

**RESPUESTA DE LAS CELULAS PARIETALES  
A LA INGESTA DE ETANOL.  
ESTUDIO CUANTITATIVO Y ULTRAESTRUCTURAL**

**THE RESPONSE OF THE PARIETAL CELLS  
TO ETHANOL INGEST.  
A QUANTITATIVE AND ULTRAESTRUCTURAL STUDY**

J. TORREBLANCA\*, F.J. MORENO\*\*\*, F. IBAÑEZ\*\* y J.L. LOPEZ-CAMPOS\*\*\*

\* Dpto. de Biología E.U. Magisterio.

\*\* Hospital de Valme

\*\*\* Dpto. Ciencias Morfológicas. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

RESUMEN

En este trabajo mostramos las alteraciones morfológicas en células parietales de la mucosa gástrica inducidas por la ingesta de etanol. Para ello hemos utilizado dos grupos experimentales (Grupo I y Grupo II) a los que les suministrá-bamos, en una sola toma, 4'5 gr. de etanol (40% en solución salina)/Kg/día; durante 60 días. El Grupo I mantenía una dieta "ad libitum" mientras que el Grupo II instilaba el etanol en estómago vacío.

En ambos grupos observamos obliteración de los canalículos intracelulares y un aumento del sistema túbulovesicular. En el Grupo II las mitocondrias mos-traban fenómenos de hinchamiento y alteración de las crestas. En este grupo, el análisis cuantitativo nos indicaba un aumento del tamaño mitocondrial y de la fracción de citoplasma ocupada por éstas, mientras que su número disminuía.

Palabras Clave:

Células Parietales. Etanol. Análisis Cuantitativo.

SUMMARY

The purpose of this study is to show the toxic effects induced by ethanol ingestion on parietal cells of the gastric mucosa. Two groups of rats were once a day orally supplied with 4,5 gr ethanol (in 40% saline solution)/kg body weight for 60 days. The instillation was performed on animals which were either feed "ad libitum" (Group I) or subjected to periods of fast before and after the instillation (Group II). In both groups but especially in group II, morphological changes in the parietal cell cytoplasm were observed following the ethanol ingestion. These involved the narrowing of the intracellular canaliculi, the increasing in development of the tubuli-vesicular system, and the mitochondrial size. The number of mitochondria, however, was decreased.

Key Words:

Parietal cells. Ethanol. Quantitative analysis.

## INTRODUCCION

Las células parietales han sido extensamente estudiadas en relación con su estructura citológica (33), su fisiología (2, 3, 9, 10, 13, 15) y sus características citquímicas (6, 20, 27, 35).

Estudios ultraestructurales han detectado cambios morfológicos que han sido relacionados con cambios funcionales en la actividad secretora (1, 4, 9, 15, 19, 25, 30). Las estructuras celulares implicadas en este proceso son el sistema túbulo-vesicular, los canales intracelulares, superficie secretora y mitocondrias.

El etanol ha sido ampliamente estudiado como agente productor de daños en la mucosa gástrica. Este efecto es utilizado para comprobar la acción de drogas antilcerosas (7, 12, 14, 16, 17, 21, 22, 28, 29, 32, 33).

En este trabajo estudiamos las alteraciones morfológicas y cuantitativas de las células parietales tras la ingesta crónica de etanol.

## MATERIAL Y METODOS

Veinticuatro ratas macho Wistar pesando entre 200 y 350 g fueron alojadas en jaulas con una malla de alambre en el fondo para prevenir la coprofagia. Todos los animales fueron criados en el laboratorio bajo condiciones normales. Estos animales fueron distribuidos en cuatro grupos de seis miembros cada uno:

**GRUPO I:** Instilación (inubación gástrica) de 13 ml de etanol al 40% en solución salina/kg/día (4,5g de etanol/kg/día) con una dieta "ad libitum" y libre acceso al agua.

**CONTROL I:** Instilación de 13 ml de solución salina/kg/día con una dieta "ad libitum" y libre acceso al agua.

**GRUPO II:** Instilación de 13 ml de etanol al 40% en solución salina/kg/día (4,5 g. de etanol/kg/día) en estómago vacío. Los animales eran privados de comida por periodos de 9 horas antes y 3 después de la instilación, las doce horas restantes tenían un dieta "ad libitum" y libre acceso al agua.

**CONTROL II:** Instilación de 13 ml de solución salina/kg/día en las mismas condiciones que el grupo II.

La instilación en cada grupo tuvo lugar de 8 a 9 a.m.

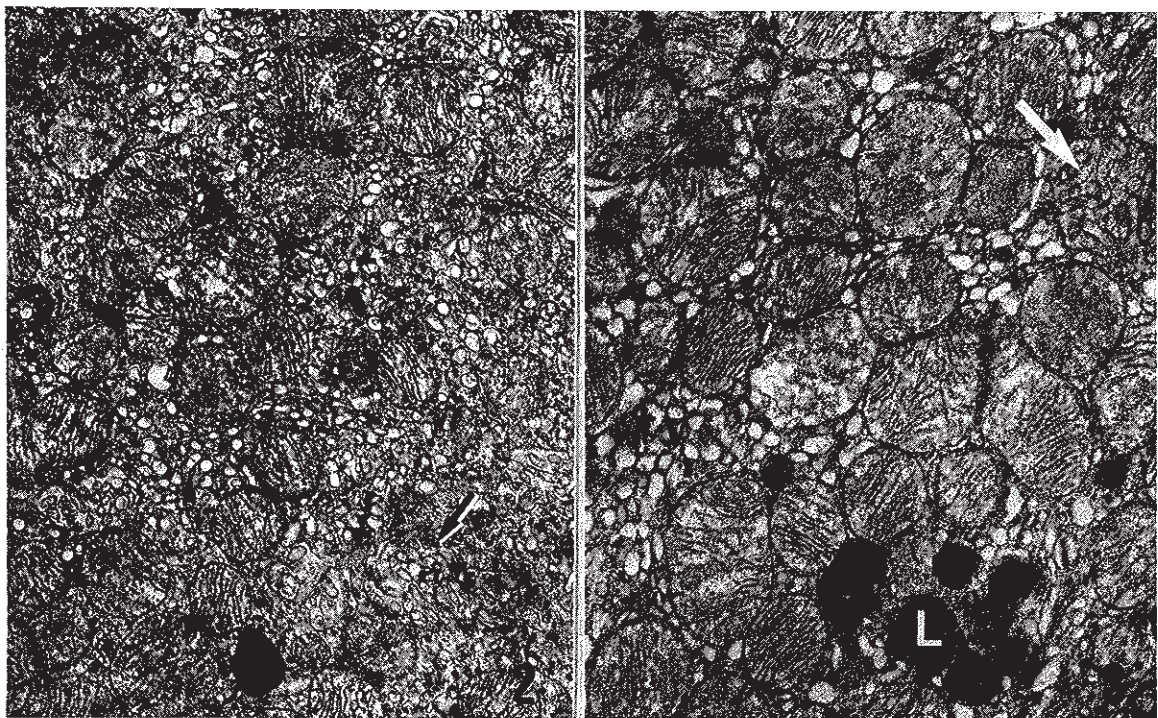
Tras 60 días de tratamiento y 24 horas de ayuno, los animales eran anestesiados con éter y laparotomizados. El estómago era abierto a lo largo de la curvatura menor y se obtenían pequeñas piezas de la mucosa gástrica dañada del fundus y fijadas en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,2 durante 3 horas a 4°C. A continuación las piezas eran lavadas en tampón cacodilato con 7,5% de sacarosa y postfijadas en  $\text{OsO}_4$  al 1% en el mismo tampón. El tejido era deshidratado en series crecientes de acetona y embido en resina Spurr.

Otras piezas eran incubadas en un medio que contenía  $\beta$ -glucuronidasa y nitrato de plomo en tampón Tris-HCl 0,5 M a pH 5 durante una hora a 37°C (23). Otros fragmentos eran incubados a 37°C durante 75 min. en un medio que contenía: 20 mM  $\beta$ -glucuronidasa, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM KCl y 20 mM  $\text{SrCl}_2$  en tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 9. A continuación se lavaba durante 15 minutos en tampón cacodilato 0,1 M y finalmente era incubadas durante 30 min. en tampón cacodilato con nitrato de plomo al 2% (8).

En ambas técnicas los fragmentos eran también incubados en el mismo medio sin  $\beta$ -glucuronidasa. Después de lavados en tampón cacodilato, los fragmentos eran postfijados en  $\text{OsO}_4$  al 1% en agua desionada a 4°C durante 3 min. Seguidamente se lavaron varias veces en agua desionada, tras lo cual se procedió a la deshidratación e inclusión en resina Spurr.

Los cortes finos eran obtenidos en un Ultracut E colodados sobre rejillas de cobre de 300 mallas y constata-copia electrónica fue realizada en un Siemens Elmiskop 102 operado a 80 Kv y las fotografías en película Agfa-Ceverit Scientia Film (6 x 9).

Los cortes semifinos, usados como controles, eran teñidos con azul de toluidina y observados en un fotomicroscopio Zeiss.



ANÁLISIS CUANTITATIVO

Para este estudio se realizaron 10 fotografías, por cada animal, de células parietales que mostraban el núcleo, y con un aumento final de 14.000x. Las células eran escogidas al azar a lo largo del istmo de la glándula gástrica.

Se utilizó el método de conteo de superficies mediante un IBAS I (Interactive Image Analysis System) y se obtuvo el tamaño ( $\mu\text{m}^2$ ) de las mitocondrias y del citoplasma, así como su relación en tanto por ciento (superficie mitocondrial/superficie citoplásmica).

El test T de Student fue usado para probar si había diferencias significativas entre los valores de distintos grupos. Con  $p < 0,05$ , la diferencia era considerada como significativa.

RESULTADOS

En nuestro estudio observamos un ligero descenso en el peso de los individuos del Grupo II durante el periodo experimental (Gráfica 1).

Los resultados morfológicos y cuantitativos no revelaron diferencias entre los grupos controles (Control I y Control II).

A microscopía óptica la insilación de etanol produce hiperemia y exfoliación de células superficiales, pero no se observan alteraciones en los elementos parietales (Fig. 1).

Ultraestructuralmente las células parietales pertenecientes a individuos del Grupo I presentan canales obliterados por microvellosidades. El sistema túbulo-vesicular está moderadamente desarrollado y próximo al canalículo intracelular. Las mitocondrias mostraban crestas finas, y en ocasiones, deformadas y rotas (Fig. 2).

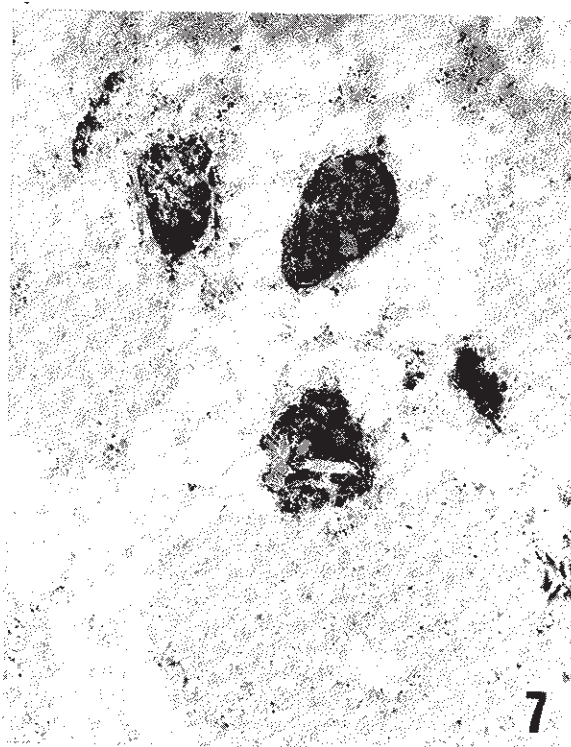
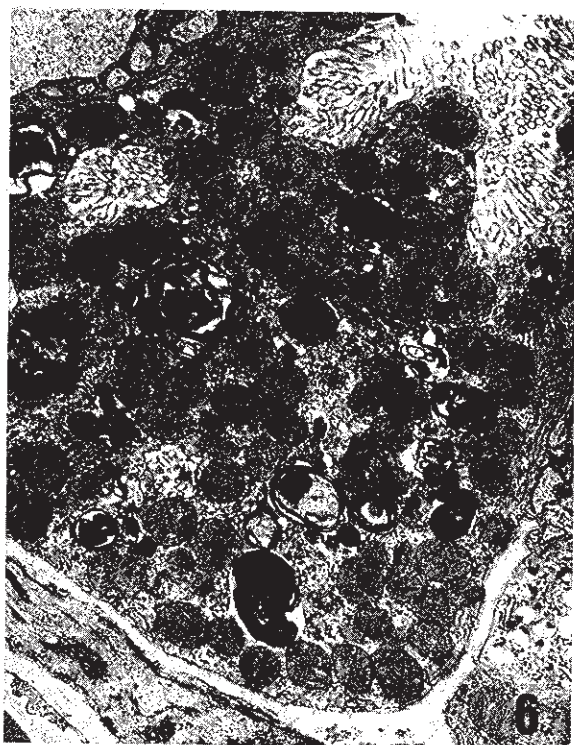
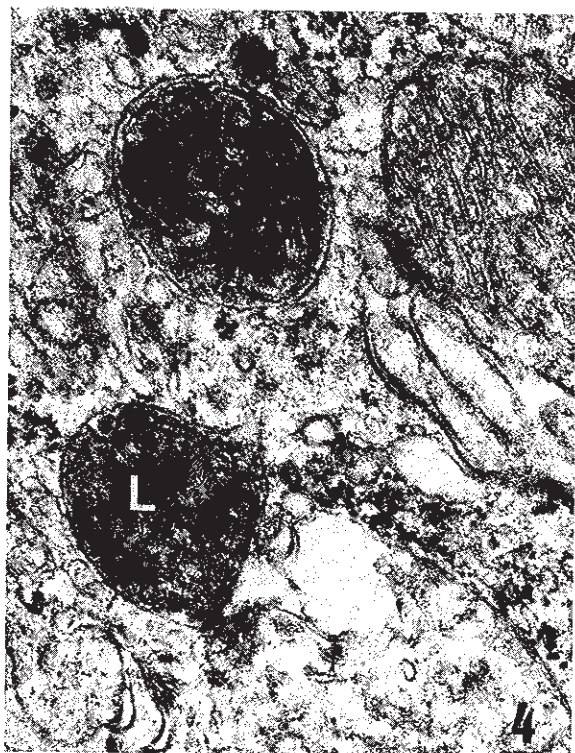
En el Grupo II el canalículo se mostró igualmente obliterado por microvellosidades. El sistema túbulo-vesicular está más desarrollado que en el grupo anterior y las mitocondrias mostraban desestructuración de las crestas (Fig. 3) y fusión con cuerpos lisosomales (Fig. 4). Junto a estos fenómenos degradativos observamos figuras mielínicas y estructuras pentalaminares asociadas a procesos de recuperación de membrana (Fig. 5). Como consecuencia de estos procesos encontramos elementos parietales con gran canti-

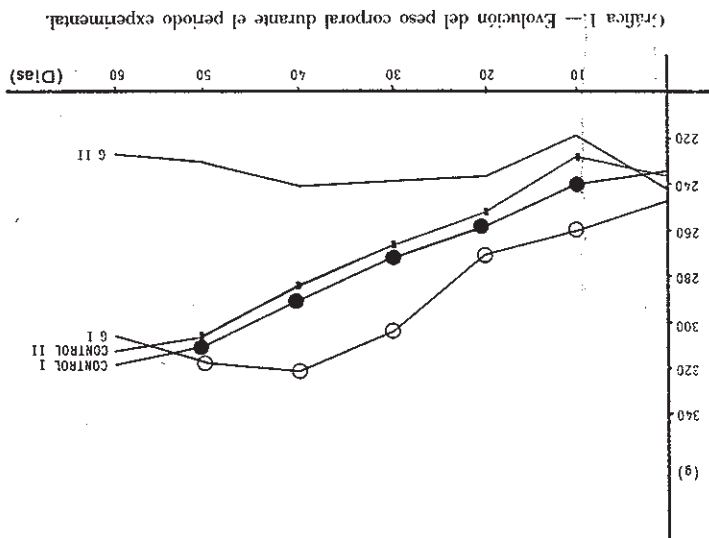
DISCUSION

El presente estudio realizado en células parietales, revela la insilación de etanol en diferentes condiciones fisiológicas (estómago lleno o vacío) con cambios morfológicos y alteraciones funcionales.

Diversos autores (9, 11, 26) localizan ATPasas específicas en las membranas del sistema túbulo-vesicular que interviene en el intercambio de  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$  con la posible finalidad de la formación de HCl intravesicular.

En nuestro estudio observamos en ambos grupos experimentales la obliteración del canalículo y aumento del sistema túbulo-vesicular. Estos datos morfológicos, según algunos autores (9, 13, 15, 20, 30), indican una transición hacia el estado de reposo funcional. Además de los cambios morfológicos descritos anteriormente, el etanol produce según nuestros resultados, la aparición de fenómenos degradativos. Este hecho concuerda con lo descrito por Moreno et al. (20), que obtiene resultados similares en células parietales de animales sometidos a largos periodos de ayuno. Estos autores observaron el incremento de la actividad fosfatasa lisosomal relacionada con un estado no secretorio. La actividad fosfatasa ácida debida a fenómenos degradativos expuesta en nuestros resultados, la hacemos corresponder con un estado no secretorio. Todos estos datos se acentúan cuando la insilación se produce en estómago vacío (Grupo II).





Gráfica 1.— Evolución del peso corporal durante el periodo experimental.

Nuestras observaciones demostraron repetidamente que los cuerpos densos provenían de mitocondrias cuyo volumen aumentó en los primeros estados de degradación, e hizo difícil observar la unidad de membrana en las crestas mitocondriales. Una parte de este incremento del área mitocondrial puede ser producida por fenómenos de división mitocondrial incompletos, explicando así el descenso del número medio de mitocondrias en el Grupo II.

Pensamos que los mecanismos causantes de la inhibición de la secreción de HCl en células parietales tras la insulación de etanol, son muy similares a los que se producen tras un largo periodo de ayuno. Así, el etanol produce una hipetrofia mitocondrial, con deformación de crestas y como resultado de esto un descenso de la síntesis de ATP.

Nosotros sugerimos una alteración del complejo  $K^+ H^+$  — ATPasa localizado en las membranas del sistema tubulovesicular, lo cual impediría el intercambio de  $H^+$  por  $K^+$  y como resultado de esto un descenso de la síntesis de ATP. En conclusión, creemos que el descenso de HCl en la luz gástrica se debe a fenómenos intracelulares, bien por alteraciones enzimáticas a nivel de membrana o bien por bloqueo de la fusión de tubulovesículas con la membrana plasmática.

- Figura 1.— Grupo II. Fenómeno de exfoliación intensa en las células superficiales de la mucosa gástrica tras la administración crónica de etanol (punta de flecha). Obsérvese los intensos fenómenos de hiperemia en lámina propia (flecha), x 900.
- Figura 2.— Grupo I. Citoplasma de la célula parietal mostrando un sistema tubulovesicular moderadamente desarrollado (punta de flecha) y canales intracelulares obliterados (flecha), x 10,500.
- Figura 3.— Grupo II. Citoplasma de la célula parietal mostrando canales intracelulares obliterados (flecha), sistemas tubulovesiculares amplamente desarrollados (TV), lisosomas (L) y mitocondrias con crestas alteradas, x 12,000.
- Figura 4.— Grupo II. Degradación mitocondrial por incorporación de orgánulos lisosomales (L), x 60,000.
- Figura 5.— Grupo II. Formación intramitocondrial de figuras membranosas (flecha blanca). Véase la presencia de figuras de recuperación de membrana (sistemas pentalaminares) (flecha), x 87,500.
- Figura 6.— Grupo II. Vacuolas autofágicas en el citoplasma de la célula parietal x 7,500.
- Figura 7.— Grupo II. Actividad fosfatasa ácida en vacuolas autofágicas de la célula parietal, x 42,000.



Figura 8.— Grupo II. Pliegues de la membrana plasmática basal en la célula parietal (puntas de flecha) x 32.000.

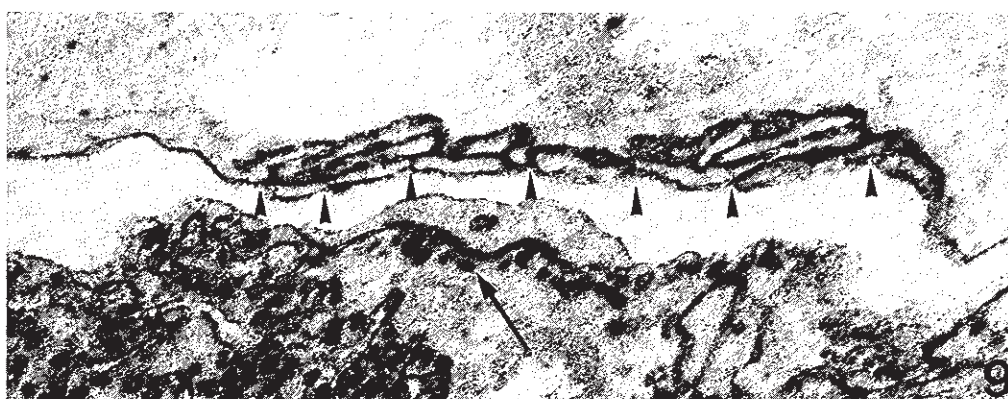


Figura 9.— Grupo II. Actividad fosfatasa alcalina en los pliegues basales de la célula parietal (puntas de flechas) y en la superficie adluminal de la célula endotelial (flecha). x 35.000.

TABLA I  
ANALISIS CUANTITATIVO DE LAS CELULAS PARIETALES

Parámetros	Unidad	Control I (N = 6)	Control II (N = 6)	Grupo I (N = 6)	Grupo II (N = 6)
Area Citoplásmica	$\mu\text{m}^2$	137,34 $\pm$ 4,96	136,85 $\pm$ 7,5	136,25 $\pm$ 7,12	131,85 $\pm$ 5,9
Area Mitocondrial	$\mu\text{m}^2$	0,55 $\pm$ 0,03*	0,54 $\pm$ 0,04*	0,55 $\pm$ 0,03*	1,05 $\pm$ 0,05*
<i>Superficie Mitocondrial</i>					
Superfi. Citoplásmica	%	30,05 $\pm$ 1,15*	31,24 $\pm$ 2,51*	32,72 $\pm$ 1,52*	48,18 $\pm$ 2,56
<i>Nº Mitocondrias</i>					
Células		75 $\pm$ 1,25*	78 $\pm$ 2,15*	80 $\pm$ 2,02*	61 $\pm$ 2,5

\* Valor p < 0,05 con respecto al grupo II

- gastroenterology with the selective antimuscarinic compound pirenzepine, *Stokholm Excerpta Medica*: 105-114.
- 20—MORENO, F.J.; PINERO, J.; COVENAS, R. and LOPEZ-CAMPOS, J.L. (1984): Enzymatic response to HCl inhibition in oxyntic cells of fasting rats. *Acta Histochem. Cytol.*, 17: 379-386.
- 21—NAGASHIMA, R.; HOSHINO, E.; HINOHARA, Y.; SAKAI, K.; HATA, S. and NAKANO, H. (1983): Effect of sucralose on ethanol induced gastric mucosal damage in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.*, 18 suppl., 83: 17-20.
- 22—OHNO, T.; OHTSUKI, H. and OKABE, S. (1985): Effects of 16, 16 dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> on ethanol-induced and aspirin-induced gastric damage in the rat. *Scanning electron microscopic study. Gastroenterol.*, 88: 353-361.
- 23—PUURUNEN, J. and LAITINEN, L. (1982): Gastric mucosal oxidation of ethanol is not involved in ethanol-induced mucosal damage. *Toxicol. Lett.*, 14: 195-200.
- 24—REED, B.L. and WENZEL, D.G. (1975): The lysosomal permeability test modified for toxicity testing with cultured heart endothelial cells. *Histochem. J.*, 7: 115-126.
- 25—ROSENFELD, G.C. (1983): Pirenzepine (LS519): A weak inhibitor of acid secretion by isolated rat parietal cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 86: 99-101.
- 26—SAGCOMANI, G.; HELANDER, H.F.; CRAIGO, S.; CHANG, H.H.; DAILEY, D.W. and SACHS, G. (1979): Characterization of gastric mucosal membranes. *Immunological studies of gastric (H<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)-ATPase. J. Cell. Biol.*, 83: 271-283.
- 27—SANNES, P.T.; KATSUYAMA, T. and SPIGER, S.S. (1979): Cytochemical properties of mitochondria in the gastric parietal cell. *J. Histochem. Cytochem.*, 24: 873-877.
- 28—SCHMIDT, K.L.; HENAGAN, J.M.; SMITH, G.S.; HILBURN, P.J. and MILLER, T.A. (1985): Prostaglandin cytoprotection against ethanol induced gastric injury in the rat. A histologic and cyto-logic study. *Gastroenterol.*, 88: 649-659.
- 29—SOLDATO, P.; FOSCHI, D.; BARIN, L. and DANIOTTI, S. (1985): Comparison of the gastric cytoprotective properties of atropine, ranitidine and PGE in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 106: 53-58.
- 30—STACHURA, J.; KONTUREK, S.J.; CIESZKOWSKY, M.; DĄBROS, W.; ZAKRZEWSKA, J. and KONTUREK, J. (1983): Comparison of the effect of omeprazole—a substituted benzimidazole and ranitidine—a potent H<sub>2</sub> receptor antagonist—on histamine-induced gastric acid secretion on the ultrastructure of canine parietal cells. *Hepato-Gastroenterol.*, 30: 205-210.
- 31—TAIRA, K.; YASUMO, K. and SHIBASAKI, S. (1984): A freeze-fracture study on the basolateral plasma membrane of the gastric parietal cells in fasting and re-fed rats. *Arch. Histol. Jap.*, 47: 495-503.
- 32—TAKEUCHI, K. and OKABE, S. (1983): Role of luminal alkalization in repair process of ethanol-induced mucosal damage in rats stomach. *Dig. Dis. Sci.*, 28: 993-1000.
- 33—UEDA, F.; ARATANI, S.; NIMURA, K.; KIMURA, K.; NOMURA, A. and ENOMOTO, H. (1984): Effects of 2,4-diamino-6-(chlorophenyl)—s-diazine maleate (Mn-1695) on gastric mucosal damage induced by various necrotizing agents in rats. *Arzneim-Forsch.*, 34: 478-484.
- 34—VIAL, J.D. and ORREGO, H. (1960): Electron microscope observation on the fine structure of parietal cells. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 7: 367-371.
- 35—WOLLIN, A. (1984): Carbonic anhydrase activity in amphotropic uptake in isolated gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.*, 247: C213-219.
- 1—BICKEL, M. and HEARLING, A.W. (1985): Stimulation of gastric acid secretion in dogs, rats and isolated guinea pig parietal cells by forskolin. *IRCS, Med. Sci.*, 13: 38-39.
- 2—BLOM, H. and HELANDER, H.F. (1981): Quantitative ultrastructural studies on parietal cell regeneration in experimental ulcer in rat gastric mucosa. *Gastroenterol.*, 80: 334-343.
- 3—BLOM, H. (1982): Immature parietal cells in healing gastric wounds respond to stimulation. An experimental study in rats. *Digestion*, 24: 29-35.
- 4—BLOM, H. (1983): Cimetidine and parietal cell regeneration in experimental wounds in rat gastric mucosa. A light and electron microscopic study. *Scand. J. Gastroenterol.*, 18: 853-857.
- 5—CHELLI, R. and GIACOSA, A. (1983): Atrophic gastritis. In: *Pre-cancerous Lesions of the Gastrointestinal Tract*. Ed. Raven Press. New York, pp. 155-169.
- 6—COULTON, G.R. and FIRTH, J.A. (1983): Cytochemical evidence for functional zonation of parietal cells within the gastric glands of the mouse. *Histochem. J.*, 15: 1141-1150.
- 7—DAYTON, M.T.; KAUFFMAN, G.L.; SCHLEGEL, J.F.; CODE, C.H. F. and STEINBACH, J.H. (1983): Gastric bicarbonate appearance with ethanol ingestion. Mechanism and significance. *Dig. Dis. Sci.*, 28: 449-455.
- 8—ERNST, S.A. and MILLS, J.V. (1977): Basolateral plasma membrane localization of ouabain sensitive sodium transport sites in the secretary epithelium of the avian salt gland. *J. Cell. Biol.*, 75: 74-94.
- 9—FORTE, J.G.; BLACK, J.A.; FORTE, T.M.; MACHEN, T.E. and WOLOSIN, J.M. (1981): Ultrastructural changes related to functional activity in gastric oxyntic cells. *Am. J. Physiol.*, 241: C349-358.
- 10—HELANDER, H.F. (1976): Stereological changes in rat parietal cells after vagotomy and antrectomy. *Gastroenterol.*, 71: 1010-1018.
- 11—HELANDER, H.F.; SMOLKA, A.; RAMSAY, C.; SACHS, G. and FELLENIUS, E. (1983): Localization of gastric K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>-ATPase. *Hepato-Gastroenterol.*, 30: 72-76.
- 12—HOLLANDER, D.; FARNAWSKI, A.; IVEY, K.J.; DE ZEEBY, A.; ZIPSER, R.D.; McKENZIE, W.N. and McFARLAND, W.D. (1982): Archidonic acid protection of rat gastric mucosa against ethanol injury. *J. Lab. Clin. Med.*, 100: 296-308.
- 13—ITO, S.; SCHOFFELD, G.C. (1978): Ultrastructural changes in mouse parietal cells after high H<sup>+</sup> secretion. *Acta. Physiol. Scand. Special Suppl.*: 25-34.
- 14—ITO, S. and LACY, E.R. (1985): Morphology of rat gastric mucosal damage, defense, and restitution in the presence of luminal ethanol. *Gastroenterol.*, 88: 250-260.
- 15—JACOBS, D.M. and STURTEVANT, R.P. (1982): Circadian ultrastructural changes in rat gastric parietal cells altered feeding regimens: A morphometric study. *Anat. Rec.*, 203: 101-113.
- 16—LACY, E.R. and ITO, S. (1982): Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. *Gastroenterol.*, 83: 619-625.
- 17—LACY, E.R. and ITO, S. (1984): Rapid epithelial restitution of the rat gastric mucosa after ethanol injury. *Lab. Invest.*, 51: 573-583.
- 18—LEESON, T.S. (1972): Parietal cell cannabul: A freezeetch study. *Cytobiol.*, 5: 352-362.
- 19—LOPEZ-CAMPOS, J.L.; MORENO, F.J. and PINERO, J. (1982): Effect of pirenzepine on mucous histochemistry and on gastric secretory ultrastructure. *Excerpta Medica Symposium advances in*