PATOLOGIA TIMICA Y ESPLENICA EN RATAS DEFICIENTES EN FACTORES LIPOTROPICOS[1]

Ibis Arienti de García, José D. Carballido y Alberto J. Monserrat[2]

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

Si bien se han descrito alteraciones del timo o del bazo en ratas recién destetadas, alimentadas con dietas deficientes en factores lipotrópicos, no se ha podido establecer con certeza la medida en que esos trastornos se deban a la alimentación hipolipotrópica, a la disminución de la ingesta de alimento que se produce como consecuencia de la necrosis renal que presentan estos animales, o a otros factores ("stress", enfermedad renal, etc.).

El propósito de este trabajo fue estudiar secuencialmente y en correlación con las alteraciones renales, los cambios esplénicos y tímicos que ocurren en ratas recién destetadas, las que se alimentaron con dietas hipolipotrópicas. Como controles se utilizaron ratas que fueron sacrificadas el mismo día del destete, animales alimentados en forma pareada con la misma dieta suple-

Manuscrito modificado recibido: 7–8–80.

1 Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología (SECYT), Buenos Aires, Argentina.

2 Miembros del Centro de Patología Experimental, II Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, José E. Uriburu 950, 1114 Buenos Aires, Argentina.

3 Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET, Buenos Aires, Argentina.

mentada con colina, y animales alimentados *ad libitum* con una dieta comercial estándar.

Los resultados obtenidos mostraron que los cambios más importantes, a nivel del timo, ocurren después del desarrollo del daño renal y consisten en disminución de peso con posible reducción de la corteza, eventual fibrosis incipiente y proliferación de macrófagos. Dado que estos cambios no se observaron en ratas alimentadas en forma pareada, no pueden atribuirse solamente a menor ingesta de alimento. Es, pues, factible que, al menos en parte sean consecutivos a la necrosis renal y al "stress" que presentaron los animales del grupo deficiente en colina. En el mismo grupo, el bazo acusó un aumento del manto a partir del 3er. día, con aumento del peso al 8o. día.

INTRODUCCION

Si se alimenta a ratas recién destetadas con dietas deficientes en factores lipotrópicos (colina, metionina, B_{12} y ácido fólico) es factible inducir un cuadro de insuficiencia renal aguda cuyo substrato morfológico varía desde la necrosis tubular aguda focal hasta la necrosis cortical masiva (1-3).

Estudios previos han descrito involución tímica en animales alimentados con dietas hipolipotrópicas (4-6) y cambios variables a nivel del bazo (4, 5). Por otra parte, también se ha descrito involución tímica en la desnutrición (7) y se conoce la involución tímica y esplénica consecutiva al "stress" (8).

Trabajos previos sobre alteraciones esplénicas y tímicas en casos de deficiencia de colina, no han contemplado el desarrollo de estudios secuenciales en relación con el daño renal. Tampoco se han usado controles adecuados para deslindar la influencia de la ingesta de alimento, la que disminuye como consecuencia del daño renal.

El propósito del presente trabajo fue así, estudiar secuencialmente las alteraciones tímicas y esplénicas en relación con los cambios renales, contando para el caso con controles adecuados, a fin de determinar la influencia de la ingesta de alimento, de tal forma que nos permitiese evaluar cuáles alteraciones se deben a la deficiencia de colina *per se,* y cuáles al "stress" y/o a la menor ingesta calórica inducidos por la enfermedad renal.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas Wistar macho, recién destetadas, provenientes del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Estas fueron divididas en cuatro grupos: colina-deficiente (CD), colina-suplementado (CS), purina (P) y recién destetadas (RD). Los animales del grupo CD fueron alimentados *ad libitum* con una dieta deficiente en factores lipotrópicos (Tabla 1) usada en experimentos anteriores (3, 9, 10); los del grupo CS recibieron la misma dieta suplementada con 0.35% de cloruro de colina, y en forma pareada individual y diaria con respecto a las del grupo CD; las del grupo P consumieron una dieta

TABLA 1

COMPOSICION DE LA DIETA HIPOLIPOTROPICA
(g/100 g)

Proteína de soja[a]	20.0
Aceite hidrogenado[b]	10.0
Sucrosa	55.5
Aceite de maíz[c]	4.0
Mezcla de vitaminas (sin B_{12} ni colina)[d]	4.0
Mezcla de sales W[e]	2.0
Celulosa[f]	4.0
L-Cistina	0.5
	Kcal/100 Kcal
Hidratos de carbono	54.3
Grasas	28.8
Proteínas	16.9
Valor lipotrópico[g] mg col/100 Kcal	13.7

a Assay Protein C-1. Skidmore Enterprise, Cincinnati, Ohio, USA.
b Molinos Río de la Plata, Buenos Aires, Argentina.
c Refinerías de Maíz, Buenos Aires, Argentina.
d Vitamin fortification mixture without choline and B_{12}. Nutritional Biochemical Co. Cleveland, Ohio, USA.
e Nutr. Bioch. Co.
f Alphacell Nutr. Bioch. Co.
g Porta, E. A. y Gómez-Dumm, C. L.: *Lab. Invest., 18:* 352, 1968.

comercial[4] *ad libitum,* y por último, las del grupo RD fueron sacrificadas el mismo día del destete. Esta clasificación nos permitió contar con un grupo experimental (CD), y tres grupos control. Uno fue sacrificado el mismo día del destete (RD), otro cuya ingesta calórica era similar a la del grupo CD pero suplementado con colina (CS), y el tercero, alimentado *ad libitum* con una dieta comercial usual para animales de laboratorio (P). Las ratas de los grupos CD, CS y P fueron sacrificadas a los 3, 5 y 8 días de iniciada la experiencia. Se incluyó, asimismo, un grupo de ratas del grupo CD que murieron en el transcurso del experimento. Todos los animales tuvieron el consumo de agua *ad libitum.*

Diariamente se registró su ingesta de alimento y su peso corporal. Al finalizar los distintos períodos experimentales las ratas fueron sacrificadas con éter. Los riñones, bazo y timo fueron pesados y luego fijados en formol-calcio e incluidos en parafina, obteniéndose secciones que se sometieron a coloración con hematoxilina-eosina. De acuerdo a sus características histológicas, los riñones fueron agrupados según una clasificación propuesta previamente (9). El número de animales correspondientes a los cuatro grupos y al de los distintos períodos estudiados, se señalan en las Tablas 2 y 3, indicándose como peso corporal inicial el peso que acusaron al comenzar el experimento, y como peso final el peso de las ratas al momento del sacrificio o al de su muerte. Las comparaciones entre las medias de los distintos grupos se realizaron utilizando la prueba de "t". Las diferencias menores de 0.05 se consideraron estadísticamente significativas (11).

RESULTADOS

Los pesos corporales iniciales y finales de las ratas de los distintos grupos, así como el peso corporal máximo de aquéllas en las que el peso disminuyó antes de su sacrifio o muerte, se detallan en las Tablas 2 y 3. Como era de esperar, los animales del grupo P comieron y crecieron en forma normal. Lógicamente, la ingesta de alimento en el grupo CS fue similar a la del grupo CD si bien algo menor, hecho que ha sido observado en experimentos previos, y que explicaría el menor crecimiento corporal de estos animales (2). Las ratas del grupo CD ingirieron alimento y crecieron en for-

4 Purina, Purina, Argentina.

TABLA 2

PESO CORPORAL INICIAL Y FINAL. PESO ESPLENICO Y TIMICO (Días 0-5)

Grupo	Día	n	Peso corporal		Timo		Bazo	
			Inicial	Final	mg	mg/100g pc	mg	mg/100g pc
RD	0	10		49.25± 2.45[a] 49.9[b]	123.84±38.73 122.1	251.17±76.40 227.9	193.84± 73.02 168.8	395.95±162.39 340.2
CD	3	10	52.81±10.07 55.3	57.87±11.17 57.0	153.70±45.90 160.4	265.17±63.60 275.1	305.08±179.86 295.4	534.69±288.83 422.4
CS	3	10	51.20±15.02 56.8	55.44±15.57 62.8	137.25±68.36 144.8	234.60±67.22 216.1	374.15±164.60 405.2	650.01±180.62 670.0
CD[c]	5	6	47.12± 9.46 48.4	56.83±11.20 61.4	144.57±44.50 138.3	253.52±54.61 247.1	366.57±164.25 361.5	660.55±320.87 623.6
CD[d]	5	7	47.46± 9.55 45.9	58.33±11.98 55.0	148.00±44.68 141.2	251.76±49.70 244.1	304.96± 98.66 305.3	539.34±220.17 496.4
CS	5	13	49.42±10.50 46.3	56.12±13.35 48.2	138.87±50.64 128.7	242.99±42.74 250.6	316.90±177.49 308.1	574.36±333.31 404.8
P	5	7	53.57± 6.78 55.5	69.46± 8.67 69.5	190.46±29.55 191.8	271.79±30.74 278.3	221.71± 56.84 210.7	312.54± 50.89 290.7

a $\bar{x} \pm DE$.
b Mediana.
c CD sin necrosis renal.
d CD con necrosis renal.

TABLA 3

PESO CORPORAL INICIAL Y FINAL. PESO ESPLENICO Y TIMICO (8o. día)

Grupo		Día	n	Peso corporal		Timo		Bazo	
				Inicial	Final	mg	mg/100g pc	mg	mg/100g pc
1	CD	8	10	43.82±7.12[b]	50.78±10.43[e]	68.79±42.57	129.05±62.34	407.51±290.15	756.66±428.22
				42.2[c]	48.0	43.0	106.8	289.6	607.6
	CS	8	10	40.62±5.87	42.89± 6.51	96.85±42.06	219.19±77.93	205.35±114.83	472.63±245.53
				41.3	41.0	102.0	222.5	180.8	413.2
	P	8	8	58.29±9.85	89.05±15.68	198.29±57.60	223.95±59.90	498.15±171.08	518.31±203.93
				55.6	82.0	207.2	224.0	456.5	428.0
2	CD	8	8	52.03±4.16	62.99±11.88[g]	131.50±69.14	201.58±79.89	477.9 ±136.9	773.5 ±252.5
				53.2	*59.9*	*123.5*	*206.1*	499.5	709.6
	CS	8	8	52.45±8.01	58.69±12.11[h]	190.50±75.29	318.85±74.67	372.5 ±252.6	445.0 ±232.9
				57.0	53.5	152.0	283.5	284.0	377.2
	P	8	9	48.77±5.61	77.47±11.34	217.67±80.51	275.59±62.70	382.1 ±240.5	469.7 ±235.4
				47.9	75.0	213.0	259.4	356.0	416.4
	CD[d]		5	38.66±4.55	41.32±5.07[i]	46.96±14.95	113.44±32.40	279.64± 93.47	664.06±160.22
				37.0	40.1	45.2	126.6	264.9	660.5

a De los grupos CD, CS y P se incluyen 2 lotes de ratas de cada uno, investigados en distintos períodos (1,y 2).

b $\bar{x} \pm DE$.

c Mediana.

d Murieron 7o. u 8o. día.

		$\bar{x}$	DE	Mediana	$\bar{x}$	DE	Mediana
e	Peso corporal máximo	56.49±	9.95	54.0	5.9±0.7		6
f	Peso corporal máximo	49.00±	5.86	49.5	6.1±1.1		6
g	Peso corporal máximo	68.76±10.77		70.3	6.4±0.5		6
h	Peso corporal máximo	66.40±13.31		62.4	5.9±1.0		6
i	Peso corporal máximo	47.36±	6.61	45.5	4.8±0.5		5
		Gramos			Día		

ma adecuada hasta el 5o. día (2, 9, 12); después de éste se produjo un descenso tanto en la ingesta de alimento como en el peso corporal.

Los riñones de las ratas de los grupos CS, P y RD mostraron características normales. En las del grupo CD no se observaron índices de necrosis renal hasta el 5o. día; en este día, sin embargo, el 53.9o/o de los animales mostró necrosis tubular de grado 1.7 ± 1.2 ($\bar{x}$ ± DE). Al 8o. día el 100o/o de los animales reveló necrosis renal, siendo en un 50o/o de tipo tubular grado 3.6 ± 0.6 ($\bar{x}$ ± DE), y en 50o/o de tipo cortical grado 5.8 ± 0.8 ($\bar{x}$ ± DE). Las cinco ratas que murieron mostraron necrosis renal, siendo en una de tipo tubular grado 4 y en las cuatro restantes de tipo cortical grado 7.5 ± 0.6 ($\bar{x}$ ± DE). Las características morfológicas de los riñones con necrosis fueron similares a las descritas previamente (9-14), y se caracterizaron macroscópicamente por un aumento de tamaño con áreas de hemorragia capsulares y subcapsulares, y congestión de la corteza. Los cambios histológicos de la corteza variaron desde focos de necrosis tubular, con picnosis, cariorrexis y principalmente cariolisis, hasta necrosis cortical con necrosis tubular, glomerular y vascular.

Las características morfológicas del timo y del bazo en las ratas de los grupos RD, P, y CS coincidieron con las notificadas por otros autores (15-17) (Figs. 1 y 2). En las ratas del grupo CD el timo no mostró cambios hasta el 8o. día en que se observaron en todos los animales, imágenes de moderada reducción de la cortical, agregándose a estos cambios proliferación conectiva joven y de macrófagos en zona cortical en tres de ellos. Todos los animales que murieron acusaron reducción de la cortical y tres ratas mostraron proliferación conectiva y de macrófagos (Figs. 3 y 4). En el mismo grupo el bazo mostró un moderado aumento del manto a partir del 3er día, alteración que persistió en los días sucesivos; si bien esta modificación no fue intensa, constituyó un hallazgo constante en las ratas del grupo CD. Este cambio se observó en 33o/o de los animales al 3er día, en el 58o/o al 5o. día, en el 78o/o al 8o. día y en 100o/o de los que murieron (Figs. 5 y 6).

No se constataron diferencias entre las ratas del grupo CD y los controles en cuanto a la extensión de la metaplasia mieloide esplénica normalmente observable en animales de esta edad (16).

El peso del timo y del bazo en valores absolutos y relativos al peso corporal, se indica en las Tablas 2 y 3. Al 8o. día del estudio, comparando las ratas del grupo CD y CS se observó en las primeras

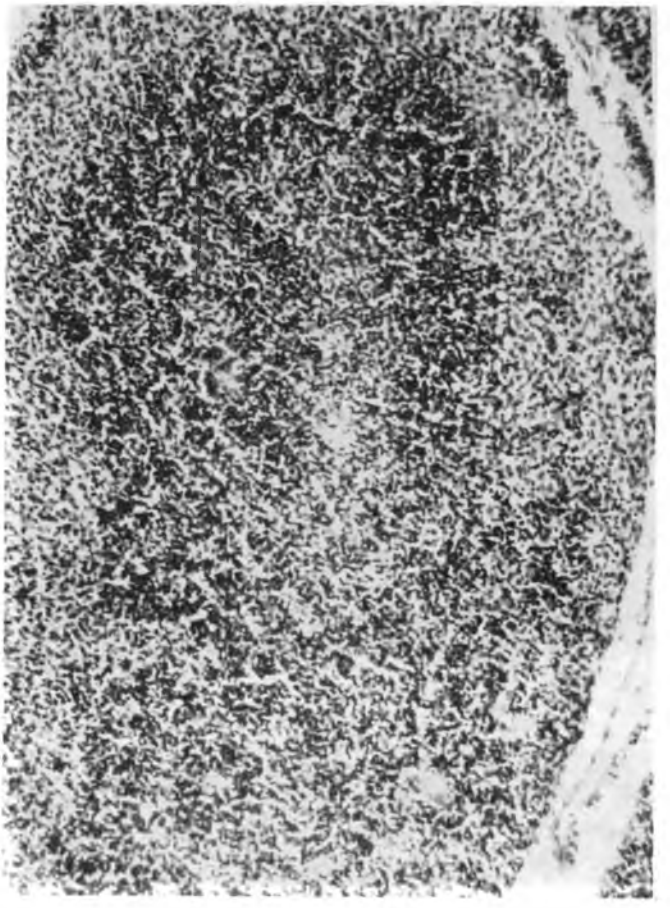

FIGURA 1

Timo. Zona cortical de ratas del grupo CS al 8o. día de iniciado el estudio (H. E. x 160)

una disminución del peso del timo y aumento ponderal del bazo. La disminución del peso del timo se acentuó en las ratas CD que murieron.

El análisis estadístico de los distintos parámetros evaluados cuantitativamente se indica en la Tabla 4.

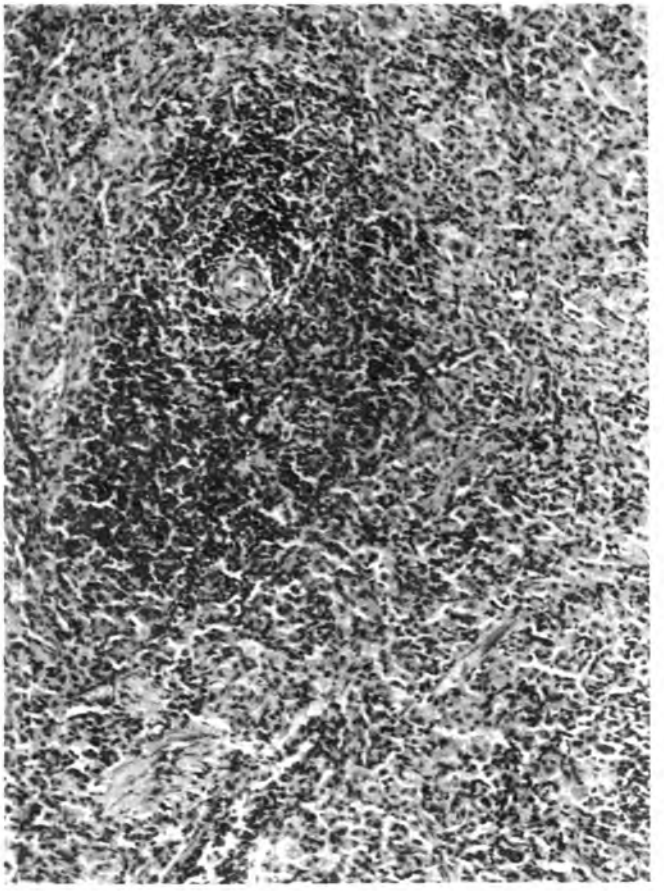

FIGURA 2

Bazo. Folículo de rata del grupo CS al 8o. día (H. E. x 160)

DISCUSION

El substrato morfológico de la insuficiencia renal aguda inducible en ratas recién destetadas mediante la administración de dietas deficientes en colina, varía desde la necrosis tubular aguda focal hasta la necrosis cortical masiva (1-3). Las características morfológicas de estas lesiones han sido estudiadas con bastante fre-

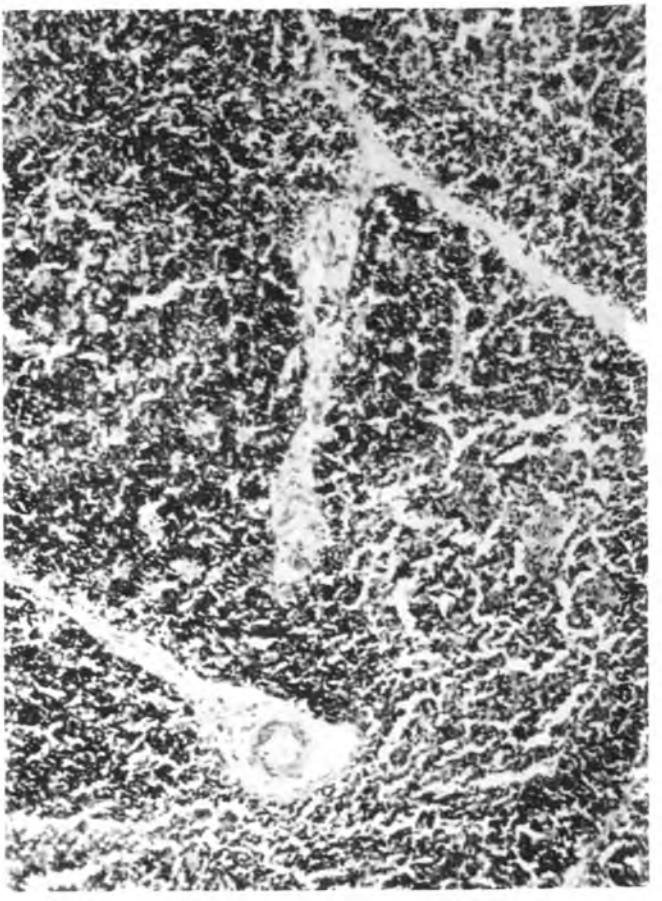

FIGURA 3

Timo. Reducción de la cortical de rata del grupo CD al 8o. día
(H. E. x 160)

cuencia. Asimismo, es sabido que como consecuencia del daño renal estos animales disminuyen la ingesta de alimento. En vista de que las alteraciones del bazo y/o del timo han sido descritas en casos de desnutrición y bajo distintos tipos de "stress" (7, 8, 18, 19), cabe preguntarse en qué medida pueden influir estos factores sobre el bazo y el timo de ratas alimentados con dietas hipolipotrópicas.

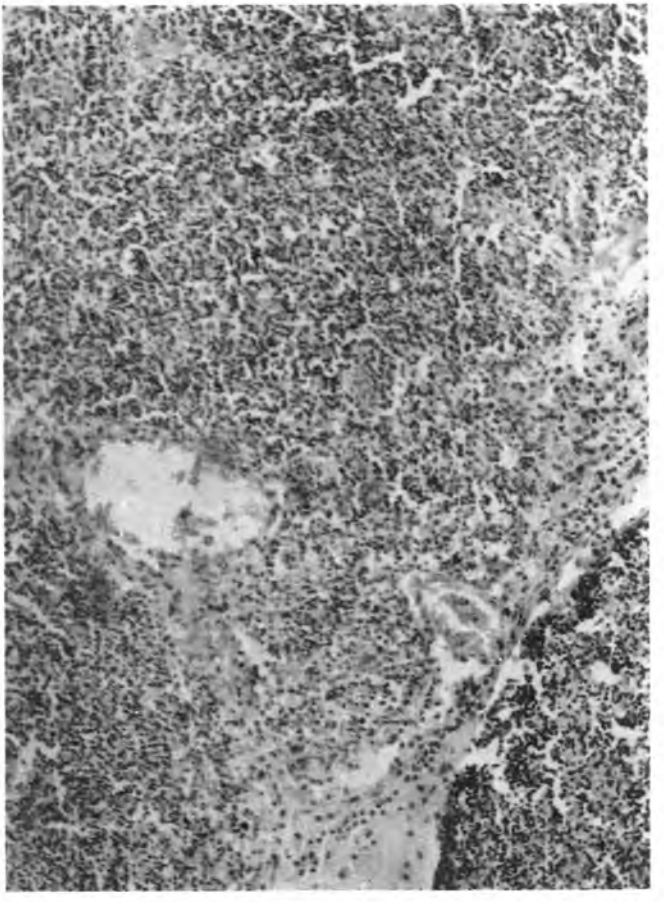

FIGURA 4

Timo. Reducción de la cortical y proliferación conectiva e infiltración mononuclear de rata del grupo CD que murió (H. E. x 160

Los estudios previos efectuados al respecto son escasos, y no han contemplado un seguimiento secuencial adecuado respecto de la patología renal, ni se ha contado con controles adecuados en lo referente a ingesta calórica. Así, Griffith y Wade (5) describen disminución del peso del timo y disminución o aumento del peso del bazo en ratas alimentadas durante 10 días con una dieta defi-

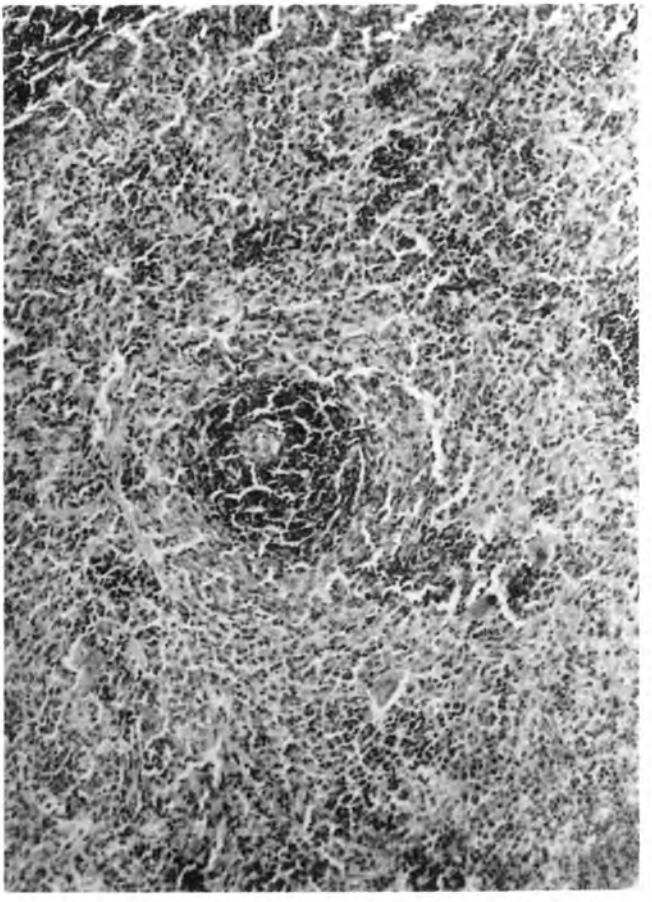

FIGURA 5

Bazo. Aumento del manto y reducción del núcleo folicular en rata del grupo CD al 8o. día (H. E. x 160)

ciente en colina. Por su parte, Engel y Salmon (4) notificaron atrofia tímica y alteraciones esplénicas variables tales como congestión o atrofia de la pulpa roja, o disminución de tamaño del bazo. Olson y Deane (6) observaron involución tímica.

En el estudio secuencial que incluyó el presente trabajo se observó que las alteraciones del timo ocurren con posterioridad al

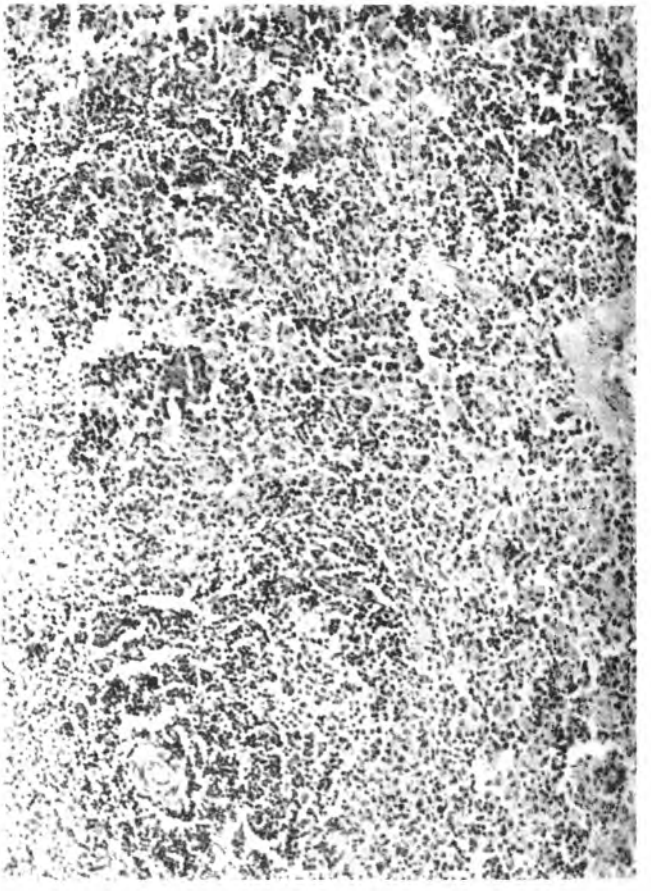

FIGURA 6

Bazo. Aumento del manto y reducción del núcleo folicular en rata del grupo CD que murió (H. E. x 160)

desarrollo de la necrosis renal, y no parecen deberse únicamente a la disminución de la ingesta calórica, dado que los cambios ponderales y morfológicos son más acentuados en los animales del grupo CD que en los del grupo CS alimentados en forma pareada. Como dijimos, las alteraciones observadas coinciden con las descritas en distintos tipos de "stress" (8). Desde el punto de vista mor-

TABLA 4

ANALISIS ESTADISTICO

Comparación	Día 3	Día 5						Día 8					
	CD vs CS	CD_c vs CD_d	CD_c vs CD_c	CD_c vs P	CD_d vs CS	CD_d vs P	CS vs P	CD vs CS	CD vs P	CS vs P	CD vs CS	CD vs P	CS vs P
									1			2	
Peso corporal inicial	N S	N S	N S	N S	N S	N S	N S	N S	<0.01	<0.001	N S	N S	N S
Peso corporal final	N S	N S	N S	<0.05	N S	N S	N S	N S	<0.001	<0.001	N S	<0.02	<0.01
Peso del timo (mg)	N S	N S	N S	N S	N S	N S	<0.02	N S	<0.001	<0.001	N S	<0.05	N S
Peso del timo (mg/100 g pc))	N S	N S	N S	N S	N S	N S	N S	<0.02	<0.01	N S	<0.01	N S	N S
Peso del bazo (mg)	N S	N S	N S	N S	N S	N S	N S	N S	N S	<0.001	N S	N S	N S
Peso del bazo (mg/100 g pc)	N S	N S	N S	<0.05	N S	<0.05	<0.02	N S	N S	N S	<0.02	<0.05	N S

CD_c = Colina- deficiente sin necrosis renal. 1 = Período 1.
CD_d = Colina-deficiente con necrosis renal. 2 = Período 2.

fológico, el bazo mostró aumento del manto a partir del 3er. día, siendo la congestión un hallazgo inconstante. El peso se encontró aumentado al 8o. día en los animales del grupo CD en relación con los del grupo CS. Sin embargo, cabe mencionar que el peso esplénico es influenciable por diversas manipulaciones técnicas en el momento de sacrificar a los animales[5].

SUMMARY

THYMUS AND SPLEEN PATHOLOGY IN RATS DEFICIENT IN LIPOTROPIC FACTORS

Although splenic and thymic changes have been described in rats fed diets deficient in lipotropic factors, it is not clear whether these changes are due to the hypolipotropic diet, to the diminished food intake induced by the renal necrosis that these animals may have or to other causes such as stress, renal disease, etc.

The purpose of this work was to study sequentially the splenic and thymic alterations in rats fed *ad libitum* a hypolipotropic diet (CD group). These changes were correlated with the renal changes. Three different control groups were used: a group of rats sacrified the same day of weaning (RD group); a group of rats fed the same diet as the CD group but supplemented with 0.35% of choline chloride, and individually and daily pair-fed to those rats in the CD leader group (CS group), and a group of rats fed *ad libitum* a commercial diet (P group).

Rats of groups CD, CS and P were killed on the 3rd, 5th and 8th day after beginning the experiment. Five animals of the CD group which died on the 7th or 8th day were also included.

The results obtained indicate that in the CD group, the most conspicuous changes in the thymus were a loss in weight with possible reduction in size of the cortex; early fibrosis and macrophage proliferation were eventually present. Since these changes were not found in the pair-fed rats (CS group), they do not seem to be only a consequence of the diminished food intake. It is possible that these changes were, at least partially, due to the renal necrosis and stress that rats in the CD group exhibited. The spleen of the CD group showed enlargement of the mantle as of the 3rd day and an increase in weight on the 8th day.

5 Machado, E. A. Comunicación personal.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la asistencia técnica prestada por Beatriz Iglesias Lobos y María Mansilla de Fernández, así como el asesoramiento de Emilio A. Machado.

BIBLIOGRAFIA

1. Griffith, W. H. & J. F. Nyc. Effects of deficiency. En: **The Vitamins.** Section X, Chapter 6. **Choline.** Vol. III, 2a. ed. W. H. Sebrell and R.S. Harris (Eds.). New York, Academic Press, 1971, p. 81-123.
2. Monserrat, A. J. **Injuria Renal Nutricional. Estudios Experimentales.** Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, 271 p.
3. Montes de Oca, M., J. C. Perazzo, A. J. Monserrat & E. E. Arrizurieta de Muchnick. Acute renal failure induced by choline-deficiency: structural functional correlations nephron. En prensa.
4. Engel, R. W. & W. D. Salmon. Improved diets for nutritional and pathologic studies of choline deficiency in young rats. **J. Nutr., 22:** 109-117, 1941.
5. Griffith, W. H. & N. J. Wade. Choline metabolism. II. The interrelationship of choline, cystine and methionine in the ocurrence and prevention of hemorrhagic degeneration in young rats. **J. Biol. Chem., 132:** 627-637, 1940.
6. Olson, R. E. & H. W. Deane. A physiological and cytochemical study of the kidney and the adrenal cortex during acute choline deficiency in weanling rats. **J. Nutr., 39:** 31-45, 1949.
7. McAnulty, P. A. & J. W. T. Dickerson. The cellular response of the weanling rat thymus gland to undernutrition and rehabilitation. **Pediat. Res. 9:** 778-785, 1973.
8. Selye, H. **Fisiología y Patología de la Exposición al "Stress".** Vol. 1 y 2. Madrid, Editorial Científico Médica, 19,279 p.
9. Konopka, H. E., I. Arienti de García & A. J. Monserrat. Necrosis renal por deficiencia de factores lipotrópicos. Influencia de la dieta, raza y cepa de ratas. **Medicina (Buenos Aires), 38:** 233-240, 1978.
10. Arienti de García, I., H. F. Konopka, J. C. Perazzo & J. A. Monserrat. Patología de la médula renal en ratas deficientes en factores lipotrópicos. **Medicina (Buenos Aires), 39:** 49-56, 1979.
11. Dixon, W. J. & F. J. Mesey. **Introduction to Statistical Analysis.** 2nd ed. New York, MacGraw Hill Book Co., 1957.
12. Monserrat, A. J., E. A. Porta & W. S. Hartroft. Sequential renal changes

in choline-deficient weanling rats. Conventional and electron histochemistry. **Arch. Pathol., 85**: 419-432, 1968.

13. Christensen, K. Renal changes in the albino rat on low choline and choline-deficient diets. **Arch. Pathol., 34**: 633-646, 1942.
14. Moore, H. C. The acute renal lesions produced by choline deficiency in the male weanling rat. **J. Pathol. Bacteriol., 74**: 171-183, 1957.
15. Craddock, C. G., R. Longmire & R. McMillan. Lymphocytes and the immune response (second of two parts). **New England J. Med., 285**: 378-384, 1971.
16. Harris, C. & W. T. Murke. The changing cellular distribution in bone marrow of the normal albino rat between one and fifty weeks of age. **Am. J. Pathol., 33**: 931-951, 1957.
17. Hwang, W. S., Y. Y. Ho, S. C. Luk & C. T. Simon. Ultrastructure of the rat thymus. A transmission, scanning electron microscope and morphometric study. **Lab. Invest., 31**: 473-487, 1974.
18. Bell, R. C., L. A. Hazell & J. W. Sheridan. The influence of dietary protein in hemopoietic cells in the mouse. **Cell Tissue Kinet., 9**: 305-312, 1976.
19. McAnulty, P. A. & J. W. T. Dickerson. The cellular response of the weanling rat thymus gland to undernutrition and rehabilitation. **Pediat. Res., 9**: 778-785, 1973.