normal.

Preliminarmente los resultados tentativos de las áreas de los cardiomiocitos de los grupos experimentales restantes sugieren que la tendencia entre los cardiomiocitos de los grupos experimentales con tratamiento no presentaría una diferencia significativa (0,327) versus su grupo control, no así con el correspondiente a la dieta hipercalórica anteriormente nombrada. Dichos datos no pueden ser considerados por n muestral inferior al óptimo.

9. DISCUSION

En este estudio se utilizaron técnicas orientadas a revelar aspectos morfofuncionales de la hipertrofia cardiaca generada en ratones C57BL6 con diabetes mellitus tipo 2 inducida por dieta.

La cepa de ratón utilizada C57BL6 corresponde a una cepa endogámica, congénita de uso común en investigaciones. Se reconoce como una cepa que ha sido cruzada entre parientes por más de 20 generaciones, por ende, los animales de la misma cepa endogámica son considerados genéticamente idénticos(16).

Los ratones C57BL6, también llamados "C57 black 6" tienen como ventajas la estabilidad de la cepa y su fácil crianza, la mayoría de las subcepas de C57BL/6 presentan una delección genéticamente de una de las enzimas antioxidantes mitocondriales más importantes, la transhidrogenasa (gen NNT). Debido a la delección de los exones del gen que previene de manera completa la expresión de la proteína(17), haciéndose susceptible a la hiperglicemia inducida por alimentación.

Durante experimentos pilotos se utilizó la cepa Balb/C, pero resultó muy resistente a la hiperglicemia inducida por alimentación y a la administración de estreptozotocina (diabetes tipo 1), la cual resulta ser agresiva(18). Por lo que se optó utilizar la cepa actual (C57BL6).

Para un estudio óptimo se consideraron ratones machos evitando así las variaciones hormonales típicas del ciclo estral de las hembras, controlando la influencia del estrógeno sobre el metabolismo de los carbohidratos y lípidos(19).

Para que fuese un grupo representativo se determinó el n muestral mediante el test Z por medio del software Statistical Solutions, arrojando un resultado de 8 individuos por grupo, usando como parámetros de inclusión el nivel de glicemia en ayunas (sobre 150 mg/dl de glucosa plasmática). En síntesis 96 animales fueron definidos como el n muestral total, el cual se dividió en 7 grupos experimentales. La experiencia de los investigadores en este tipo de diabetes permite asumir la variabilidad intrínseca de los estudios *in vivo*, que permite obtener diferencias significativas mínimas de 8 muestras por grupo.

Se hace necesario señalar errores procedimentales que condicionaron nuestro óptimo n muestral por grupo experimental, como la falta de apetito, mutilaciones intra-grupo, error en determinación de sexo, procedimiento de anestesia y protocolos no compatibles con nuestra investigación (fijación completa del animal y/o el almacenamiento a -80°C del corazón completo). Esto obligaría a complementar los estudios sumando más individuos para investigar.

En primera instancia al analizar las glicemias obtenidas durante la eutanasia (gráfico 1) se puede observar que existe una tendencia al aumento de esta por la alimentación, la cual no es significativa (0,480).

Las glicemias obtenidas en ayuna se encuentran alteradas por falla en el seguimiento del protocolo. La falta de disponibilidad de tiempo y el extenso número de animales destinados a la investigación (96 ratones C57BL6 machos), influyeron en la alimentación y mantenimiento de los murinos, donde no se puede asegurar si en cada jaula se hizo retiro de los pocillos con restos de pellet y/o se realizó limpieza a la hora correspondiente. Cómo los ratones poseían acceso libre a la alimentación e hidratación no se puede asegurar que los datos registrados correspondan a una glicemia en ayuna.

Resultados previos determinaron efectos de daño renal en los grupos experimentales. Por lo que estos estudios serán complementados con análisis posteriores de insulinemia y análisis de páncreas endocrino.

Entre las técnicas utilizadas para el análisis de la información se encuentran variables morfológicas como el peso corporal (g) (gráfico 2) que indicó efectividad de la dieta hipercalórica que se les administró a ratones C57BL6. De igual forma la dieta hipocalórica también generó aumento de peso corporal de su grupo experimental.

Se observaron otros parámetros claves como el peso del corazón (mg) y largo de tibia (mm), relacionándose entre sí por medio de la aplicación de razones matemáticas que direccionan la investigación hacia la presencia de un aumento del volumen total del órgano en estudio.

De acuerdo a los resultados no se observa la existencia de un incremento significativo del peso del corazón entre los grupos experimentales sin tratamiento: dieta normal, dieta hipocalórica y dieta hipercalórica (gráfico 4).

Con el fin de evaluar la hipertrofia de los cardiomiocitos, se sometieron distintas fotografías de los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina al programa imageJ®, donde se obtuvo el área de cada célula y el promedio por grupo experimental. No se observó diferencia significativa de los conjuntos de áreas correspondientes a los grupos experimentales con dieta normal e hipercalórica (gráfico 5). Al mismo tiempo, no es posible comparar los resultados con la dieta hipocalórica por falta de muestras.

Dicho procedimiento fue realizado a todos los grupos experimentales, con y sin tratamiento. En la figura 4, se observa una disposición disgregada de los cardiomiocitos, lo que se asocia a una inclusión deficiente de la muestra impidiendo que el Paraplast rellene

de manera óptima los espacios internos del órgano, por lo que al momento del montaje los tejidos, permanecen levemente fijados al portaobjetos, muchos de los cortes faltantes se desprendieron de su soporte, interfiriendo en su análisis y ausencia de resultados.

Para la administración del tratamiento y evaluar su efecto sobre la hipertrofia cardíaca diabética, la elección de los solventes se hizo con el propósito de obtener los extractos de mayor actividad y rendimiento en función de la polaridad como alcaloides, flavonoides y quinonas; y separarlos de otros no polares como esteroides y carotenoides. En síntesis, el uso de estos 3 solventes fue necesario, puesto que al ser ensayos pioneros no es de nuestro conocimiento la naturaleza química de los principios activos hipoglicemiantes previamente testeados y que originan el protocolo de trabajo. En la literatura abundan ejemplos en que se identifican propiedades a los extractos de la misma planta, pero obtenidos con solventes de polaridades distintas(20). Los extractos fueron reconstituidos en el vehículo Tween 20 al 12% en suero fisiológico.

Analizando las medias de los pesos corporales finales (PCF) de los ratones con tratamiento (gráfico 2), se apreció un aumento significativo del peso corporal de los ratones que consumieron agua con extracto de *A. compacta* suspendido en éter y diclorometano, en comparación a su grupo control (Dieta hipercalórica + tween 20).

No obstante, la razón entre los pesos corazón (mg) y peso corporal (g) de los ratones solo indicó una diferencia significativa por parte de la administración por vía enteral de extracto de *A. compacta* suspendida en metanol con su grupo experimental control (dieta hipercalórica + Tween 20) (gráfico 3), puesto que por cada gramo de peso corporal, los corazones presentan una diferencia positiva aproximada de 2,16 mg. Caso contrario ocurre con el resto de los grupos experimentales bajo tratamiento, donde no se observó diferencia significativa (0,055).

Nuestros resultados se sustentan bajo la premisa que la hipertrofia de la bomba cardíaca a modo de compensación al daño generado por la diabetes tipo 2 generará un aumento del volumen del órgano, por lo que se comparó el peso del corazón de cada ratón con el largo de la tibia (gráfico 4), evitando así información no atingente a la variable que se quiere cuantificar por el sesgo que podría generar el aumento de peso total del animal por la dieta implementada.

Al integrarse con el gráfico 3 la información obtenida, sugiere que existe un aumento significativo positivo del conjunto experimental con tratamiento. Sin embargo, la razón del peso corazón (mg) por g de peso corporal se mantiene semejante a la del grupo control (dieta hipercalórica + Tween 20). Por lo que se evidencia que el tratamiento de extracto de *A. compacta* suspendida en metanol generó una evidente hipertrofia del músculo cardíaco.

La hipertrofia cardíaca se define como un aumento anormal de la masa cardíaca que se diferencia a nivel funcional, mecánico, histológico y molecular del crecimiento embriogénico y postnatal normal del corazón(21).

No es posible asociar el efecto del solvente como factor de la hipertrofia cardíaca detectada, ya que los extractos fueron liofilizados antes de su uso.

Por protocolo experimental se puede asociar como factor de hipertrofia cardíaca el crecimiento intrauterino retardado. Estudios han indicado que el aumento del peso del corazón, la alteración de la expresión de genes como la alfa actina cardíaca, la ciclina G1, la histamina y la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa se generarían en respuesta a una restricción significativa de nutrientes(22).

Sin embargo, otros autores como Kawamura y colaboradores demostraron la ausencia de hipertrofia cardiaca atribuida a la presencia en el miocardio de factores protectores que suprimen el remodelamiento cardiaco durante la adolescencia (altos niveles de ARNm para el Péptido natriurético atrial y cerebral), evitando así la aparición de hipertrofia y fibrosis cardiaca(23).

Ensayos indican que la presencia de DMT2 aumentó el riesgo de hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) en aproximadamente 1.5 veces, y su posible relación con la obesidad central. La HVI es un factor de riesgo importante para la fibrilación auricular, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica(24,25).

La insuficiencia cardiaca es la incapacidad del corazón para bombear la suficiente cantidad de sangre para satisfacer las necesidades del organismo. Las situaciones patológicas que destacan los cambios sobre el corazón son la *sobrecarga de volumen* y la *sobrecarga de presión*, que generan respectivamente una disminución de la contractilidad y de la distensibilidad, provocando la hipertrofia cardiaca(26).

Hay otros efectos que podrían evaluarse con las técnicas adecuadas, la hipertrofia concéntrica fisiológicamente se relaciona con la elongación del sarcómero secundaria a la sobrecarga miocárdica. Uno de los primeros cambios que se observan es el aumento de las mitocondrias y paralelamente de la masa de las miofibrillas. Llega un momento en el que la relación entre el número de mitocondrias y la masa miofibrilar se hace insuficiente, y se produce el deterioro de la función miocárdica(27). Sin embargo, esto no se pudo evaluar en nuestro modelo, ya que para la obtención de muestra se tuvo que fraccionar el corazón.

El tipo de hipertrofia varía según las características de la sobrecarga ventricular, una hipertrofia de tipo excéntrica se genera por sobrecarga de volumen y encontramos un aumento de miofibrillas “en serie”. Lo que primero se observa es un

aumento del volumen diastólico, con un aumento del volumen de eyección, y posteriormente se establece la hipertrofia de tipo excéntrico(26).

Como se mencionó con anterioridad por el tipo de muestra que utilizamos para el estudio, se necesitarán de más datos para caracterizar la morfometría cardiaca y poder definir el tipo de hipertrofia. Entre estos, volumen del corazón (ml), mediciones del corazón de tres ejes: longitudinal (mm), transverso (mm) y sagital (mm)(28).

Finalmente los resultados representan un intento pionero para determinar los efectos de *A. compacta* en el daño cardiaco causado por un estado diabético, puesto que asociado al tema que nos convoca solo se tiene conocimiento de su actividad antihiperlipémica el cual se encuentra reconocido en el Listado de medicamentos herbarios tradicionales materializado mediante la Resolución N° 548 exenta de 27 de julio de 2009 (publicada en el Diario Oficial del 08.09.09) por el Gobierno de Chile(29).

Apoyando desde un sustento científico las costumbres ancestrales referidas a la medicina alternativa basada en este caso en el empleo de Llareta por parte de la población andina.

10. CONCLUSION

1. Se observó un aumento de los pesos corporales finales (PCF) de todos los ratones en comparación al grupo control alimentado con dieta normal.
2. Los ratones con tratamiento de hidratación vía enteral con extracto de *A. compacta* disuelta en éter y DCM presentaron un aumento significativo del peso final en comparación a su grupo control (dieta hipercalórica + tween 20).
3. Todos los ratones aumentaron de peso con la dieta sin afectar el tamaño del corazón, ya que se encuentran en razón a sus tibias, a excepción del grupo experimental con tratamiento de extracto de *A. compacta* reconstituida en metanol que presenta una diferencia significativa con respecto a su control (dieta hipercalórica + tween 20).
4. No se aprecia una diferencia significativa ($p=0,057$) entre la media del área de los cardiomiocitos de los ratones machos C57BL6 alimentados con una dieta hipercalórica más consumo de agua sin tratamiento vs los alimentados con dieta normal.
5. Preliminarmente los resultados tentativos de las áreas de los cardiomiocitos del conjunto experimental con tratamiento sugieren que la tendencia entre los cardiomiocitos no presentarían una diferencia significativa ($p=0,327$) versus su grupo control (dieta hipercalórica + tween 20), no así con el correspondiente a la dieta hipercalórica sin tratamiento.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Wickens G. Llaretta (*Azorella compacta*, Umbelliferae): A Review. 1995;49(2):207-212.
2. Fuentes NL, Sagua H, Morales G, et al. Experimental antihyperglycemic effect of diterpenoids of llaretta *Azorella compacta* (umbelliferae) phil in rats. *Phyther Res*. 2005;19(8):713-716. doi:10.1002/ptr.1740
3. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes. *Oms*. 2016:1-84. <http://www.who.int/diabetes/global-report/es/>.
4. *Ματινα*. sin titulo. *Αγαη*. 2019;8(5):55.
5. Alegría Ezquerro E, Castellano Vázquez JM, Alegría Barrero A. Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Rev Española Cardiol*. 2008;61(7):752-764. doi:10.1157/13123996
6. Salud OM de la. Informe Mundial de la diabetes. *Resum orientación*. 2016:4. <http://www.idf.org/node/26452?language=es>.
7. Rodolfo DR, 11 LM. Síndrome Metabólico Y Diabetes Metabolic Syndrome and Diabetes. *Rev Med Clin Condes*. 2014;25(1):47-52. https://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF_revista_médica/2014/1_Enero/8-Dr.Lahsen.pdf.
8. Personalizados S, Analytics S, Analytics S. Revista Uruguay de Cardiología Cardiomiopatía diabética Diabetic cardiomyopathy. 2018:1-16.
9. Wang CCL. Diabetes and Cardiovascular Disease: Changing the Focus from Glycemic Control to Improving Long-Term Survival Comparison of Outcomes in Treated With Versus Without Insulin + Heart Failure With Comparison of Long-Term Survival Benefits With Cardiac Resynchronization Therapy in Patients With Mild Heart Failure Ventricular Mass and Remodeling in Patients With Aortic Stenosis Before and After Outcomes in Patients with Diabetes Mellitus According to Insulin Treatment After Generation Drug-Eluting Stent Comparison of Survival After In- Hospital Cardiac Arrest in. 2019;121(12):1-2.
10. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2014;57(4):660-671. doi:10.1007/s00125-014-3171-6
11. Wang Z V., Hill JA. Diabetic cardiomyopathy: Catabolism driving metabolism. *Circulation*. 2015;131(9):771-773. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015357
12. Search A, Europe A, Europe J. Pharmaco-toxicological study of diterpenoids. 2019:1-2. doi:10.1016/S0968-0896(02)00645-4
13. Estrés Como Respuesta A EL. Sistema de Información Científica. *Int J Dev Educ Psychol*.

- 2006;1(1):37-48. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=349832311003>.
14. DIO Rodent Purified Diet w / 45 % Energy From Fat - Red N U T R I T I O N A L P R O F I L E 1. 2014:2014.
 15. Diet S, Acid A, Acid G. DIO Rodent Purified Diet w / 60 % Energy From Fat - Blue. 2017:5800.
 16. States U. Ratonos y ratas de laboratorio. 2019.
 17. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL / 6J. 2019;55(7):16804088. doi:10.2337/db06-0358
 18. Veeranjanyulu A. 22/7/2019 Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 diabetes mellitus: A glance DK Arulmozhi , A Veeranjanyulu , SL Bodhankar - India.... 2019;(4):1-11.
 19. Franco Y, Mendoza-fernández V, Lemini C. Mecanismos de acción de los efectos protectores de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. 2003;46(3):101-108.
 20. Iniciar sesión Métodos de investigación fitoquímica Búsqueda avanzada Título : Métodos de investigación fitoquímica Formato : 2019;(5411):256932.
 21. Intramed L. cardíaca. 2019:7-9.
 22. Rs G, Ra H, Collins K, Km A. Orígenes tempranos de la enfermedad en adultos : enfoques para investigar el epigenoma programable en humanos , primates no humanos y roedores . 2019;53(3):21-22.
 23. Fujii S. Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease . 2019;148(3):3-4. doi:10.1210/en.2006-0706
 24. Rl S, Tullio D. Association between diabetes mellitus and left ventricular hypertrophy in a multiethnic population : 2019;101(12):8-9. doi:10.1016/j.amjcard.2008.02.082
 25. Hypertrophy LV, Risk C, In F, Patients H. HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN EL PACIENTE LEFT VENTRICULAR HIPERTROPHY AND CARDIOVASCULAR RISK FACTOR IN. 2012;23(6):707-714.
 26. Ennis IL, Yeves M. FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTROFIA CARDÍACA : HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA Patológica vs fisiológica.
 27. Hemodinamica R. 3.1. Hipertrofia cardíaca. 2019:12-13.
 28. Issn O. MediSur Morfometría cardíaca en ratas con crecimiento intrauterino retardado Heart Morphometry in Rats with Intrauterine Growth. 2019:1-8.

29. Erazo, A. 2009. Listado de Medicamentos Herbarios Tradicionales. Ministerio de Salud. Chile. disponible en:
https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=1005970&fbclid=IwAR2NE1TF7-ZCWR54O05B71RULS_wvqzthArDoveVGLysYE49BdsRo5hKnNA