

Trabajo Original**Experimental**

Evaluación de las remodelaciones cardiacas por consumo crónico de una bebida energizante un modelo murino

Bárceñas-García Jessica¹, Pérez-Ruiz María¹, González-Vadillo Lorena², Jaime-Cruz Ricardo³, Salazar-Posos Jessica⁴ y Lazzarini Roberto⁵ *

1. Licenciatura en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa
2. Licenciatura en Biología, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa
3. Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
4. Licenciatura en Ingeniería Bioquímica Industrial, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
5. Departamento Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Ciudad de México, Iztapalapa, México.

*e-mail: lazzarini@xanum.uam.mx

Resumen

Las bebidas energizantes son productos que prometen mediante su consumo, aliviar la fatiga, mantener la vigilia, mejorar el rendimiento físico y estimular las capacidades cognitivas ante situaciones de estrés. Se componen básicamente de cafeína, aminoácidos, vitaminas, minerales, extractos vegetales, aditivos acidulantes, saborizantes y colorantes. Son consumidas principalmente por adolescentes y adultos jóvenes. Reportes de casos clínicos, relacionadas con el consumo agudo de este tipo de bebidas destacan: arritmia, taquicardia, hipertensión, incluso infarto al miocardio. La mayoría de los trabajos que exploran los efectos adversos de las bebidas energizantes en seres humanos, utilizan una dosis única de 365 ml. Sin que se conozcan los efectos nocivos al sistema cardiovascular en consumos crónicos. El objetivo de este estudio fue evaluar las posibles remodelaciones cardíacas derivadas del consumo crónico de una bebida energizante en un modelo murino. Nuestros datos sugieren, que el consumo crónico de la bebida "Monster Energy®" podría desarrollar cardiomegalia, congestión vascular y edema cardíaco en un modelo murino a catorce días de consumo.

Palabras clave: Bebidas energizantes, Monster Energy®, cardiomegalia, congestión vascular, edema cardíaco.

Abstract***Evaluation of cardiac remodeling by chronic consumption of an energizing drink a murine model***

Energy drinks are products that promise through their consumption, relieve fatigue, maintain wakefulness, improve physical performance and stimulate cognitive abilities in situations of stress. They consist basically of caffeine, amino acids, vitamins, minerals, plant extracts, acidifying additives, flavorings and dyes. They are consumed mainly by teenagers and young adults. Reports of clinical cases related to the acute consumption of this type of drinks include: arrhythmia, tachycardia, hypertension, even myocardial infarction. Most studies exploring the adverse effects of energy drinks in humans use a single dose of 365 ml. Without knowing the harmful effects to the cardiovascular system in chronic consumption. The purpose of this study was to evaluate the possible cardiac remodeling derived from the chronic consumption of an energizing drink in a murine model. Our data follow, that the chronic consumption of the drink "Monster Energy®" could develop cardiomegaly, vascular congestion and cardiac edema in a murine model to fourteen days of consumption.

Key words: Energy drinks, Monster Energy®, cardiomegaly, vascular congestion, cardiac edema

Las bebidas energizantes se diferencian de las bebidas deportivas por contener cafeína, genéricamente son productos que prometen mediante su consumo, aliviar la fatiga, mantener la vigilia, mejorar el rendimiento físico y estimular las capacidades cognitivas ante situaciones de estrés. Son bebidas sin alcohol, comúnmente gasificadas, que entre sus componentes básicos se encuentra la cafeína e hidratos de carbono, así como también pueden contener otros ingredientes como: aminoácidos, vitaminas, minerales, extractos vegetales, aditivos acidulantes, saborizantes y colorantes (**Sánchez et al., 2015**). El consumo de estas bebidas se ha incrementado de manera exponencial desde su aparición en los años 60's (**Souza et al., 2007**). Las bebidas energizantes son consumidas principalmente por adolescentes y adultos jóvenes (**Attila y Cakir 2011**), de manera peculiar se encontró que los estudiantes de medicina, artes y ciencias del deporte, se encuentran entre los grupos de personas que más utilizan estas bebidas (**Malinauskas et al., 2007; Attila y Cakir 2011**). Reportes de casos clínicos, señalan afecciones que están relacionadas con el consumo agudo de este tipo de bebidas, entre otros padecimientos destacan: perfil hemodinámico adverso con carga de trabajo cardiaco aumentado, disminución de la velocidad del flujo sanguíneo (**Grasser et al., 2016**), síndrome de QT largo (**Rottlaender et al., 2012**), infarto al miocardio (**Dikici et al., 2014**) así como accidentes cerebrovasculares (**Dikici et al., 2013**). Otros estudios han relacionado padecimientos como: arritmia, taquicardia e hipertensión; con la cafeína contenida en las bebidas energizantes (**Lane et al., 1990**). Sin embargo, aún hay controversia sobre el impacto del consumo agudo y/o crónico en la salud de los consumidores. Por lo que nos propusimos evaluar las posibles remodelaciones cardiacas producidas por el consumo crónico de la bebida Monster Energy® en un modelo murino.

Materiales y Métodos

Animales. Se utilizaron 24 ratones macho de la cepa CD-1 de entre 8 y 9 semanas de edad, con peso corporal promedio de 32.7 g, suministrados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa. Los animales fueron manipulados conforme a la NORMA oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. De manera aleatoria se formaron 2 grupos: un grupo control n=12 y un grupo experimental n=12. Ambos grupos, tuvieron acceso libre al alimento en pellets para roedores (Purina, México) y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas cada uno. Al grupo experimental se le proporcionó la bebida energizante "Monster Energy®" [Na 78 mg, hidratos de carbono 11.7 g, cafeína 319.5 mg, vitamina B2 0.7 mg, B3 5.1, B6 0.85 mg, B12 2.5 µg, Panax Ginsen 81.5 mg, Taurina 393 mg, L-Carnitina 23 mg, Guaraná 2 mg /100 g], des-gasificada (por agitación), como sustituto de agua para beber; por el contrario al grupo

control se le suministró agua potable purificada. Los ratones fueron mantenidos dentro de las instalaciones del bioterio durante el periodo que duro el experimento. Una vez transcurridos 14 días los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂; los corazones fueron disecados, en seguida se pasaron por toallas absorbentes y después fueron pesados en balanza analítica (Ohaus Explore Pro, USA), finalmente se fijaron en una solución al 4% de formaldehído en búfer de fosfatos por 24 horas.

Anatomía de superficie y área ventricular. Para obtener el área del segmento ventricular, los corazones fueron fotografiados mediante microscopio estereoscópico SteREO Lumar.V12 (Carl Zeiss, Alemania), y las microfotografías se analizaron con el software ImageJ.

Tinción de Hematoxilina-Eosina. Los corazones fueron deshidratados con series graduales de etanol y aclarados con xilenos (Sigma, EU), para después, ser embebidos en medio de inclusión a base de parafina (Tissue-Tek, EU). Posteriormente se realizaron cortes seriados en el eje transversal, de 5 µm en micrótopo (Leyca, Alemania) y los tejidos fueron montados en portaobjetos electrocargados. Después de 24 horas de secado a temperatura ambiente, los cortes fueron des-parafinados, rehidratados y teñidos mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E). Como referencia de la zona de estudio, sólo se consideró el miocardio comprendido entre la porción media de los músculos papilares anterolateral y posteromedial del ventrículo izquierdo (VI).

Estudio morfométrico e histopatológico. Se obtuvieron microfotografías panorámicas de los cortes tenidos con H-E, mediante microscopio estereoscópico SteREO Lumar.V12 (Carl Zeiss, Alemania). Las fotografías fueron analizadas mediante el software ImageJ. Se contabilizaron tres imágenes panorámicas (n=72), por cada corazón de todos los ratones del experimento, se calculó la circunferencia ventricular y se midió el grosor de la pared libre del ventrículo derecho (pVD), la pared libre del VI (pVI) así como del tabique interventricular (TIV). Al menos una microfotografía de tejido cardiaco teñido mediante la técnica de H-E de cada ratón del experimento, fue analizado siguiendo los parámetros patológicos para lesiones cardiovasculares en ratones cómo reporta **Barritge y cols. (2016)**.

Análisis estadístico. Todos los datos se procesaron como media y desviación estándar. Los valores de significancia se calcularon por la prueba de t-Student y/o Wiscoxon con valor $p < 0.01$.

Resultados

Para investigar posibles remodelaciones cardíacas en los ratones que consumieron constantemente la bebida energizante "Monster Energy[®]" por 14 días; inicialmente disecamos los corazones, los pesamos y fotografiamos, posteriormente los procesamos para cortes en parafina, finalmente las muestras se tiñeron mediante la técnica de H-E y se realizaron estudios morfométricos e histopatológicos.

Mortalidad, alimentación y comportamiento

Durante los 14 días de exposición a la bebida energizante "Monster Energy[®]", no se registraron decesos en ninguno de los grupos del experimento. Sin embargo, observamos algunos cambios (no cuantificables) en el comportamiento alimenticio de los ratones del grupo experimental, consistente en que consumían menor cantidad de líquidos, pero mayor alimento en comparación con el grupo control. De manera interesante también observamos que, durante los cambios de las camas sanitarias, los ratones del grupo experimental generalmente se encontraban en vigilia y muy activos, incluso eran agresivos hacia la manipulación, mientras que los ratones del grupo control, por lo regular se encontraban dormidos y/o presentaban poco movimiento al ser manipulados.

Peso cardíaco, anatomía de superficie y área ventricular

Al comparar el peso de los corazones de ambos grupos del experimento, encontramos que en los ratones del grupo experimental los corazones aumentaron en promedio cerca del 10% (**p=0.00169**), respecto al peso de los corazones del grupo control (**Figura 1-A**). En concordancia, observamos que la anatomía de superficie de algunos corazones del grupo experimental, el segmento ventricular se observa más voluminoso en comparación con los corazones del grupo control (**Figura 1-C y -D**). Para corroborar, cuantificamos el área del segmento ventricular y encontramos que, en los ratones del grupo experimental, el área se incrementó en 23.68% (**p=0.00111**) con respecto de los corazones del grupo control (**Figura 1B**).

Morfometría

El estudio morfométrico mostró, que la circunferencia del corazón de los ratones del grupo experimental se incrementó en **19.34%** (**p=0.00256**) en comparación con el grupo control (**Figura 2-A**). Respecto de las paredes libres del VD, VI y del TIV no encontramos cambios entre los grupos del experimento (**p=0.20611**).

Análisis morfológico

Mediante tinciones de H-E nos fue posible identificar en los corazones del grupo experimental, algunas características que no se presentaron en el grupo control: congestión vascular caracterizada por la presencia de abundantes células sanguíneas en las cavidades ventriculares, y en vasos sanguíneos. También fue evidente observar en los corazones del grupo experimental, edema del miocardio, caracterizada por expansión del espacio intersticial entre las fibras musculares de los ventrículos (**Figura 2-B y -C**).

Discusión:

Modelo murino

Sólo en la base de datos Pubmed hay disponibles más de 2,300 trabajos relacionados con las bebidas energizantes. Algunos son ensayos que estudian los efectos agudos en el sistema cardiovascular de jóvenes sanos, causados por la ingesta de una lata de 365 ml (**Grasser et. al., 2014**). De ese total, 22 trabajos utilizan como modelo de estudio, ratones y/o ratas, sin embargo, la mayoría se centran en la relación que puede causar en el organismo la cafeína en combinación con bebidas alcohólicas. Por lo que nuestro diseño experimental es novedoso, ya que no se han explorado los efectos nocivos del consumo de las bebidas energizantes en animales de laboratorio, a pesar que más del 50% de los reportes de casos clínicos relacionados al consumo de bebidas energizantes, se relacionan con el sistema cardiovascular (**Ali et al., 2015**). En nuestro experimento fue importante un esquema de acceso voluntario a la bebida energizante por sustitución de agua para beber, evitando de esta manera, la administración intragástrica de la bebida energizante.

Comportamiento

Los cambios de las camas sanitarias se realizaba cada 3 días en un horario variable entre las 13:00 y 14:00 horas, generalmente los roedores de laboratorio en el horario mencionado se encuentran dormidos, aletargados o con poca actividad ya que son organismo nocturnos, sin embargo fue constante observar a los ratones del grupo experimental en vigilia, muy activos y agresivos a la manipulación, comportamiento que es parcialmente concordante con las pautas publicitarias de la mayoría de las marcas de las bebidas energizantes, por lo que pensamos que los efectos en el comportamiento de las personas consumidoras y nuestro grupo experimental fueron análogos.

Peso cardíaco, anatomía de superficie, área ventricular y morfometría

Los ratones del grupo experimental, desarrollaron remodelaciones cardíacas, expresadas en el incremento anómalo del peso y talla del corazón. **Barritge y cols. (2016)** describen para

el diagnóstico diferencial de la cardiomegalia en ratones, la relación entre el aumento notable del tamaño y el peso del corazón, cambios que pueden ser simétrico e involucrar a todo el órgano, fenómeno observado en nuestro experimento (**Figuras 1A, -B, -C, -D y 2-A, -B y -C**). El aumento del peso cardiaco del grupo experimental pudiera estar relacionado con el incremento del líquido intersticial acumulado entre las fibras musculares, producida por el edema cardiaco, pero también pudo contribuir al incremento del peso, la congestión vascular observada en los cortes histológicos (**Figura 2-C**).

Las remodelaciones observadas en el grupo experimental probablemente ocurrieron como respuesta al incremento de la presión arterial. Es bien conocida la relación entre el consumo de cafeína con el aumento de la presión arterial sistémica e incluso, también de la frecuencia cardiaca (**Higgins y Babu 2013**). Entre los efectos conocidos de la cafeína destacan de manera importante el incremento de la resistencia hemodinámica ejercida desde los pisos valvulares y tronco de las grandes arterias hacia las cavidades ventriculares, la resistencia hemodinámica produce así, estrés de las paredes ventriculares, induciendo remodelaciones cardiacas entre las cuales, pueden provocar aumento en la masa cardiaca y cambios en el peso del corazón (**Berriedge et al., 2016**). La bebida "Monster Energy[®]", ocupa el 2o lugar entre las bebidas energizantes con mayor contenido de cafeína en el mercado (**Grasser et al., 2016**), contiene 92.43 mg de cafeína por lata de 474 ml, 2.5 veces más que el contenido de cafeína de una taza de café estándar. En nuestro experimento no fue posible medir la presión arterial de los ratones, sin embargo, es probable que las remodelaciones cardiacas observadas en el grupo experimental, pudieran ocurrir mayoritariamente en respuesta a los efectos del consumo crónico de la cafeína contenida en la bebida energizante.

Análisis morfológico

Clements y cols. (2010) describieron al edema del miocardio, como un cambio inicial en la progresión de daños cardiacos causados por dosis altas de isoproterenol, potente inotrópico positivo, que eleva la presión arterial sistólica, resultando en aumento del trabajo cardiaco y la excitabilidad del miocardio. En nuestro experimento también observamos la ocurrencia de edema del miocardio en los ratones del grupo experimental, es probable que la cafeína contenida en la bebida (**Monster Energy[®]**) por su actividad inotrópica positiva, incrementará los niveles plasmáticos de hormonas relacionadas al estrés, como la adrenalina, noradrenalina y el cortisol, por lo cual podría esperarse un efecto hipertensivo derivado del consumo de las bebidas energizantes, ya que la secreción de estas hormonas es estimulada por la cafeína (**Lane et al., 1990**).

Conclusión

En conjunto nuestros datos sugieren que el consumo constante de la bebida energizante "**Monster Energy®**", puede ser causa de remodelaciones cardiacas, incluidas: cardiomegalia, congestión vascular y edema cardiaco; en un modelo murino de accesos voluntario por catorce días.

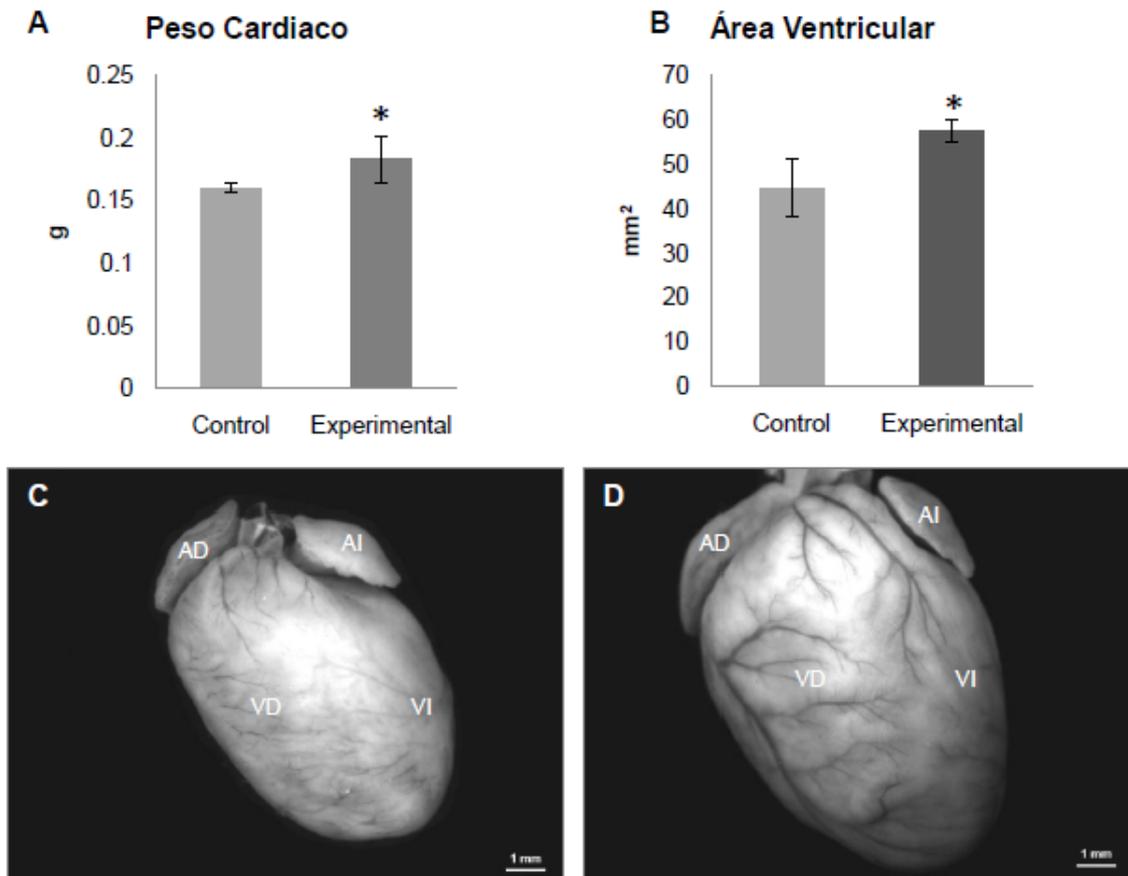


Figura 1. Peso, área ventricular y anatomía de superficie. En A) y B) se muestran gráficas que muestran diferencias significativas en el peso y área ventricular de los ratones que consumieron la bebida energizante por 14 días en comparación con el grupo control. C) y D) Anatomía de superficie de corazones representativos del grupo control y del grupo experimental respectivamente. Abreviaturas: AD atrio derecho. AI atrio izquierdo. VD ventrículo derecho. VI ventrículo izquierdo

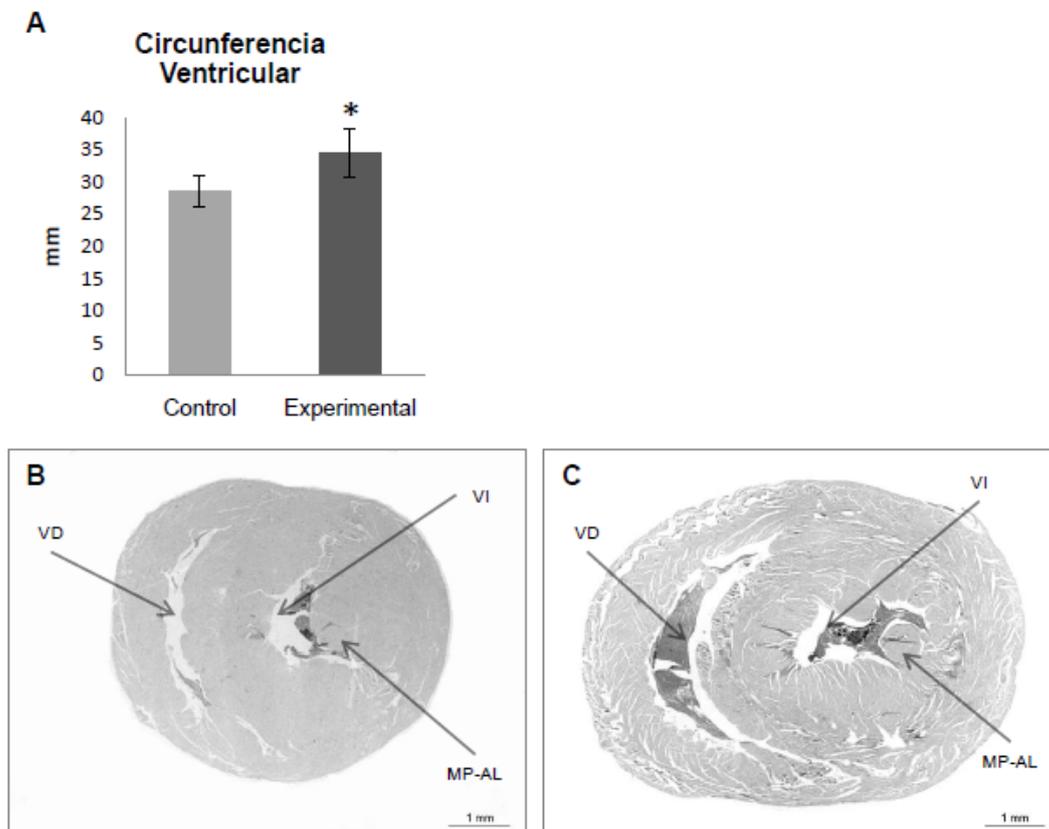


Figura 2. Morfometría y morfolopatología. A) Gráfica que muestra cambios significativos de la circunferencia ventricular de los ratones de grupo experimental en comparación con el grupo control. En B) y C) Se muestran microfotografías representativas de cortes histológicos transversales de corazones del grupo control y del grupo experimental respectivamente. En C) se puede apreciar abundantes depósitos sanguíneos en las cavidades ventriculares en comparación con B), También se observa expansión del espacio intersticial entre las fibras musculares del miocardio, en comparación con B); por su parte el edema se presenta en ambos ventrículos y también afecta al tabique interventricular. Abreviaturas: MP-AL músculo papilar anterolateral. VD ventrículo derecho. VI ventrículo izquierdo

Bibliografía

1. **Ali F**, Rehman H, Babayan Z, Stapleton D, Joshi DD. (2015). Energy drinks and their adverse health effects: a systematic review of the current evidence. *Postgrad Med* 127:308-22.
2. **Attila S, Cakir B** (2011) Energy-drink consumption in college student and associated factors. *Nutrition* 27(3):316-322
3. **Berridge B**, Mowat V, Nagai H. (2016) Non-proliferative and proliferative lesions of the cardiovascular system of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol* 29 (3 Suppl):1S-47S
4. **Clements P**, Brady S, York M, Berridge B, Mikaelian I, Nicklaus R, et al. (2010) Cardiac Troponins Working Group Time course characterization of serum cardiac troponins, heart fatty acid-binding protein, and morphologic findings with isoproterenol-induced myocardial injury in the rat. *Toxicol Pathol.* 38: 703–714.
5. **Dikici S**, Saritas A, Besir FH, Tasci AH, Kandis H (2013) Do energy drinks cause epileptic seizure and ischemic stroke? *Am J Emerg Med* 31(1):e271-e274
6. **Dikici S**, Saritas A, Kilinc S, Guaneysu S, Gunes H (2014) Does an energy drink cause a transient ischemic attack? *Am J Emerg Med* 33(1):129
7. **Grasser EK**, Yepuri G, Dulloo AG, Montani JP. (2014). Cardio-and cerebrovascular responses to the energy drink Red Bull in young adults: a randomized cross-over study. *Eur J Nutr* 53:1561-71.
8. **Grasser EK**, Miles-Chan L, Charriere N, Loonam C, Dulloo A. (2016). Energy Drinks and their impact on the cardiovascular system: potential mechanisms. *Adv Nutr* 7:950-60.
9. **Higgins JP, Babu KM** (2013). Caffeine reduces myocardial blood flow during exercise. *Am J Med* 126(8):e731-e738
10. **Lane JD**, Adcock RA, Williams RB, Kuhn CM. (1990). Caffeine effects on cardiovascular and neuroendocrine responses to acute psychosocial stress and their relationship to level of habitual caffeine consumption. *Psychosom Med.*; 52: 320-36.
11. **Malinauskas BM**, Aeby VG, Overton RF, Carpenter-Aeby T, Barber-Heidal K (2007) A survey of energy drink consumption patterns among college students. *Nutr J* 6(1):35-41
12. **Rottlaender D**, Motloch LJ, Reda S, Lambig R, Hoppe UC (2012) Cardiac arrest due to long QT syndrome associated with excessive consumption of energy drinks. *Int J Cardiol* 158(3):e51-52
13. **Sánchez, J.C.**, Romero, C. R., Arroyave C. D., García, A.M., Giraldo F.D, & Sánchez, L.V. (2015). Bebidas energizantes: efectos benéficos y perjudiciales para la salud. *Perspect Nutr Humana* 2015, 17: 79-91. DOI: [10.17533/udea.penh.v17n1a07](https://doi.org/10.17533/udea.penh.v17n1a07)
14. **Souza M**, Cruz L. "Bebidas energizantes, educación social y salud". *Rev Mex Neuroci* 2007; 8(2)

Recibido: 26/12/17

Aceptado: 30/12/17