

## **Cuantificación de colágeno tipo I y tipo III en el corazón de bovinos con deficiencia secundaria de cobre**

### **Collagen type I and III quantification in hearts from bovines with secondary copper deficiency**

NICASTRO, CN; POSTMA, GC; GAZZANEO, PD; OLIVARES, RWI; SCHAPIRA, A; MINATEL, L.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Patología. Av. San Martín 5285 (1417) Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

#### **RESUMEN**

La deficiencia de cobre es una de las carencias minerales más extendidas en los bovinos de nuestro país. Una de las manifestaciones de esta deficiencia es la enfermedad de las caídas, caracterizada por lesiones en el corazón, que derivan en una insuficiencia cardíaca. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si se producían modificaciones en la cantidad de colágeno tipo I y tipo III en el tejido conectivo del corazón de bovinos con deficiencia secundaria de cobre. Se trabajó con tacos de parafina de muestras de miocardio de 18 novillos Holando Argentino, divididos en 2 grupos (control y deficiente). Los cortes fueron coloreados con la técnica de picrosirius red y examinados bajo luz polarizada, a fin de discriminar las fibras de colágeno tipo I de las fibras de colágeno tipo III. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos para el porcentaje de colágeno tipo I ( $p = 0,7409$ ) y tipo III ( $p = 0,5227$ ), ni para la relación entre ambos colágenos ( $p = 0,9623$ ). Es probable que el tiempo de deficiencia transcurrido en este caso no haya sido suficiente para inducir alteraciones en las cantidades de fibras colágenas I y III en los animales del grupo deficiente.

**Palabras clave:** (bovinos), (deficiencia de cobre), (corazón), (tejido conectivo)

## SUMMARY

Copper deficiency is an important disease of cattle in our country. One manifestation of copper deficiency is falling disease, characterized by heart lesions that lead to heart failure. The aim of this work was to study if there were any changes in the amount of collagen type I and type III in the connective tissue of the heart in cattle with secondary copper deficiency. Paraffin blocks from 18 myocardial samples of 18 Holando Argentino calves, divided into 2 groups (control group and deficient group), were used. Sections were colored with the picosirius red technique, and examined under polarized light, in order to discriminate type I collagen fibers from type III collagen fibers. No statistically significant differences were found between the two groups for the percentage of collagen type I ( $p = 0.7409$ ) and type III ( $p = 0.5227$ ), nor for the relation between both collagens ( $p = 0.9623$ ). It is probable that the deficiency was not extended enough to induce alterations in the amount of type I and type III collagen fibers of the Cu-deficient bovines.

**Keywords:** (bovine), (copper deficiency), (heart), (connective tissue)

## INTRODUCCIÓN

La deficiencia de cobre (Cu), conocida como hipocuprosis, es una de las carencias minerales más frecuentes en el mundo<sup>14</sup> y una de las más extendidas en nuestro país<sup>12</sup>, que afecta principalmente a bovinos en sistemas de tipo extensivos. Puede afectar a distintas categorías, produciendo signología clínica variable, ya que interviene en numerosos procesos biológicos como cofactor de varias enzimas denominadas cupro-enzimas. Los primeros reportes datan del año 1929, donde en Australia Occidental se dio a conocer una enfermedad bajo el nombre de “mal de las caídas”, llamada así ya que el ganado afectado moría en forma súbita debido a una falla cardíaca aguda, como consecuencia de una fibrosis miocárdica<sup>1</sup>. Años más tarde se identificó en ensayos experimentales en ratones que la deficiencia de Cu generaba alteraciones en los colágenos tipo I, III y IV de las membranas basales (MBs) cardíacas<sup>5</sup>. Es importante destacar que la mayoría de las investigaciones sobre la relación entre deficiencia de Cu y lesiones cardíacas se realizaron principalmente en animales de laboratorio. Esto impulsó a nuestro grupo de trabajo, que había desarrollado un modelo experimental de inducción de deficiencia de Cu en bovinos<sup>10</sup>, a llevar adelante investigaciones sobre los efectos de la deficiencia a nivel cardíaco. En estas investigaciones se observó que en el corazón de

los bovinos con deficiencia de Cu disminuyó la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ciclo oxigenasa (COX)<sup>11</sup> y lisil oxidasa (LOX)<sup>13</sup>, y se produjo un aumento del estrés oxidativo. Entre las alteraciones morfológicas del miocardio se identificaron alteraciones mitocondriales con microscopía electrónica, como tumefacción, formación de crestas y fusión de las mitocondrias, y un aumento en la cantidad de tejido conectivo y en el espesor de las MBs<sup>11</sup>, con microscopía óptica.

La técnica histoquímica de picosirius red es un método específico para la identificación de fibras colágenas, que adoptan una tinción de color rojo. Con el empleo de luz polarizada es posible discriminar entre las fibras de colágeno tipo I y tipo III, bajo el fundamento de la birrefringencia y de la anisotropía de las fibras colágenas<sup>7</sup>. Cuando la luz golpea a un material anisotrópico, se refracta en dos rayos que viajan a diferentes velocidades y con direcciones de vibración orientadas a 90° entre sí. El picosirius red es una molécula birrefringente alargada y cuando se une al colágeno se orienta en paralelo a las fibras; esto ayuda a amplificar la birrefringencia<sup>14</sup>. Gowda y col.<sup>6</sup> sostienen que las fibras de colágeno tipo I son fibras gruesas, fuertemente birrefringentes, y eso hace que se vean de color amarillas o rojas, mientras que las fibras de colágeno tipo III son delgadas, débilmente birrefringentes y por eso se ven de color verde.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar si se produjeron modificaciones en la cantidad de colágeno tipo I y tipo III en el tejido conectivo del corazón de bovinos con deficiencia secundaria de Cu.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon muestras de miocardio del ventrículo derecho (VD) provenientes de 18 terneros machos, Holando Argentino, pertenecientes a dos ensayos consecutivos similares realizados en la Cátedra de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Ambos ensayos habían sido aprobados oportunamente por el comité de ética de la Facultad (CICUAL). En cada ensayo los animales fueron divididos en dos grupos (control y deficiente). La confección de los grupos, la dieta recibida y los valores de Cu en plasma e hígado de cada grupo al comienzo y al final de cada ensayo fueron descriptos oportunamente<sup>11</sup>. Resumidamente, se dividieron a los animales en dos grupos (control y deficiente) según el peso y los niveles hepáticos de Cu. Los animales del grupo control (n = 9) recibieron una dieta base suplementada con 9 mg Cu/kg materia seca (MS) como sulfato de Cu; mientras que el grupo deficiente (n = 9) recibió la dieta base suplementada con 11 mg molibdeno/kg MS como molibdato de sodio, para alcanzar una relación Cu/Mo de 1:3, y 3 g azufre/kg de MS como sulfato de sodio. La dieta base contenía 3,8 mg Cu/kg MS; 0,4 g Mo/kg MS y 0,4 g S/kg MS. Los animales tenían acceso libre al agua de bebida. Los valores de Cu hepático al inicio de los ensayos fueron de  $851,8 \pm 165,9$   $\mu\text{g/g}$  MS para el grupo control y de  $829,4 \pm 201,3$   $\mu\text{g/g}$  MS para el grupo deficiente; mientras que los valores de Cu plasmático fueron de  $89,5 \pm 8,1$   $\mu\text{g/dl}$  para el grupo control y de  $84,7 \pm 9,7$   $\mu\text{g/dl}$  para el grupo deficiente. Al finalizar los ensayos, los valores de Cu hepático fueron de  $182,6 \pm 71,1$   $\mu\text{g/g}$  MS para el grupo control y de  $6,3 \pm 1,1$   $\mu\text{g/g}$  MS para el grupo deficiente; mientras que los valores de Cu plasmático fueron de  $67,9 \pm 13$   $\mu\text{g/dl}$  para el grupo control y de  $23,7 \pm 6,2$   $\mu\text{g/dl}$  para el grupo deficiente.

Para la identificación de fibras colágenas de tipo I y de tipo III se realizó la técnica de picosirius red (Direct Red 80, Biotechnologies,

Santa Cruz, USA) bajo luz polarizada<sup>7</sup>. Se utilizaron tacos de parafina de los cuales se obtuvieron cortes de 5  $\mu$  de espesor. Los cortes fueron desparafinados e hidratados. Luego se colocaron en hematoxilina de Weigert (Hematoxilina Férrica de Weigert, Biopack, Buenos Aires, Argentina) por 10 minutos. A continuación, fueron sumergidos en la Solución A (Sirius red en solución sobresaturada de ácido pícrico) por una hora y luego lavados con la Solución B (ácido acético al 0,5 % en solución acuosa). Finalmente, se deshidrataron, se aclararon con 2 pasajes en xilol (10 minutos cada uno) y se montaron con medios sintéticos.

A partir de los cortes teñidos y bajo la luz polarizada, se evaluaron a ciego 6 imágenes a 100X por cada animal. Luego se procedió a cuantificar el tejido conectivo mediante el software Fiji Image J, para lo cual se cambió la imagen a tipo HSB, para luego descomponerla en 3 canales (brillo, saturación y matiz). Se trabajó sobre el canal de brillo, en el cual se seleccionó un área de interés a través de distintos filtros para hacerla más específica. Dicho trabajo se realizó por separado para cada colágeno. Con cada selección se calculó el área que ocupaba cada uno de los colágenos con respecto al área total evaluada en cada imagen de cada animal, obteniéndose un valor promedio por animal.

Los datos obtenidos de los porcentajes de cada tipo de colágeno con la técnica de picosirius red fueron comparados entre ambos grupos utilizando un test t de Student, previa verificación del supuesto de normalidad de las variables en estudio con la prueba de Shapiro Wilk. El nivel de significación establecido para ambos test fue del 95 %. Para estos análisis se empleó el programa Statistix 8.0.

## RESULTADOS

En el grupo control la proporción de colágeno tipo I con respecto al área total fue de  $2,19 \pm 1,24$  %, mientras que el grupo deficiente mostró valores de  $2,04 \pm 0,67$  % (Gráfico 1). Para el colágeno tipo III, el grupo control exhibió valores de  $0,52 \pm 0,35$  % y el grupo deficiente de  $0,61 \pm 0,21$  % (Gráfico 1). En cuanto a la relación entre el colágeno tipo III/I en el grupo control fue de 0,24 y en el grupo deficiente fue de 0,30 (Gráfico 2). No se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre los dos grupos (control y deficiente) para el porcentaje de colágeno tipo I ( $p = 0,7409$ ) y tipo III ( $p = 0,5227$ ), ni para la relación entre ambos colágenos ( $p = 0,9623$ ).

Las imágenes 1 y 2 corresponden a la tinción de picrosirius red de animales del grupo control y deficiente, respectivamente, sin luz polarizada, con luz polarizada y con el análisis del programa Fiji Image J.

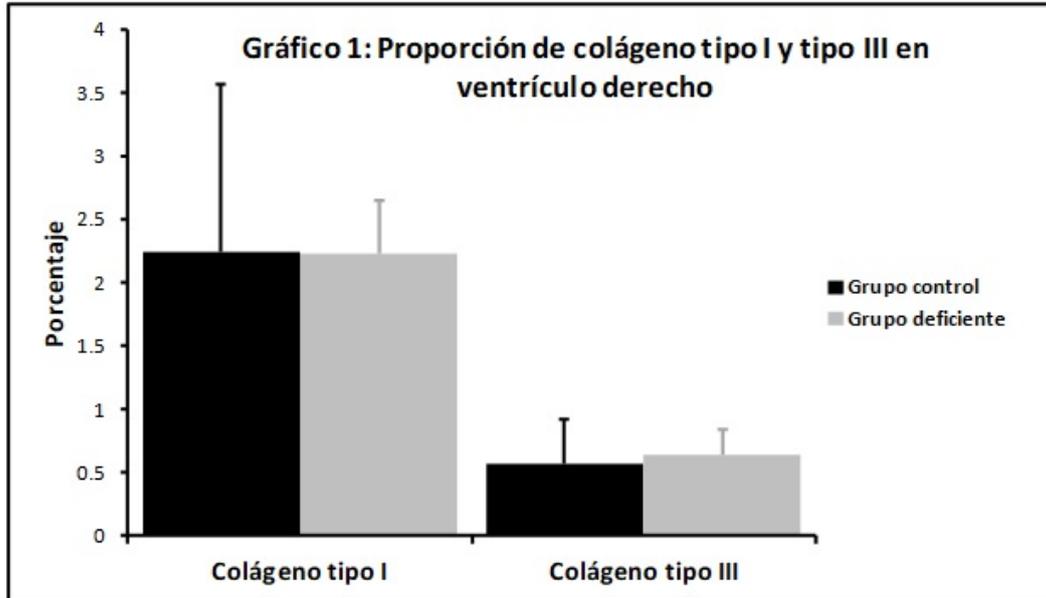


Gráfico 1: Proporción de colágeno tipo I y tipo III en ventrículo derecho.

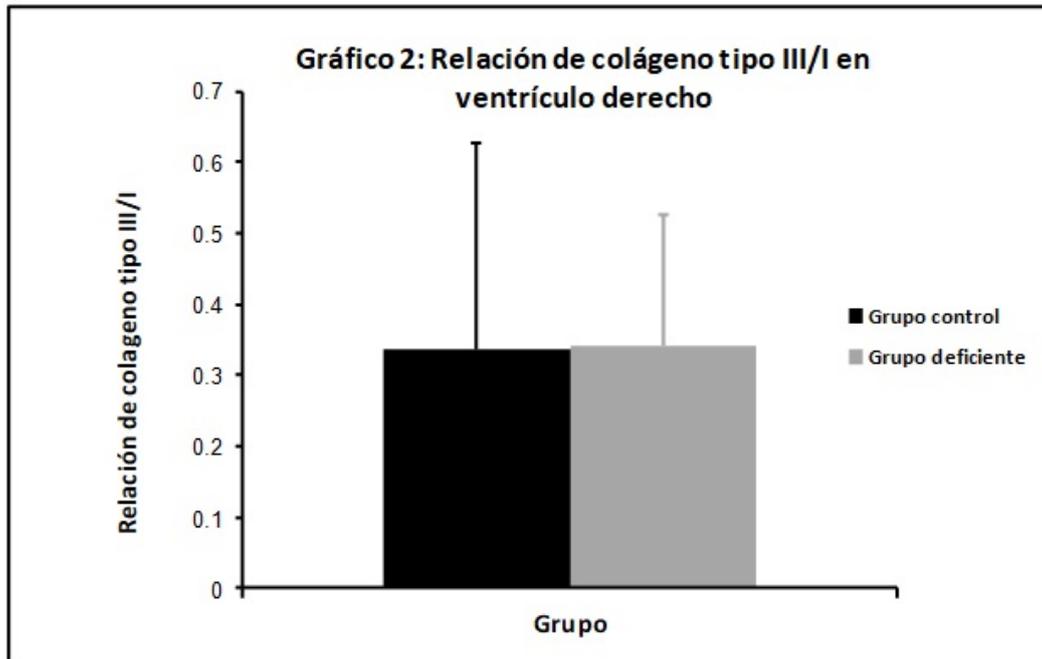
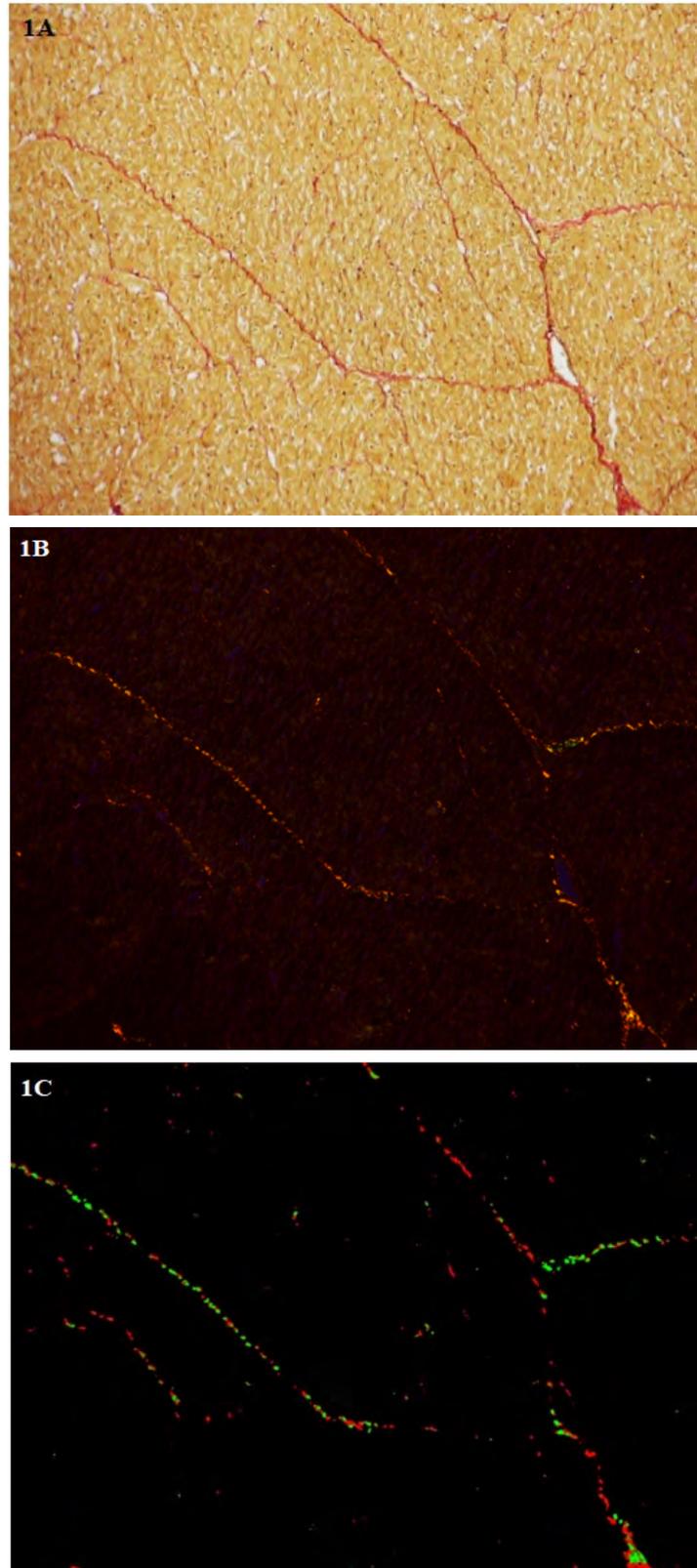
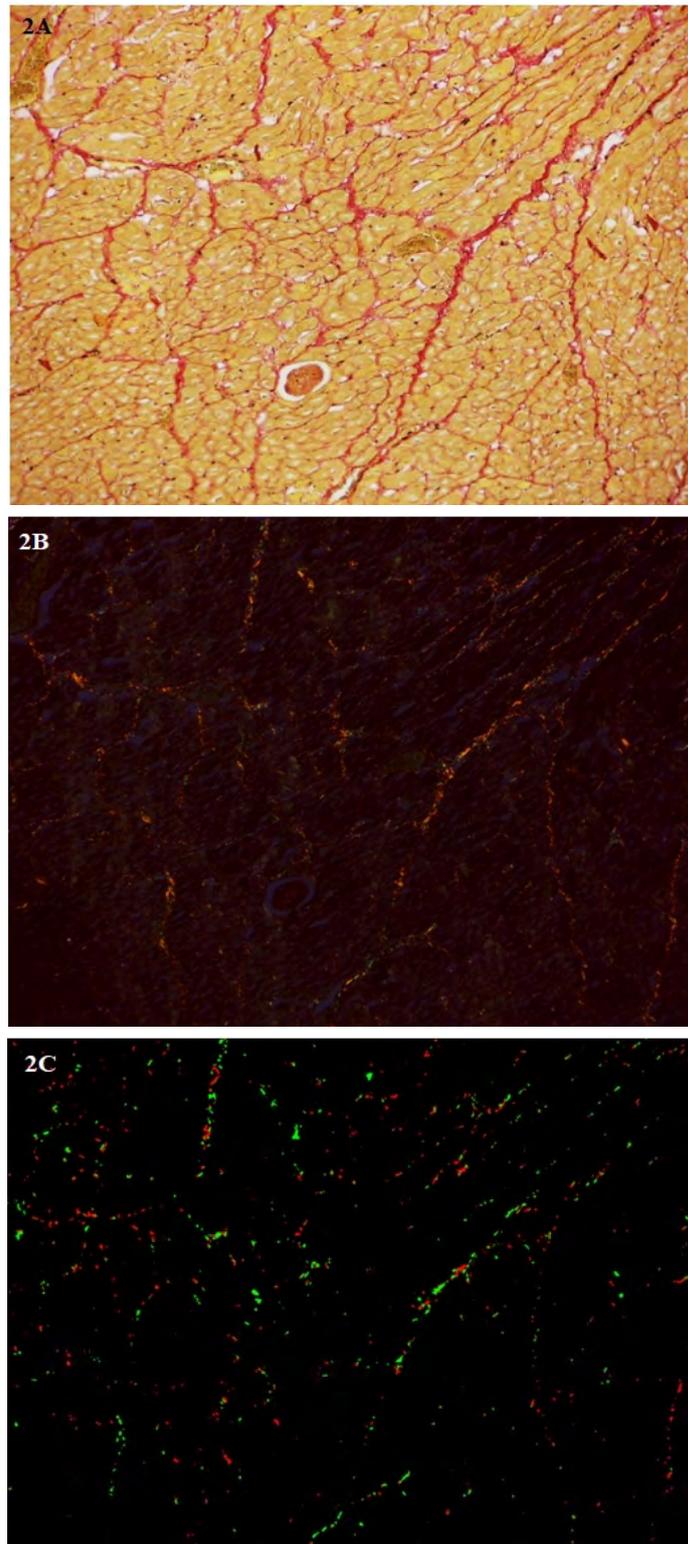


Gráfico 2: Relación de colágeno tipo III/I en ventrículo derecho.



**Imagen 1.** Imagen de un corte de ventrículo derecho del animal 41 del grupo control teñido con picrosirius red (100X). **A.** Microscopía óptica común. **B.** Con luz polarizada. Nótese las coloraciones roja y amarilla (colágeno tipo I) y verde (colágeno tipo III). **C.** Imagen obtenida por el software Fiji Image J.



**Imagen 2.** Imagen de un corte de ventrículo derecho del animal 35 del grupo deficiente teñido con picrosirius red (100X). **A.** Microscopía óptica común. **B.** Con luz polarizada. Nótese las coloraciones roja y amarilla (colágeno tipo I) y verde (colágeno tipo III). **C.** Imagen obtenida por el software Fiji Image J.

## DISCUSIÓN

El grupo de investigación de la Cátedra de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires reportó, en investigaciones anteriores, un mayor depósito de tejido conectivo y alteraciones en las MBs del miocardio de bovinos con deficiencia de Cu, atribuible al estrés oxidativo que sufrieron las células a causa de una disminución de la actividad de las enzimas COX, SOD<sup>11</sup> y LOX<sup>13</sup>. Estos hallazgos plantearon nuevos interrogantes, que abrieron el camino a futuras investigaciones.

En este trabajo se empleó la técnica histoquímica de picosirius red bajo luz polarizada, con el objetivo de estudiar si existían diferencias en la cantidad de fibras colágenas de tipo I y tipo III en el corazón de bovinos con deficiencia secundaria de Cu, considerando que frente a un proceso de reparación del tejido se produce un aumento de ambos colágenos.

La muerte de las células miocárdicas suele ser el evento inicial para el desarrollo de la respuesta de reparación por fibrosis debido a la activación de señales fibrogénicas en el miocardio<sup>8</sup>, siendo reemplazadas principalmente, como mencionamos anteriormente, por fibras de colágeno tipo I y tipo III para preservar la integridad estructural del tejido<sup>17</sup>. El proceso de reparación de un tejido consta de una fase temprana y una fase tardía. Durante la fase temprana hay un aumento de la síntesis de colágeno tipo III<sup>3,9</sup>, siendo mayor la proporción de este tipo de colágeno con respecto al tipo I, mientras que en la fase tardía esa proporción se invierte. En ensayos experimentales en corazones de ratas con deficiencia de Cu se obtuvo una mayor proporción de colágeno tipo III y una mayor cantidad de la fracción extraíble con pepsina de dicho colágeno (esta fracción es soluble y pertenece al colágeno recién sintetizado); sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en el colágeno total entre ambos grupos<sup>4,18</sup>. Otros ensayos experimentales similares en ratas deficientes de Cu realizaron la técnica de inmunohistoquímica<sup>2</sup> para colágeno tipo I y tipo III en músculo esquelético y cardíaco, en los cuales observaron ligeras diferencias en la marcación de las muestras provenientes de animales deficientes de Cu, pero las mismas

no fueron estadísticamente significativas. Vadlamudi y col.<sup>16</sup> trabajaron con miocardio de cerdos deficientes de Cu, en donde encontraron que la proporción de colágeno tipo III era entre un 25 a 40 % más alta en el grupo deficiente con respecto al grupo control.

Para poder entender los hallazgos de las diferentes investigaciones es primordial conocer las diferentes fases que transcurren durante una deficiencia mineral. Según Suttle<sup>15</sup> una deficiencia mineral consta de 4 fases, donde cada una de ellas se caracteriza por sufrir distintos cambios bioquímicos que conducen a la aparición de los signos clínicos. Las fases son depleción, deficiencia, disfunción enzimática y, por último, enfermedad. La primera fase de depleción de la deficiencia de Cu se produce cuando el aporte mineral en la dieta no cubre los requerimientos de Cu del organismo, lo que obliga al animal a utilizar el Cu almacenado en el hígado para poder cubrirlos. La única manifestación durante esta etapa es la disminución de los valores de Cu hepáticos. Durante la segunda fase de deficiencia las reservas hepáticas disminuyen drásticamente y no pueden mantener los niveles de Cu normales en sangre (mayores a 60 µg/dl), por lo que esta etapa se caracteriza por bajos valores de Cu en plasma o suero. Durante la fase de disfunción enzimática, la reducción del aporte de Cu a los tejidos, consecuencia de los bajos niveles plasmáticos, conduce a una disminución de la funcionalidad de las enzimas Cu-dependientes, lo cual culmina con la aparición de signos clínicos propios de la enfermedad (cuarta fase). Es importante remarcar que los signos clínicos no aparecen todos al mismo tiempo, sino que se dan de forma gradual, debido a que la disminución de la actividad de las enzimas Cu-dependientes sucede a distintas velocidades, dependiendo de la vida media de la enzima afectada. Por ejemplo, la acromotriquia, que es la pérdida de color del pelo por fallas en la actividad de la enzima tirosinasa, es el signo clínico más precoz de la hipocuprosis y, durante el desarrollo de nuestros ensayos, se manifestó en los bovinos del grupo deficiente alrededor de los ojos.

Si bien en el presente trabajo se observó un ligero incremento de colágeno tipo III en el grupo deficiente, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos posiblemente se haya debido a un período de deficiencia insuficiente. Es un hecho que los bovinos pertenecientes al grupo deficiente de Cu se encontraban cursando la fase de disfunción enzimática, dada la disminución de la actividad de las enzimas COX, SOD<sup>11</sup> y LOX<sup>13</sup> en el miocardio, y la aparición de acromotriquia periocular en varios animales. Sin embargo, es probable que esta disfunción de las enzimas miocárdicas aún no hubiera tenido consecuencias graves para las células miocárdicas y, por lo tanto, no se hubiese desencadenado todavía un proceso de reparación evidente.

## CONCLUSIÓN

La ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la proporción de colágenos tipo I y tipo III, y en la relación entre ambos en el miocardio de bovinos con y sin deficiencia de Cu, podría deberse a un período de deficiencia insuficiente. Se deberían realizar nuevos estudios experimentales, con un tiempo de deficiencia superior, o estudios a campo utilizando muestras de corazón obtenidas en frigoríficos, pertenecientes a bovinos adultos que provengan de zonas del país con deficiencia de Cu, que permitan corroborar esta hipótesis.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del subsidio UBACyT N°20020150100113BA.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bennetts, HW.; Beck, AB.; Harley, R. The pathogenesis of Falling Disease. Studies on copper deficiency in cattle. *Aust. Vet. J.* 1948; 9:237-244.
2. Borg, TK.; Klevay, LM.; Gay, RE.; Siegel, R.; Bergin, ME. (1985). Alteration of the connective tissue network of striated muscle in copper deficient rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1985; 17(12):1173-1183.
3. Carver, W.; Nagpal, ML.; Nachtigal, M.; Borg, TK.; Terracio, L. Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* 1991; 69(1):116-122.
4. Dawson, R.; Milne, G.; Williams, RB. Changes in the collagen of rat heart in copper-deficiency-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 1982;16(10):559-565.
5. Farquharson, C.; Robins, SP. Immunolocalization of collagen types I, III and IV, elastin and fibronectin within the heart of normal and copper-deficient rats. *J. Comp. Pathol.* 1991; 104(3):245-255.
6. Gowda, BK.; Kokila, J.; Gopinathan, PA.; Praveen, KS. Picrosirius Red and Polarization Microscopy – A Tool for Gender Differentiation. *J. Clin. Diagn. Res.* 2017; 11(1):107-109.
7. Junqueira, LC.; Cossermelli, W.; Brentani, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch. Histol. Japon.* 1978; 41(3):267-274.
8. Kong, P.; Christia, P.; Frangogiannis, NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 71(4):549-574.
9. Li, L.; Zhao, Q.; Kong, W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol.* 2018; 68-69:490-506.
10. Minatel L.; Underwood SC.; Postma GC.; Dallorso ME.; Carfagnini JC. Reproducción de la deficiencia de cobre en bovinos mediante el empleo de altos niveles de molibdeno y sulfato en la dieta. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 2007; 27(3): 179-187.
11. Olivares, RWI.; Postma, GC.; Schapira A.; et al. Biochemical and morphological alterations in hearts of copper-deficient bovines. *Biol. Trace Elem. Res.* 2019; 189(2):447-455.
12. Postma, GC.; Minatel, L.; Carfagnini, JC. Deficiencia de cobre en bovinos en pastoreo de la argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 2010; 30(2):189-198.
13. Postma, GC.; Nicastro, CN.; Valdez LB.; et al. Decrease lysyl oxidase activity in hearts of copper-deficient bovines. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2021; 65:126715. doi: 10.1016/j.jtemb.2021.126715

14. Rittié, L. Method for Picosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods in Molecular Biology*, Springer, USA, 2017:395-407.
15. Suttle NF. Mineral nutrition of livestock. 4° ed., CABI Publishing, U.K., 2010:255-305.
16. Vadlamudi, RK.; McCormick, RJ.; Medeiros, DM.; Vossoughi, J.; Failla, ML. Copper deficiency alters collagen types and covalent cross-linking in swine myocardium and cardiac valves. *Am. J. Physiol.* 1993; 264(6):2154-2161.
17. Weber, KT; Sun, Y; Bhattacharya, SK; Ahokas, RA; Gerling, IC. Myofibroblast mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat. Rev. Cardiol.* 2013;10(1):15-26.
18. Werman, MJ; David, R. Lysyl oxidasa activity, collagen cross-links and connective tissue ultrastructure in the heart of copper-deficient male rats. *J. Nutr. Biochem.* 1996; 7(8):437-444.