

# Enteropatía hipertensiva portal inflamatoria crónica en la rata

Fernando Sánchez-Patán<sup>a</sup>, María Ángeles Aller<sup>a</sup>, María Teresa Corcuera<sup>b</sup>, Elena Vara<sup>c</sup>, Isabel Casado<sup>b</sup>, Fernando Gómez<sup>b</sup>, Cruz García<sup>c</sup>, María José Alonso<sup>b</sup> y Jaime Arias<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Cátedra de Cirugía. Departamento de Cirugía I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España.

<sup>b</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Carlos III. Madrid. España.

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España.

## Resumen

**Introducción.** La enteropatía hipertensiva portal tendría naturaleza inflamatoria y cursaría con remodelación intestinal. Para demostrar esta hipótesis se realizó este trabajo.

**Material y método.** Ratas macho Wistar con hipertensión portal (HTP) por ligadura parcial de la vena porta, se han dividido en 4 grupos: grupo I (control; n = 9) y grupo II (HTP; n = 8), a los 3 meses de evolución; grupo III (control, n = 8) y grupo IV (HTP; n = 10) de 1 año de evolución. Se ha estudiado la densidad de células caliciformes duodenales y la concentración ileal de factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-10 por una técnica de ELISA.

**Resultados.** A los 3 meses de evolución, en las ratas con HTP aumentaron el número de células caliciformes ( $103,63 \pm 14,37$  frente a  $99,42 \pm 9,19/1.000 \mu\text{m}^2$ ) y la concentración ileal de TNF $\alpha$  ( $0,20 \pm 0,09$  frente a  $0,08 \pm 0,02$  pmol/mg proteína) ( $p < 0,05$ ) e IL-1 $\beta$  ( $0,40 \pm 0,21$  frente a  $0,19 \pm 0,09$  pmol/mg proteína) y disminuyó ( $p < 0,05$ ) la IL-10 ( $0,06 \pm 0,02$  frente a  $0,12 \pm 0,03$  pmol/mg proteína). En las ratas con HTP al año de evolución se observa una hiperplasia de células caliciformes en el intestino delgado ( $172,79 \pm 40,46$  frente a  $121,76 \pm 20,74/1.000 \mu\text{m}^2$ ) ( $p < 0,01$ ), que se asocia con un aumento ( $p < 0,05$ ) de las concentraciones ileales de TNF $\alpha$  ( $0,37 \pm 0,18$  frente a  $0,17 \pm 0,08$  pmol/mg proteína), IL-1 $\beta$  ( $0,28 \pm 0,14$  frente a

$0,205 \pm 0,05$  pmol/mg proteína) e IL-10 ( $0,25 \pm 0,14$  frente a  $0,20 \pm 0,11$  pmol/mg proteína).

**Conclusiones.** El incremento de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y la disminución de IL-10 en el intestino delgado de ratas con hipertensión portal prehepática crónica son indicativos de un proceso inflamatorio asociado a la hiperplasia de células caliciformes que sería la causa de la remodelación epitelial intestinal que ocurre a largo plazo en este modelo experimental.

**Palabras clave:** Hipertensión portal. Remodelación esplácnica. Citocinas. Rata. Células caliciformes.

## CHRONIC INFLAMMATORY PORTAL HYPERTENSIVE ENTEROPATHY IN THE RAT

**Introduction.** Experimental portal hypertensive enteropathy could have an inflammatory etiopathogenesis and, if so, it would produce intestinal remodeling. The aim of this study was to test this hypothesis.

**Material and method.** Male Wistar rats with portal hypertension (PHT) produced by partial portal vein ligation were divided into four groups: group I (control; n = 9), group II (PHT; n = 8) at 3 months after surgery, group III (control; n = 8), and group IV (PHT; n = 10) at 1 year after surgery. The density of duodenal goblet cells and ileal levels of tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-10 were studied using an ELISA method.

**Results.** At 3 months after surgery, rats with PHT showed an increase in the number of goblet cells in the small bowel ( $103.63 \pm 14.37$  vs  $99.42 \pm 19.19/1,000 \mu\text{m}^2$ ). This change was associated with an increase ( $p < 0.05$ ) in ileal levels of TNF $\alpha$  ( $0.20 \pm 0.09$  vs  $0.08 \pm 0.02$  pmol/mg protein), and IL-1 $\beta$  ( $0.40 \pm 0.21$  vs  $0.19 \pm 0.09$  pmol/mg protein), as well as with a decrease ( $p < 0.05$ ) in ileal IL-10 levels ( $0.06 \pm 0.02$  vs  $0.12 \pm 0.03$  pmol/mg protein). At 1 year after surgery, rats with PHT showed hyperplasia of goblet cells in the small bowel ( $172.79 \pm 40.46$  vs  $121.76 \pm 20.74 /1,000 \mu\text{m}^2$ ) ( $p < 0.01$ ), associated with an increase in ileal levels of

Trabajo realizado mediante ayudas de la Consejería de Sanidad. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Ref. N.º 01011 y 04047-00).

Correspondencia: Dra. M.A. Aller.  
Cátedra de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad Complutense.  
Pza. de Ramón y Cajal, s/n. 28040 Madrid. España.  
Correo electrónico: maaller@med.ucm.es

Manuscrito recibido el 20-3-2006 y aceptado el 25-4-2006.

**TNF $\alpha$  (0.37  $\pm$  0.18 vs 0.17  $\pm$  0.08 pmol/mg protein) (p < 0.05), IL-1 $\beta$  (0.28  $\pm$  0.14 vs 0.205  $\pm$  0.05 pmol/mg protein), and IL-10 (0.25  $\pm$  0.14 vs 0.20  $\pm$  0.11 pmol/mg protein).**

**Conclusions.** The increase in TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels and the decrease in IL-10 level in the small bowel in rats with chronic prehepatic PHT suggest the existence of an inflammatory process related to goblet cell hyperplasia. This inflammation could be responsible for the intestinal epithelial remodeling that occurs in the long term in this experimental model.

**Key words:** Portal hypertension. Splanchnic remodeling. Cytokines. Rat. Goblet cells.

## Introducción

Las alteraciones intestinales que se producen en la hipertensión portal son principalmente vasculares, con aumento del número y el tamaño de los vasos mucosos y submucosos, y por esta razón se ha propuesto la denominación de "vasculopatía intestinal hipertensiva portal"<sup>1</sup>. Sin embargo, también se ha descrito la asociación de inflamación inespecífica con estas alteraciones vasculares<sup>2-4</sup>. Así, el intestino presenta un infiltrado inflamatorio crónico constituido por células mononucleares y se asocia con atrofia de las vellosidades, edema de la lámina propia, proliferación muscular y engrosamiento de la muscularis mucosa<sup>2,4</sup>.

En ratas con hipertensión portal prehepática, la vasculopatía intestinal se asocia con incremento de la infiltración de la mucosa y submucosa por células cebadas<sup>5,6</sup>. Por esta razón, se ha propuesto que la enteropatía hipertensiva portal experimental podría tener naturaleza inflamatoria mediada por las células cebadas, cuyos mediadores estarían implicados en su fisiopatología<sup>5-7</sup>. En este supuesto, las alteraciones estructurales que se producen a largo plazo en esta enteropatía se corresponderían con un proceso de remodelación de características similares al que se describe en otros procesos inflamatorios crónicos<sup>8</sup>.

Para demostrar la existencia de alteraciones estructurales intestinales, así como su relación con mediadores de la inflamación, en la enteropatía hipertensiva portal crónica, se determinaron la densidad de células calciformes y las concentraciones de factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-10 en el intestino delgado de ratas con triple ligadura parcial de la vena porta (TLPP) a los 3 meses y 1 año de evolución postoperatoria.

## Material y método

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar procedentes del Animario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid con pesos corporales que oscilaron entre 250 y 300 g.

El procedimiento experimental empleado en este estudio se efectuó según los principios para el cuidado y la utilización de los animales de experimentación, publicados en España en el RD 1202/2005.

Para su estudio, los animales fueron divididos en 4 grupos: 2 grupos control de 3 meses (n = 9) y 1 año (n = 8) de evolución (grupos I y III, respectivamente), y 2 grupos con hipertensión portal (HTP) prehepática

por TLPP de 3 meses (n = 8) y 1 año (n = 10) de evolución (grupos II y IV, respectivamente).

Todos los animales fueron sacrificados por sobredosis de tiopental sódico una vez concluido el tiempo de evolución previsto para cada grupo.

## Técnica quirúrgica de hipertensión portal

Se anestesió a las ratas con ketamina (80 mg/kg) y xilacina (12 mg/kg) por vía intramuscular. Se realizó una laparotomía media, desplazando las asas intestinales y el estómago a la izquierda del animal, y los lóbulos hepáticos medio y lateral izquierdo en sentido craneal mediante una torunda de algodón subdiafragmática. A continuación, se disecó el tramo de vena porta comprendido entre el drenaje de la vena gastroduodenal y el hilio hepático. Para realizar la TLPP se fijaron 3 ligaduras de seda 4/0 a una guía Silastic con 3 muescas, cuya finalidad es mantenerlas equidistantes. Las estenosis fueron calibradas por ligadura simultánea alrededor de la vena porta y de un catéter 20 G, que posteriormente se retiró con el fin de permitir la reexpansión parcial de la vena porta hasta ese calibre conocido (20 G; 1,2 mm de diámetro externo). La laparotomía se cerró en dos planos con catgut y seda 2/0<sup>9</sup>.

## Estudio histológico intestinal

En todos los animales se reseco la segunda porción del duodeno, proximalmente al drenaje del colédoco. El duodeno fue perfundido intraluminalmente con suero salino. Posteriormente, las muestras fueron fijadas con formol al 10%, deshidratadas e incluidas en parafina. Secciones de 5  $\mu$ m perpendiculares a la luz intestinal fueron teñidas con hematoxilina-eosina, visualizadas con un microscopio digital (Leica DM 5000B) y las imágenes obtenidas fueron valoradas con un sistema de análisis de imagen (Qwin, Leica Microsystems). En todas las muestras se cuantificó el número de células calciformes en un área de, al menos, 150.000  $\mu$ m<sup>2</sup>, y el resultado se expresó como número de células calciformes/1.000  $\mu$ m<sup>2</sup> de epitelio glandular.

## Preparación de homogeneizados intestinales

Las muestras de íleon se congelaron inmediatamente tras su extracción y se introdujeron en tubos de polipropileno (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, Estados Unidos) que contenían tampón de lisis a 4 °C (10 ml de tampón/g de tejido). El tampón de lisis contiene fenilmetilsulfonil fluor (PMSF; Sigma Chemical Company), pepstatina A 1  $\mu$ g/ml (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), antipaina (Sigma Chemical Company) y leuceptina en tampón fosfato a pH 7,2 con el 0,05% de azida sódica. Las muestras se homogeneizaron 3 veces durante 30 s con un homogeneizador eléctrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminister, Estados Unidos) a máxima velocidad, y se midió el volumen final de homogeneizado con una pipeta graduada. A continuación, se centrifugaron a 3.000 g, y se congeló el sobrenadante a -80 °C para permitir la formación de agregados macromoleculares.

## Citocinas intestinales

Se midió las concentraciones de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 en íleon mediante una técnica de ELISA utilizando kits comerciales específicos para rata (BioNOVA Científica Ltd., Madrid, España). La concentración mínima detectable de TNF $\alpha$  es de 0,5 pg/ml. El rango de variación intraensayo oscila entre el 3,1% (mínimo de la curva estándar) y el 4,2% (máximo), con una variabilidad entre ensayos del 5,2 al 5,6%. La concentración mínima detectable de IL-1 $\beta$  es de 1,5 pg/ml. El rango de variación intraensayo oscila entre el 3,5% (mínimo de la curva estándar) y el 4,3% (máximo), con una variabilidad entre ensayos del 6,1 al 7,4%. La concentración mínima detectable de IL-10 es de 2,5 pg/ml. El rango de variación intraensayo oscila entre el 4,2% (mínimo de la curva estándar) y el 7,5% (máximo), con una variabilidad entre ensayos del 5,8 al 9,3%.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4254315>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4254315>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)