

Universidad de Sevilla.  
Departamento de Biología Celular.

## Alteraciones producidas por la ingesta crónica de etanol en células pepsinógenas de la mucosa gástrica de rata. Estudio cuantitativo y ultraestructural

Torreblanca, J.; Moreno, F. J. y López-Campos, J. L.\*

### RESUMEN

Hemos estudiado experimentalmente los efectos producidos por la instilación crónica de etanol en células pepsinógenas. Para ello se instilaron diariamente a un grupo de animales, 4,5 g de etanol (40% en solución salina)/kg/día durante 60 días, siendo privados de la comida antes y después de la ingesta.

El estudio cuantitativo reveló un descenso en el número de gránulos de pepsinógenos y un incremento en la densidad de volúmen (Vvr, c) del retículo endoplasmático rugoso (RER), que presentaba menor número de vesículas, pero de un tamaño superior al del control.

Por último, en este trabajo, exponemos una posible hipótesis que explicaría nuestros resultados. El etanol actuaría bloqueando el proceso secretor de pepsinógeno a nivel de la formación de las vesículas de transición.

### SUMMARY

We carried out an experimental study of the effects produced by chronic instillation of ethanol on pepsinogen cells. In a group of animals, 4.5 g/kg/day of ethanol was instilled (40% in a salt solution) for 60 days. Animals were not fed before or after administration.

The quantitative study revealed a decrease in the number of pepsinogen granules and a increase in the density volume (Vvr, c) of the rough endoplasmic reticulum (RER), which presented a reduced number of vesicles, but these were larger in size than those of the control group.

Finally, in this paper we present a possible hypothesis to explain our results. Ethanol could act to block the pepsinogen secretory process at the level of the formation of the transition vesicles.

### INTRODUCCION

El producto de secreción de las células pepsinógenas ocupa el ápice celular en forma de gránulos de pepsinógeno. Los primeros trabajos que describen la relación entre estructura y función de estas células tienen más de 100 años (1, 2). Estos ponen ya de manifiesto las diferencias en el contenido secretorio de la célula y forma de los gránulos en distintas condiciones fisiológicas.

Diversos estudios (3-5), muestran que la instilación de etanol causa alteraciones en la «barrera de la mucosa gástrica», relacionando este hecho con un incremento de pepsina y de pepsinógeno en la luz gástrica.

Por otra parte, la acción dañina del etanol provoca el incremento del pH gástrico debido a la secreción de bicarbonato relacionada con fenómenos de restitución de la mucosa gástrica (6, 7). Este fenómeno del pH dificulta la transformación de pepsinógenos en pepsina e incluso la actividad de esta última (8, 9).

En el presente estudio hemos utilizado técnicas morfológicas y cuantitativas para valorar las alteraciones que produce la instilación experimental crónica de etanol en las células pepsinógenas gástricas.

### MATERIAL Y METODOS

Nuestro estudio experimental se realizó sobre 12 ratas macho Wistar, con un peso comprendido entre 200 y 350 g. Los animales fueron mantenidos en jaulas habituales con suelo de malla metálica para evitar la coprofagia y criados en el laboratorio en condiciones normales.

La distribución de los animales fue la siguiente:

**GRUPO I:** Administración por intubación gástrica de 4,5 g de etanol/kg/día (13 ml al 40% en solución salina).

**CONTROL:** Administración por intubación gástrica de 13 ml de solución salina/kg/día.

En ambos grupos la administración se realizó con el estómago vacío (privación de comida 9 horas antes y 3 después de la intubación gástrica).

Tras 60 días de tratamiento y 24 horas de ayuno, los animales eran brevemente anestesiados con éter y laparotomizados. Los estómagos eran abiertos por la curvatura menor, tras lo cual eran lavados y distendidos brevemente en solución salina. Pequeñas piezas de la mucosa fúndica dañada eran fijadas en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,2 durante 3 horas a 4°C. Posteriormente, las piezas eran lavadas en tampón cacodilato con sacarosa al 7,5% y postfijadas en OsO<sub>4</sub> al 1% en el mismo tampón durante 2 horas a 4°C. Para finalizar, el tejido era deshidratado en series crecientes de acetona tras lo cual era embebido en resina.

\* Departamento de Ciencias Morfológicas.

Los corte finos (80 nm) fueron obtenidos con un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E y contrastados con acetato de uranio y citrato de plomo.

La microscopía electrónica se realizó en un microscopio de transmisión Siemens Elmiskop 102 y fotografiada en película Agfa-Gevaert Scientia film.

Los cortes semifinos (0,5  $\mu\text{m}$ ) utilizados como controles, fueron teñidos con azul de toluidina y observados en un fotomicroscopio Carl Zeiss II.

El estudio cuantitativo se realizó por el método de recuento de puntos (10) sobre 20 fotografías por grupo, con un aumento final de 14.000, colocando una malla cuadrada de 1 cm de distancia entre líneas verticales y horizontales. Las intersecciones entre líneas eran usadas como puntos test. Solo se fotografiaron las células que presentaban núcleo.

La densidad de volumen del RER en relación al citoplasma se calculó por la fórmula  $V_{v,c} = Pr/Pc$ , en la que  $Pr$  son los puntos sobre el RER y  $Pc$  los que ocupa el citoplasma. De igual manera se calculó la densidad de volumen granular,  $V_{v,g} = Pg/Pc$ , siendo  $Pg$  los puntos ocupados por los gránulos de pepsinógeno.

Las diferencias entre los distintos grupos se analizaron mediante la prueba T de Student, considerándose significativas para  $p < 0,01$ .

## RESULTADOS

A microscopía óptica, las células pepsinógenas del grupo control muestran una morfología piramidal, núcleo basal y redondeado y ápice repleto de gránulos secretorios (fig. 1). Sin embargo, en el grupo experimental estas células presentan un citoplasma carente de gránulos secretorios y ocupado por grandes vacuolas (fig. 2).

Ultraestructuralmente, pudimos confirmar las observaciones hechas anteriormente. El grupo control presenta cavidades del RER moderadamente dilatadas (0,028  $\mu\text{m}^2$ ) y un complejo de Golgi donde se observa la maduración final de los gránulos de pepsinógeno (fig. 3). En el grupo experimental, las cavidades del RER están ampliamente dilatadas (1,57  $\mu\text{m}^2$ ), mostrando tendencia confluyente (fig. 4). Como consecuencia de estos fenómenos, el citoplasma de las células del grupo experimental presenta un valor del 51,4% ocupado por las cavidades del RER, frente al 12,76% del control. Estas grandes cavidades desplazaban al núcleo y otros orgánulos celulares a la periferia celular (fig. 5), afectando incluso a la envoltura nuclear (fig. 6).

Aunque en la microscopía, en el grupo experimental no detectamos la presencia de gránulos de pepsinógeno, por microscopía electrónica y tras el estudio cuantitativo estos representaban el 3,22% del citoplasma, frente al 21,85% del grupo de control. Por último, encontramos que los gránulos de pepsinógeno en ambos grupos son de tamaño similar (tabla I).

## DISCUSION

El menor número de gránulos y el descenso del porcentaje de citoplasma ocupado por estos, nos indican que la ingesta de etanol puede estar en relación con una alta liberación de pepsinógeno. Este efecto ha sido descrito a nivel morfológico y bioquímico (3-5).

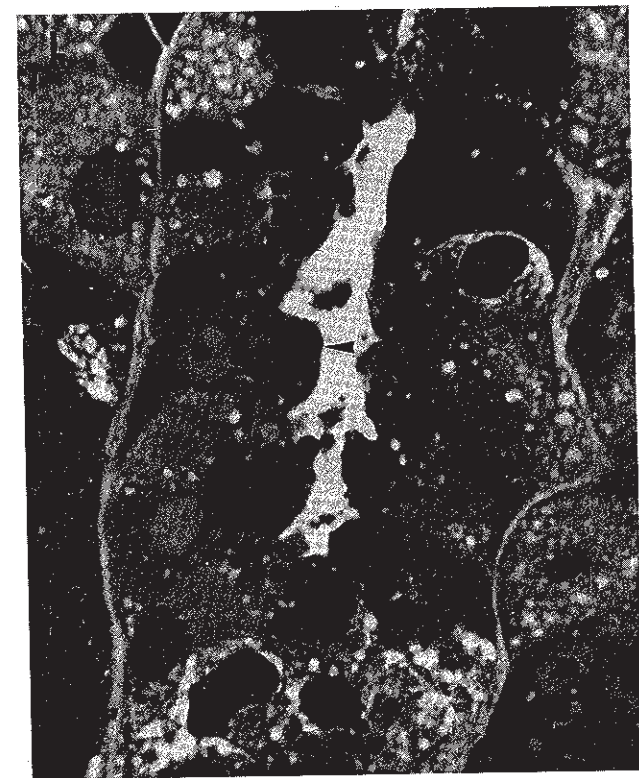


Fig. 1.—Grupo de control. Corte semifino mostrando el ápice ocupado por gránulos de pepsinógeno (punta de flecha), x 640.

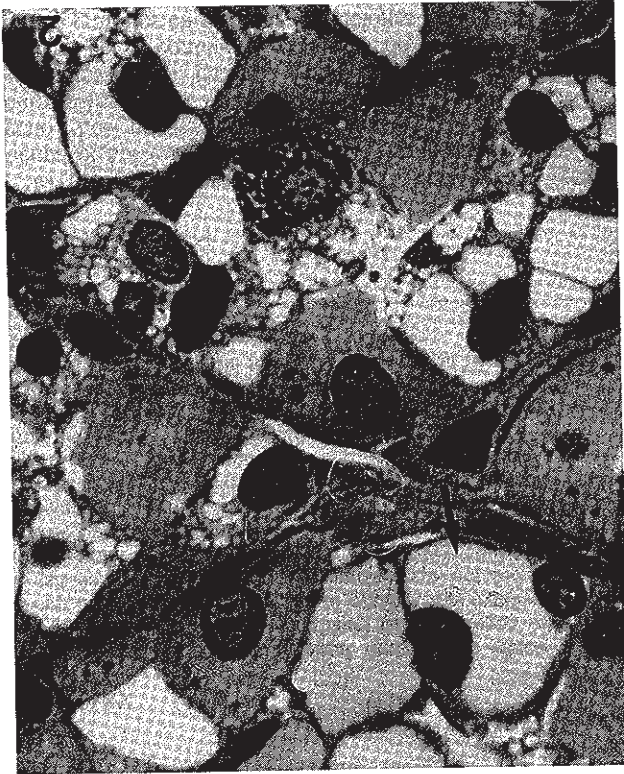


Fig. 2.—Grupo I. Corte semifino teñido con azul de toluidina. Células pepsinógenas: intensa vacuolización en el citoplasma (flecha), x 640.

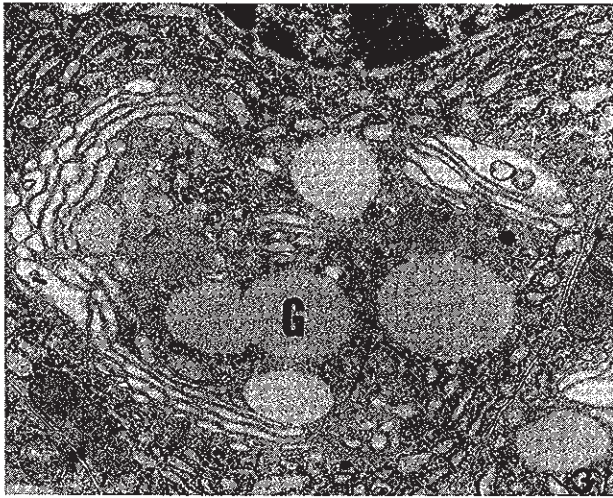


Fig. 3.—Complejo de Golgi de una célula pepsinógena del grupo de control. Gránulos (G) en diferentes periodos de maduración. x22.500.

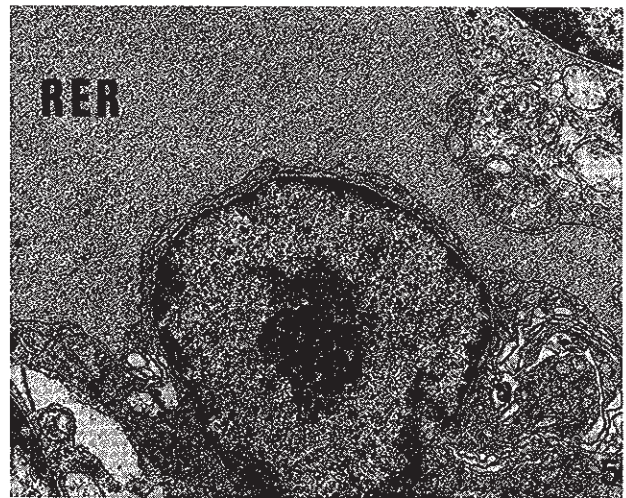


Fig. 5.—Grupo I. Porción del citoplasma de una célula pepsinógena ocupada por una cisterna del retículo endoplásmico rugoso (RER). El núcleo y otros órganos celulares ocupan la periferia. x11.000.

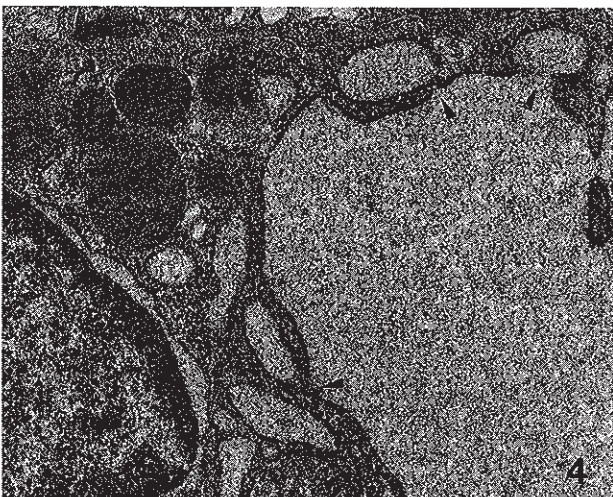


Fig. 4.—Grupo I. Cisternas dilatadas del retículo endoplásmico rugoso con tendencia confluyente (punta de flecha). x28.000.



Fig. 6.—Grupo I. Dilatación de la envoltura nuclear debida a la tendencia confluyente de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso (punta de flecha). x16.000.

HELANDER (11), usando un estimulante de la secreción gástrica como la pilocarpina, observa un descenso similar al descrito por nosotros en el porcentaje de citoplasma ocupado por gránulos de pepsinógeno. Sin embargo, este

autor detecta una disminución en el tamaño de los gránulos, mientras que en nuestro estudio, el tamaño se mantiene.

Según nuestros resultados morfológicos y cuantitativos podemos postular que el etanol actuaría sobre el proceso de elaboración del producto secretorio en las células pepsinógenas a nivel de retículo endoplásmico rugoso. En este orgánulo se impediría la etapa de formación de vesículas de transición, dilatándose las cavidades por acumulación de material, dando lugar a células intensamente vacuoladas que llegarían incluso a romperse, vertiendo todo su contenido en la luz glandular. Este fenómeno comportaría un aumento de pepsinógeno o precursores del mismo en la luz gástrica y explicaría los resultados obtenidos por JOHNSON, DAVENPORT y PUURUNEN y LAITINEN (3-5), que comentan la aparición de éstos tras producirse daños en la mucosa gástrica, bien por etanol o por otro agente agresivo.

Tabla I

Células pepsinógenas tras la ingesta crónica de etanol

	Control	Grupo I
Citoplasma: $\bar{X} \pm ES$ ( $\mu\text{m}^2$ ) .....	78,260 $\pm$ 6,830	85,610 $\pm$ 7,13
Gránulos: $\bar{X} \pm ES$ ( $\mu\text{m}^2$ ) .....	0,593 $\pm$ 0,060	0,628 $\pm$ 0,16
Cisternas del RER: $\bar{X} \pm ES$ ( $\mu\text{m}^2$ ) ..	0,028 $\pm$ 0,002	1,57 $\pm$ 0,33*
Densidad de volumen granular (% volumen citoplásmico) .....	21,850 $\pm$ 1,520	3,220 $\pm$ 1,16*
Densidad de volumen del RER (% volumen citoplásmico) .....	12,760 $\pm$ 0,910	51,400 $\pm$ 4,36*

\* Diferencia significativa con respecto al Control ( $p < 0,01$ ).

## BIBLIOGRAFIA

1. LANGLEY, J. N.; SEWAL, H.: «On the changes in pepsin-forming glands during secretion.» *J. Physiol.* 2: 281-301, 1879.
2. LANGLEY, J. N.: «On the histology of the mammalian gastric glands, and the relation of pepsin to the granules of the chief cells.» *J. Physiol.* 3: 269-291, 1881.
3. JOHNSON, L. R.: «Pepsin secretion during damage of the gastric mucosa by ethanol and acetylsalicylic acid.» *Gastroenterology*, 62: 412-416, 1972.
4. DAVENPORT, H. W.: «The gastric mucosal barrier. Past, present and future.» *Mayo Clin. Proc.* 50: 507-514, 1975.
5. PUURUNEN, J.; LAITINEN, L.: «Gastric mucosal oxidation of ethanol is not involved in ethanol-induced mucosal damage.» *Toxicol. Lett.* 14: 195-200, 1982.
6. DAYTON, M. T.; KAUFFMAN, G. L.; SCHELEGGEL, J. F.; CODE, C.H. F.; STEINBACH, J. H.: «Gastric bicarbonate appearance with ethanol ingestion.» *Am. J. Physiol.* 243: G105-G110, 1982.
7. TAKEUCHI, K.; OKABE, S.: «Role of luminal alkalization in repair process of ethanol-induced mucosal damage in rat stomach.» *Dig. Dis. Sci.* 28: 993-1000, 1983.
8. LASZEWICZ, W.; SLOMIANY, A.; MURTY, V. L. N.; LAU, Y. H.; SLOMIANY, B. C.: «Effect of ethanol on the peptic degradation of gastric mucus glycoprotein.» *Digestion* 31: 47-53, 1985.
9. PUURUNEN, J.: «Effect of ethanol on peptic activity in the rat stomach.» *Digestion*, 23: 97-103, 1982.
10. WEIBEL, E. R.: «Principles and techniques of electron microscopy.» Ed: Hayat, M. A. Van Nostrand Reinhold Co. New York, Vol. III, 409-426, 1973.
11. HELANDER, H. F.: «Quantitative ultrastructural studies on rat gastric zymogen cells under different physiological and experimental conditions.» *Cell Tiss. Res.* 189: 287-303, 1978.

Recibido: 3-III-88

not ingestion. Mechanism and significance.» *Dig. Dis. Sci.* 28: 449-455, 1983.