

Ultraestructura muscular y stress crónico en conejos

L. GONZÁLEZ NÚÑEZ, V. COLLAZO CASTELLS, J. G. SANABRIA NEGRÍN
Y G. LEAL OLIVA

*Dpto. de Anatomía Patológica, Hospital R. González Coro, Fac. de
Estomatología y Centro Nacional de Investigaciones Científicas*

Recibido: 2 de julio de 1982

ABSTRACT. An ultrastructural study of cheek mucosa of electric stimulated rabbits through a plantar electrical shock has been made. Stimuli were given during 40, 60, 80 and 100 days. Samples taken these days showed mitochondrial alterations: swelling, cristis disruption, myelin-like bodies, disruption of the external membrane. The alterations were encountered to be time related, and inversely proportional to the amount of electrical energy received by animals.

RESUMEN. Se realizó el estudio ultraestructural del músculo del carrillo de conejos sometidos a stress crónico mediante choque eléctrico plantar sin posibilidad de escape y de sus respectivos controles en períodos durante 40, 60 80 y 100 días. Se encontraron daños mitocondriales dados por tumefacción, ruptura de crestas, formación de cuerpos de mielina y ruptura de la membrana externa. Se observó dechiscencia de miofilamentos. Estas alteraciones fueron más severas en el decursar del tiempo de estimulación eléctrica e inversamente proporcionales a la cantidad de energía eléctrica suministrada.

INTRODUCCION

Actualmente existe marcado interés en identificar los mecanismos de enfermedad ocasionados por Stress¹ y numerosos trabajos relacionados con la cavidad bucal han profundizado en el efecto que produce el Stress crónico sobre los tejidos duros y blandos²⁻⁵. Mediante estudios morfológicos se ha asociado la enfermedad a daños subcelulares⁶⁻⁸.

Teniendo en cuenta el creciente número de entidades morbosas bucales asociadas a Stress, de las cuales se señalan agentes precipitadores o facilitadores sin conocerse su papel directo en la patología referida⁹⁻¹³, nos hemos propuesto un modelo de Stress crónico experimental en el conejo, estudiar los cambios ultraestructurales del músculo del carrillo.

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron muestras del tercio posterior del carrillo, de conejos sometidos a choque eléctrico plantar sin posibilidad de escape, estimulados durante 40, 60, 80 y 100 días y de sus respectivos controles sin estimular.

El modelo experimental se estructuró de manera que todos los grupos de animales, proporcionalmente recibieron una cantidad igual de energía eléctrica, así, los animales tratados durante 40 días fueron los que recibieron una mayor exposición a estímulo. Para más detalles revisar las citas ^{14,15}.

Los fragmentos tisulares fueron fijados en glutaraldehído 3.2% en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2, post-fijados en tetraóxido de osmio al 2% en el mismo tampón, deshidratados en concentraciones crecientes de etanol e incluidos en Epon 812¹⁶.

Se realizaron cortes ultrafinos en el ultramicrotomo LKB Ultratome III.

Los cortes obtenidos fueron post-contrastados con acetato de uranilo acuoso e hidróxido de plomo¹⁷ y observados en un microscopio electrónico Hitachi HU-11A.

RESULTADOS

Las fibras musculares de los animales controles se caracterizan por presentar los patrones ya establecidos en la literatura^{18,19}. Las sarcómeras, cortadas longitudinalmente, dejan ver sus componentes (Fig. 1). Las mitocondrias localizadas entre ellas y hacia la periferia de la fibra muscular son abundantes y muestran configuración ortodoxa (Fig. 1a)^{20,21}. El retículo endoplasmático liso ocupa su disposición característica, relacionado con las sarcómeras.

En los animales estimulados durante 40 días, solamente se observaron mitocondrias: las mitocondrias muestran una matriz más densa y son más alargadas y estrechas que las del músculo control (Fig. 2). Las miofibrillas y miofilamentos no muestran alteraciones. En el sarcoplasma que queda entre las miofibrillas pueden verse algunas estructuras membranosas electrón transparentes, de aspecto vesicular.

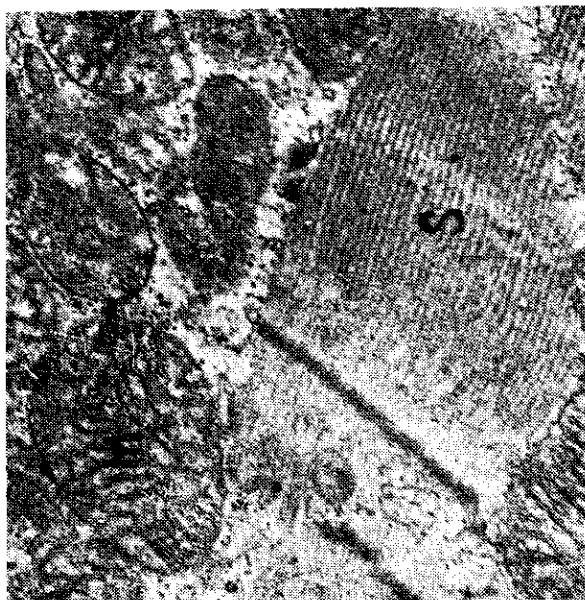
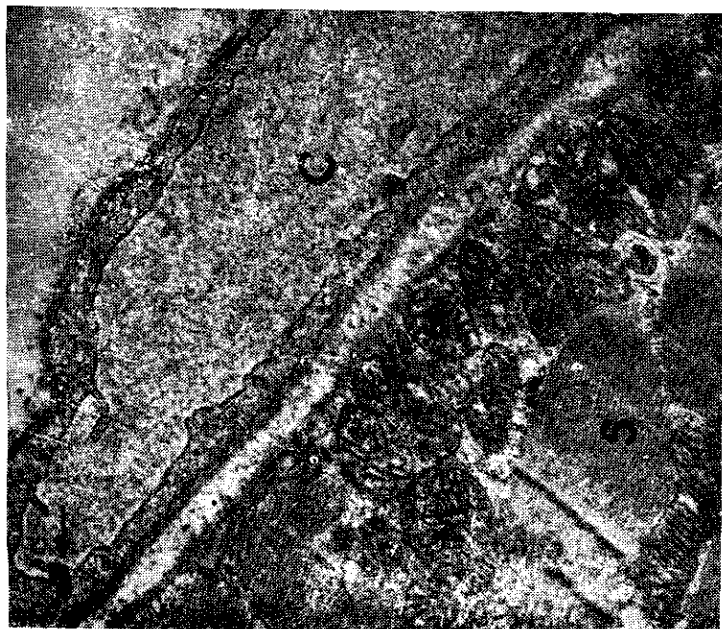


Fig 1. Micrografía electrónica de músculo esquelético de conejo control. (C) luz capilar. Unión intercelular con desmosoma (flecha). La pared del vaso está repleta del complejo microvesicular característico de los capilares a ambos lados de la misma y muestra vesículas en el espesor de la pared. La luz muestra plasma sanguíneo. Observe fragmento de miocito, (M) mitocondrias, (S) sarcómeros, 22000X. Fig. 1a. Micrografía a mayor aumento de la Fig. 1. Las mitocondrias (M) muestran su morfología ortodoxa. Las sarcómeros (S) dejan ver sus componentes filamentosos de actina y miosina. Se detecta el escaso espacio entre las sarcómeros y el ordenamiento regular de las mismas. 44000 X.



Fig. 2. Músculo esquelético de conejo estimulado durante 40 días. Las mitocondrias muestran matriz densa a los electrones (M). Los espacios entre sarcómeras están dilatados. Aparecen estructuras multimembranosas vesiculares en el espacio intercelular (flecha) 48000 X.

A los 60 días de estimulación las fibras musculares presentan una alteración mitocondrial que consiste en destrucción de las crestas, ruptura de la membrana externa (Fig. 3) y cuerpos de mielina en formación en algunas mitocondrias. La forma mitocondrial varía, son pleomorfas y están tumefactas (Fig. 4). En ocasiones parece como si existiera fusión o división mitocondrial y se observa que uno de sus componentes muestra características normales, mientras la otra parte de la mitocondria está completamente dañada. Ya en este tiempo comienza a observarse (Fig. 4) dehiscencia de miofilamentos dentro de algunas sarcómeras.

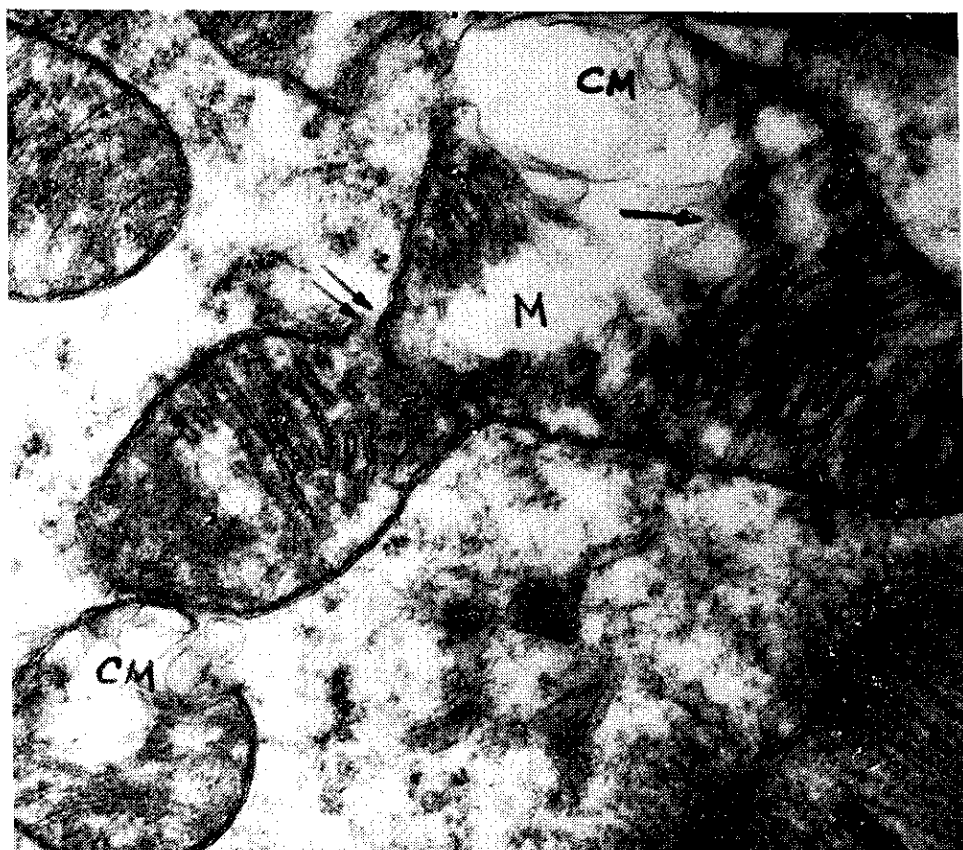


Fig. 3. Músculo esquelético de conejo estimulado durante 60 días. Las mitocondrias (M) muestran ruptura de crestas (flecha) y de la membrana externa (doble flecha). Observe la dilatación mitocondrial y esbozos de cuerpos mielínicos intramitocondriales (CM) 5400x.

A los 80 días de estimulación, la proporción de mitocondrias dañadas es 1,5 veces superior que a los 60 días. Se observan diferentes estadios de degeneración mitocondrial con tumefacción de la matriz, destrucción de crestas y hasta destrucción de su membrana externa (Fig. 5). El fenómeno de la fusión mitocondrial fue observado frecuentemente (Fig. 6).



Fig. 4. Músculo esquelético de conejo estimulado durante 60 días. Observe el pleomorfismo mitocondrial, los cuerpos de mielina (CM) y la ruptura de crestas (flecha). Algunas mitocondrias muestran adhesión de sus membranas externas (M_1 , M_2 , M_3 , M_4). Se destaca como en M una parte de ella muestra signos degenerativos, mientras la otra no. Los miofilamentos comienzan a presentar cierto grado de dehiscencia (flecha). 33000 X.

Las miofibrillas y las mitocondrias se encuentran muy superiores unas de otras, indicando edema intracelular. Los componentes de las sarcómeros no se distinguen bien.

A los 100 días de estimulación persisten las alteraciones mitocondriales (Fig. 7). La deshincencia de miofilamentos es notoria (Fig. 8) y existen zonas con pérdida total de las mismas. En estas zonas, aparecen unos cuerpos densos (osmiófilos) pleomorfos, homogéneos (Fig. 9) que recuerdan a inclusiones lipídicas.

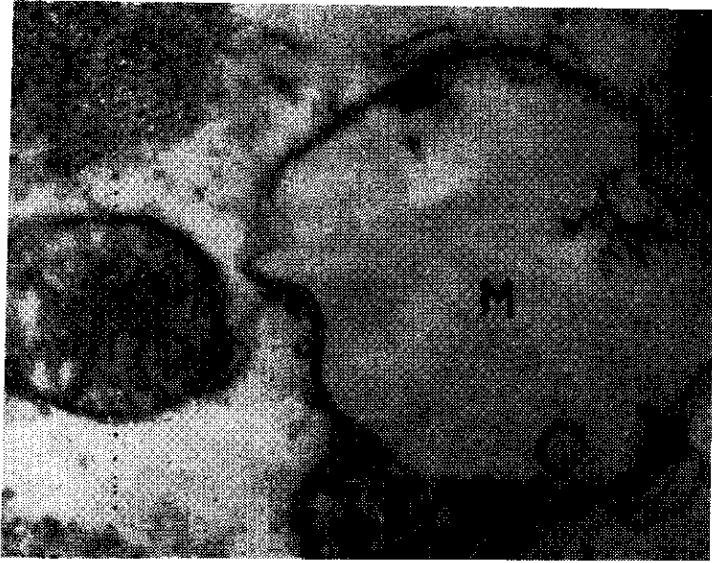


Fig. 5. Músculo esquelético de conejo estimulado durante 80 días. Observe el alto grado de tumefacción intramitocondrial (M) con destrucción de crestas y de la membrana externa. 80000 X.

Los vasos sanguíneos localizados entre las fibras musculares, fundamentalmente capilares, muestran una apariencia ultraestructural normal. Las uniones intercelulares de las células endoteliales no muestran alteraciones.

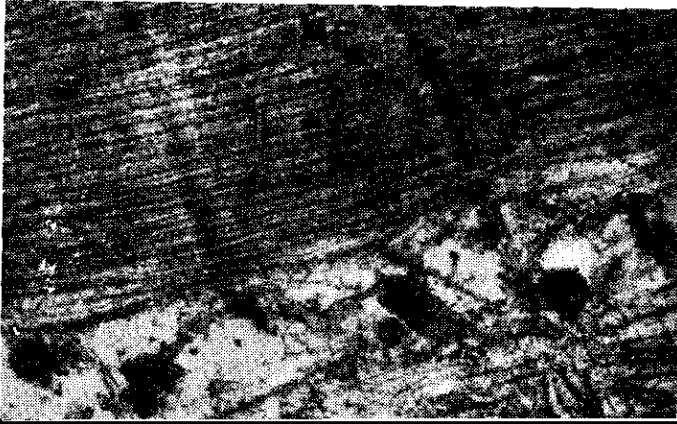


Fig. 6. Músculo esquelético de conejo estimulado durante 80 días. Observe la intensa destrucción mitocondrial (M) y la fusión de algunas mitocondrias (M₁, M₂). Se destaca el edema intracelular. 36000 X.

Estos daños mitocondriales se relacionan con alteraciones histoquímicas de la NAD diaforasa²².



Fig. 7. Músculo esquelético de conejo estimulado durante 100 días. Mitocondria que muestra cambios degenerativos (M). 96000 X.



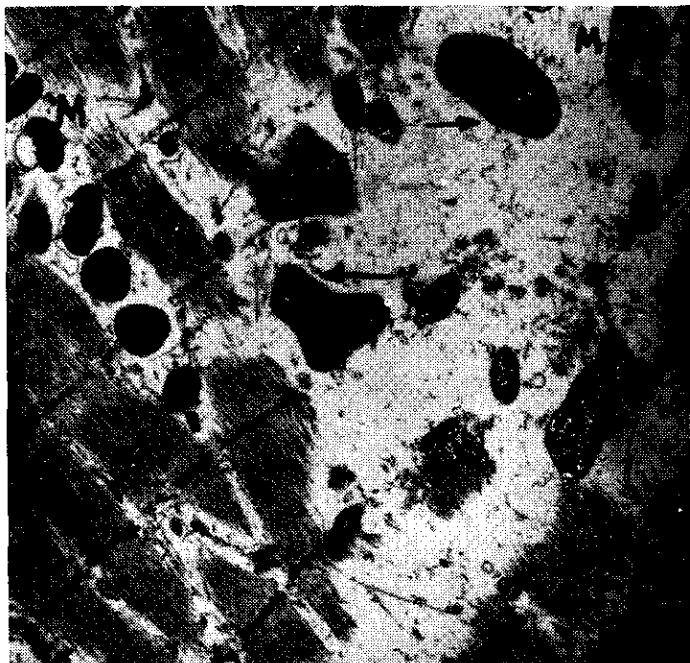


Fig. 9. Músculo esquelético de conejo estimulado durante 100 días. Zona con pérdida de miofilamentos. Observe cuerpos densos, osmiófilos de gran talla, similares a inclusiones lipídicas (flecha). Algunas mitocondrias muestran también alteraciones (M), 16000 X.

Alteraciones mitocondriales similares a las detectadas en nuestro trabajo han sido observadas en el músculo cardíaco de ratas sometidas a dietas ricas en colesterol²³ e interpretadas como cambios degenerativos. Otros agentes como las radiaciones de cobalto²⁴ y la inactividad física producen efectos mitocondriales similares²⁵.

La presencia de figuras mielínicas mitocondriales se ha asociado a cambios degenerativos de estos organelos en el músculo esquelético²⁶ y en macrófagos infectados con *M. leprae*²⁷. Si a esto añadimos los resultados planteados por Manima⁸ a nivel de neuronas corticales en ratas sometidas a neurosis experimental, estamos en posibilidad de plantear que los cambios mitocondriales observados en nuestro trabajo constituyen reflejos del proceso degenerativo en los conejos bajo stress crónico plantar.

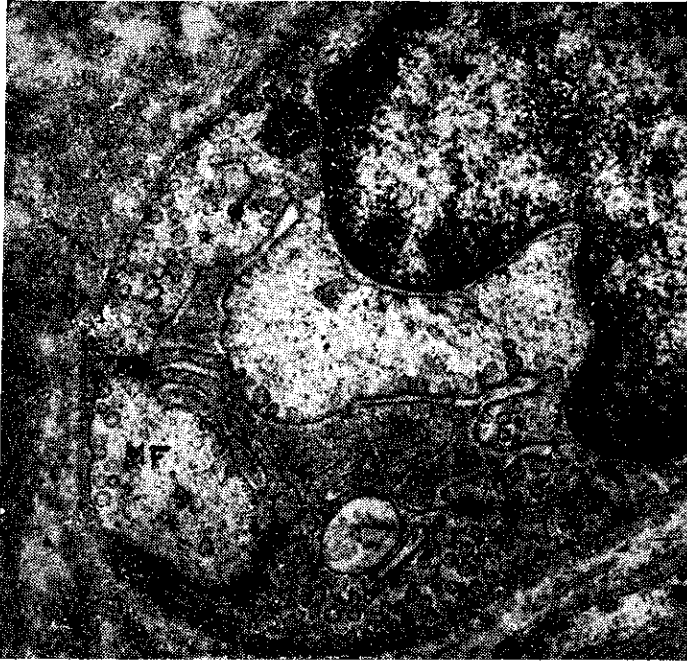


Fig. 10. Capilar sanguíneo de conejo estimulado durante 100 días. Se destaca la región de citoplasma cercana al núcleo y la correspondiente del otro lado de la luz muestran ausencia casi total de las vesículas membranosas en comparación con el resto de la pared. En estas zonas aparecen ribosomas libres y unidos membrana y microfilamentos (MF). 33000 X.

Debido a que el estímulo eléctrico no se aplicó in situ en los animales, nos obliga a plantearnos fenómenos de difusión del impulso generado a nivel de las patas traseras hasta el carrillo. El stress en cualquiera de sus formas actúa a través de la estimulación sinérgica de dos circuitos cerebro-viscerales diferentes, y los reflejos desencadenados por las situaciones de stress, al hacerse crónicos, pueden producir alteraciones de membrana a diferentes niveles, que al modificar los potenciales de reposo pueden inducir alteraciones iónicas de envergadura variable. Estas alteraciones pueden conducir a cambios de pH en diferentes organelos celulares, fundamentalmente la mitocondria que es un organito lábil y sensible a las alteraciones iónicas²⁹, los que además generan alteraciones

osmolares importantes con la consiguiente entrada de líquido que hincha el organelo. El acúmulo progresivo de líquido conlleva a la destrucción parcial del mismo²¹ como hemos observado en nuestra experiencia.

La alteración mitocondrial afecta de manera importante el metabolismo celular y conduce a que los mecanismos energéticos necesarios para el ensamblaje y funcionamiento de los filamentos actomiosínicos en las sarcómeras se vea afectado. Ello puede traducirse en las alteraciones observadas en los filamentos, las dilataciones del retículo sarcoplasmático y la aparición de vesículas membranosas aparentemente libres. Resultados similares han sido reportados en otras patologías del miocardio³⁰.

De lo anteriormente expuesto podemos inferir:

El Stress plantar eléctrico con conejos produce fenómenos celulares a distancia que se manifiestan en los miocitos del carrillo como procesos degenerativos mitocondriales y de los miofilamentos. Las afectaciones aparecen en diferentes tipos de modelos de stress crónico y todo se comporta como si las acciones negativas del stress resultaran inversamente proporcionales al tiempo de estímulo diario aplicado y directamente proporcionales a la cantidad total en días, durante la cual los animales recibieron el castigo eléctrico.

RECONOCIMIENTOS

A la Ca. técnica Olga Arteaga por la preparación de las micografías.

REFERENCIAS

1. BOWENS K. S. AND KELLY P. Actualidad en Psicología. Información temática, 2, 1980.
2. HARRIS N. *American J. Physiol.* 476, 1980.
3. THOMAS J. AND MANEO B. S. DE. *Journal Periodontology*, 1976.
4. FRIED K. H. *Angle Orthod.* 46, 77, 1976.
5. RAKLENGO A. *Bull. Eksp. Biol. Med.* 88, 107, 1979.
6. BASSETT. J. R. *Br. J. Pharmacol.* 59, 471, 1977.
7. PERÓN I. V. L. *Bull. Eksp. Biol. Med.* 81, 625, 1976.
8. MANIMA A. A. Bases ultraestructurales y actividad cerebral. Ed. Medicina Leningrado, 1976.

9. SHAFER WILLIAM B. S. Oral Pathology. Third Edition, 332, Ed. Saunders Company, 1974.
10. LÓPEZ ACEVEDO C. Manual de Patología Oral. 1ra Edición. Colección Aula. Vol. 16, 375-376, Edit. Univ. Guatemala 1975.
11. BENÍTEZ B. Tesis de Especialistas de 1er grado en Parodontología. Biblioteca Fac. Estomatología 1-8, 1975.
12. TIECKE R. W. Oral Pathology. 440-442 Ed. Mc Graw-Hill, Book Company 1965.
13. TIECKE R. M. Fisiopatología bucal. 128, Ed. Interamericana S.A, 1960.
14. Sánchez Serrano y Lavín Palmieri. Estudio de los lípidos séricos y la actividad de lipasa de lipoproteína en ratas sometidas a shock eléctrico. Comunicación personal, 1981.
15. CORDOVA CASTRO A. Algunos aspectos fisiológicos, teóricos y prácticos en psiquiatría. Ed. C-T. La Habana., 165-175, 1979.
16. LUFT J. K. *J. Byophys. Biochem. Cytol.* 9, 409, 1961.
17. REYNOLDS E. S. *J. Cell. Biol.* 17, 208, 1963.
18. HAM A. W. AND CORNACK D. H. Histology, 540-564, 8va Ed. 1979.
19. ELISEIEV V. G., AFANASIEV Y. I. Y KOTOVSKI E. F. Atlas de la Estructura Microscópica y Ultramicroscópica de las células, tejidos y órganos. Editorial MIR, Moscú, 126-138, 1974.
20. ROBERTIS E. D. P. DE. Biología Celular 171-197, 415-427, 8va. edición, 1972.
21. NOVIKOFF A. B. AND HOLTZMAN E. Cells and Organells, 110-127 2nd edition, 1976.
22. COLLAZO CASTELLS V. Trabajo de Tesis en preparación, 1982.
23. MELAX H. AND LESSON T. S. *J. Mol. and Cel. Cardiol.* 7, 195, 1975.
24. NOVI A M. *Virchows Archiv. Abteilung B. Zellpathologie*, 2, 24, 1969.
25. DÍAZ B. Y DOVALE E. *Revista de Ciencias Biológicas*, 13, 139, 1982.
26. SACKTOR B. AND SHIMADA Y. *J. Cell Biology.* 52, 465, 1972.
27. SANABRIA J. G., SMIRNOVA T., KOURÍ J., DÍAZ ALMEIDA J. *J.M.E.I.* 1, 46, 1979.
28. HECHT M. Intermosz Symposium, 1975.
29. DÍAZ B. *Revista de Ciencias Biológicas* (en publicación).
30. ENTMAN M. L., ALLEN J. C. AND SCHWARTZ A. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 4, 435, 1972.