

## **Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados en el modelo de colitis ulcerosa experimental inducida por ácido-2,4,6-trinitrobencenosulfónico: estudio histoquímico y estructural**

Ana M<sup>a</sup> Sánchez, M<sup>a</sup> Isabel Torres

*Programa de Doctorado "Biología Molecular y Celular". Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén.*

[mitorres@ujaen.es](mailto:mitorres@ujaen.es)

### **Resumen**

La administración intrarrectal de ácido 2,4,6 trinitrobencenosulfónico (TNBS) en animales de experimentación induce el desarrollo de la colitis ulcerosa, resultando en alteraciones histológicas a nivel de la mucosa intestinal y la producción de inflamación, así demostrada por un incremento en la actividad de la mieloperoxidasa. Este estudio evalúa la influencia de diferentes dietas suplementadas con ácidos grasos mono- y poliinsaturados sobre el grado de recuperación estructural tras el daño inducido por TNBS, así como sobre el porcentaje de células caliciformes y el grado de maduración de la mucina producida por estas células. Los cambios en las mucinas intestinales están directamente unidos a un equilibrio dinámico entre su biosíntesis por parte de las células caliciformes y su degradación dentro del lumen intestinal, por ello es pertinente cuantificar los efectos de la dieta sobre la síntesis y la secreción de glicoproteínas neutras, ácidas y sulfatadas. La composición de la dieta tal como hemos demostramos en este trabajo, influye en la arquitectura de la mucosa intestinal y en el modelo de secreción de las mucinas. De acuerdo con nuestros datos, la suplementación de la dieta con aceites de oliva (n-9) y de pescado (n-3) parece tener un papel protector en la inflamación de la colitis ulcerosa.

### **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad inflamatoria intestinal comprende dos entidades clínicas crónicas, llamadas colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, que se caracterizan por una inflamación activa crónica. Tanto la colitis ulcerosa como la enfermedad de Crohn son enfermedades de naturaleza autoinmune, aunque la etiología no es clara, su patogénesis es mejor conocida, representando la interacción de tres factores esenciales: a) la susceptibilidad del paciente, b) la microflora entérica y c) la inmunidad de la mucosa. (Podolsky 2002, *N Engl J Med*, 347: 417-429; MacDonald et al, 2000. *Scand J Immunol* 51: 2-9).

Las células epiteliales de la mucosa intestinal son la primera barrera de contacto con los patógenos que invaden al intestino. Por ello, estas células juegan un papel decisivo en la generación y transmisión de señales entre patógenos (MacDonald et al, 2000. *Scand J Immunol* 51: 2-9). El epitelio intestinal está cubierto por un gel mucoso protector (mucina) compuesto predominantemente por glicoproteínas que son sintetizadas y secretadas por las células caliciformes. Además de esta función protectora, actúan como una barrera selectiva para la absorción de nutrientes (Hayashi et. al., 2001 *Digestion* 63 *Suppl.* 1:28-31). De ahí, el interés de determinar todos aquellos parámetros que puedan afectar a la

biosíntesis de las mucinas, alterar su composición química o aumentar su degradación.

Los ácidos grasos poliinsaturados (ACPI) de cadena larga (con 20 y 22 átomos de carbono) modulan propiedades como la fluidez de las membranas, la permeabilidad para el intercambio metabólico, la actividad de receptores de membrana y enzimáticos, y señales de transducción eléctrica y humoral. Estos AGPI de cadena larga, son precursores indispensables para la síntesis de diferentes grupos de prostaglandinas, tromboxanos y leukotrienos que son potentes reguladores de varias funciones celulares y tisulares (Owen et. al., 1984 *Trends Biochem SCI*, 9:238-42.; Stuling et. al., 2003. *Int Arch Allergy Immunol* 132:310-321).

Según la posición del doble enlace terminal, los ácidos grasos se agrupan dentro de las series omega-9, omega-6 y omega-3. El organismo humano puede introducir dobles enlaces en la posición omega-9, pero no lo puede hacer en las posiciones omega-6 y omega-3, por lo que éstos dos ácidos grasos son considerados nutrientes esenciales.

El propósito de este estudio es analizar las alteraciones histológicas en el intestino de rata tras la administración de TNBS, así como la evaluación de algunos parámetros indicadores de la lesión celular susceptibles de medida, como el análisis de los cambios producidos en el número de las células caliciformes, así como las variaciones en la naturaleza del contenido mucínico contenido en dichas células tras el tratamiento con TNBS. Asimismo analizaremos los posibles efectos terapéuticos que producen la ingesta de diferentes dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados en la recuperación estructural del tejido dañado tras la inducción de colitis ulcerosa por TNBS, y el efecto de estas distintas dietas sobre el grado de maduración de las mucinas. Presenta especial interés la utilización de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (AGPI n-3) por sus efectos sobre los procesos inflamatorios, así como sobre la modulación de la respuesta inmune.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Diseño experimental*

Un total de 120 ratas macho de la raza Wistar ( $200 \pm 20$  g) fueron alimentadas con una dieta estándar (Panlab S.L., Barcelona, España) durante 4 semanas. Los animales se colocaron en jaulas con condiciones apropiadas para permitir una alimentación "ad libitum". Se mantuvieron en condiciones de humedad y temperatura adecuada y con ciclo luz-oscuridad de 12 horas.

### *Inducción de CU*

La inducción de la colitis experimental se llevó a cabo mediante modificación del modelo de Morris et. al. 1989. *Gastroenterology*. 96(3):795-803. Tras someter a las ratas a un ayuno de 24 horas, se anestesiaron con 200 g/ L de uretano (1 ml/100g de peso corporal) y se les insertó un catéter de poliuretano de 2.6 mm de diámetro hasta ángulo esplénico del colon, a 8 cm del ano. Se constituyeron dos grupos de animales, a uno de ellos se les administró en la luz intestinal un enema de TNBS en etanol al 30%, a una dosis de 80 mg/ Kg/ peso corporal, manteniendo a las ratas en posición de Trendelenburg durante 1 minuto. El resto de animales constituyeron el grupo control, suministrándoles un enema compuesto por el mismo volumen, pero de solución salina al 0.9%.

### Dietas

Los animales se dividieron en 8 grupos diferentes de 10 animales cada uno (n=10) y se le administró los distintos tipos de dietas semipurificadas, la composición de la dieta así como la composición de ácidos grasos se observan en las tablas 1 y 2 respectivamente.

**Tabla 1.** Composición de las dietas

COMPONENTES	CANTIDAD(g/kg)
Caseína	220.5
Almidón	455.8
Aceite*	37.5
Sacarosa	150.0
Celulosa	80.0
L-methionina	4.0
Cloruro de colina	2.0
Suplemento Mineral	50.0
Suplemento Vitaminico	0.2

\* AGMI n-9 :37.51 g/kg de una mezcla de aceite de oliva(62.5%), aceite de soja (11.1%) y aceite refinado de coco (26.4%); AGPI n-3: 26.26 g/kg de aceite de oliva(70% de la grasa total) y 11.25 g/kg de aceite de pescado (30% de la grasa total ); AGPI n-3+n-6: 26.26 g/kg de aceite de oliva (70% de la grasa total) y 11.25 g/kg de fosfolípidos purificados de cerebro de cerdo (30% de la grasa total).

**Tabla 2.** Composición en ácidos grasos \*.

Fatty acids	n-9 AGMI s	n-3 AGPI s	n-3+n-6 AGPI s
16 : 0	12.77	14.17	12.02
16 : 1n-7	n.d.	0.95	0.47
18: 0	3.72	4.25	4.04
18: 1n-9	51.36	51.10	50.29
18: 2n-6	23.64	24.13	25.70
18: 3n-3	2.02	2.08	2.38
20: 1n-9	1.15	n.d.	0.30
20: 2n-6	n.d.	n.d.	0.23
20: 3n-6	0.82	n.d.	0.05
20: 4n-6	n.d.	n.d.	0.30
22: 1n-9	0.48	n.d.	n.d.
20: 5n-3	n.d.	1.69	0.05
22: 6n-3	n.d.	0.89	0.33

\*Expresada como porcentaje del total de ácidos grasos poliinsaturados; n.d.: no detectado.

El gran número de dobles enlaces de estos ácidos grasos les hace especialmente oxidables, por lo que se recomienda la administración conjunta de antioxidantes. Aunque las preparaciones de aceite de pescado llevan vitamina E, se hizo una suplementación de alfa-tocoferol (0.058g/ Kg. de dieta) y de palmitato de ascorbilo (0.016g/ g dieta) para evitar la peroxidación lipídica.

Se establecieron los siguientes grupos de experimentación con sus respectivos grupos controles:

**-Grupo TCh** . Animales a los que se les administrado TNBS que recibieron la dieta inicial.

**-Grupo Tn-9**, Animales a los que se les administrado TNBS que recibieron dieta suplementada con AGMI de la serie n-9

**-Grupo Tn-3**. Animales a los que se les ha inducido la colitis ulcerosa recibieron una dieta suplementada con AGPI de la serie n-3

**- Grupo Tn-3+n-6**. Animales a los que se les administrado TNBS que recibieron dieta suplementada con AGPI de las series n-3 y n-6

Tras 1 semana de la administración de las distintas dietas, todos los grupos de animales fueron sacrificados, tomando muestras para su procesamiento a microscopía óptica.

#### *Actividad mieloperoxidasa*

La actividad mieloperoxidasa (MPO) es directamente proporcional al número de neutrófilos, utilizándose como índice cuantitativo del grado de inflamación. Utilizamos el método modificado de Grisham et. al., 1994. *J Pharmacol Exp Ther.* 271(2):1114-21.

#### *Microscopía óptica*

Se obtuvieron cortes de 5 micras de grosor y posteriormente se tiñeron con ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) y azul Alcian (AA) (pH= 2.5), para determinar la naturaleza química del contenido mucínico de las células caliciformes (8). El reactivo de Schiff permite demostrar la presencia de polisacáridos, tiñendo de coloración rosa las mucinas neutras. El azul Alcian pone de manifiesto aquellas células con mucosustancias de carácter ácido, del tipo de sialomucinas (coloración azul).

#### *Análisis Morfométricos; número de células caliciformes*

Para determinar el número de células caliciformes por cripta se seleccionaron al azar 15 criptas completas de cada animal. En cada una de éstas criptas se determinó el número total de células caliciformes PAS + (neutras) y AA+ (ácidas). Los resultados se expresaron como porcentajes.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados son expresados como media  $\pm$  SEM. Utilizamos un análisis de la varianza ANOVA *one-way*. La comparación entre los valores de los resultados se realizó por un test de Bonferroni. Todos los datos fueron evaluados para una significación estadística con el programa BMDP (Dixon et. al. 1990. *BMDP Statistical Software Manual*. University of California Press, Berkeley, CA).

## **RESULTADOS**

Tras la administración intrarrectal de TNBS se produce un aumento significativo de la actividad mieloperoxidasa (MPO) respecto al grupo control ( $13180 \pm 750$  vs  $3516 \pm 353$ ,  $p < 0.05$ ), lo cual es indicativo del grado de infiltración de polimorfonucleares e inflamación.

A microscopía óptica observamos la marcada presencia de inflamación que se produce fundamentalmente a nivel de la mucosa colónica de los animales tratados

con TNBS. La lámina propia presenta un aspecto edematoso, los capilares están dilatados y por lo tanto la extravasación de eritrocitos es muy frecuente. Es fácil hallar la presencia de un infiltrado inflamatorio de neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (Fig. 1). Los neutrófilos penetran entre las células epiteliales de las criptas formando abscesos, y posteriormente criptitis (inflamación de las criptas). Finalmente se produce la ulceración microscópica de la mucosa del colon, haciendo que se pierda parte del área epitelial.

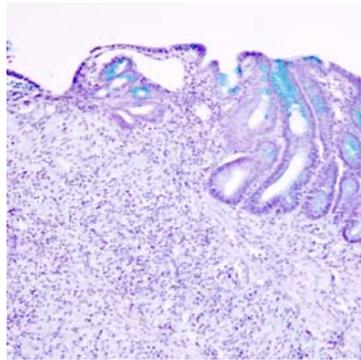


Figura 1. Microscopía óptica de animales tratados con TNBS. X 200

En las zonas con criptitis aparecen áreas con acumulación de sustancias mucínica y restos celulares, indicando en cierto modo una asociación de la inflamación de las criptas con la descarga del contenido mucínico de las células caliciformes (Fig. 2).

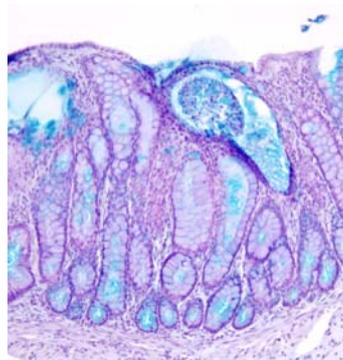
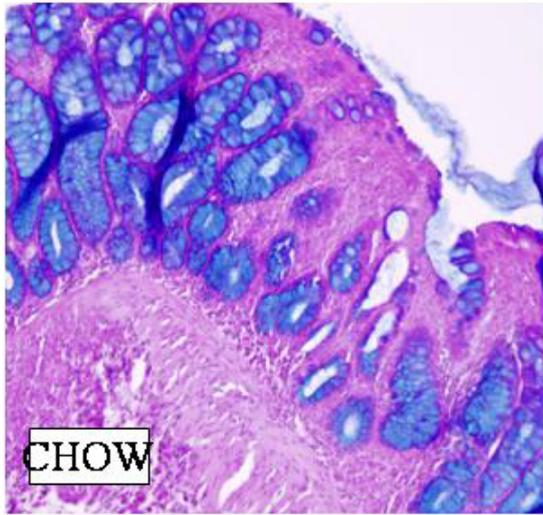


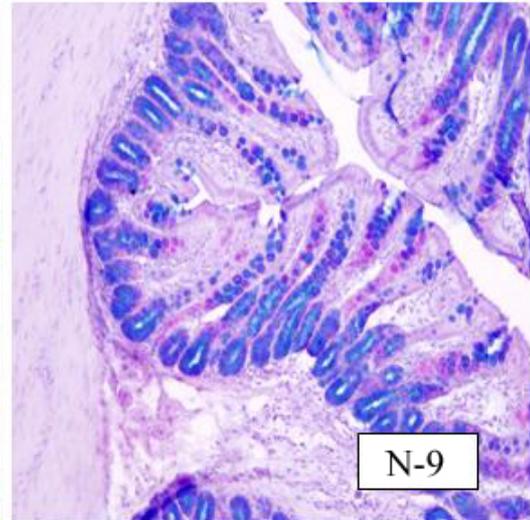
Figura 2. Microscopía óptica de animales tratados con TNBS. X 200

La colitis inducida por TNBS se manifiesta por aumento significativo en el número de células caliciformes por cripta y por diferencias en la naturaleza del contenido mucínico de las mismas, siendo mayor la proporción de mucosustancias neutras. Sin embargo decrece significativamente el porcentaje de sialomucinas (tabla 3).

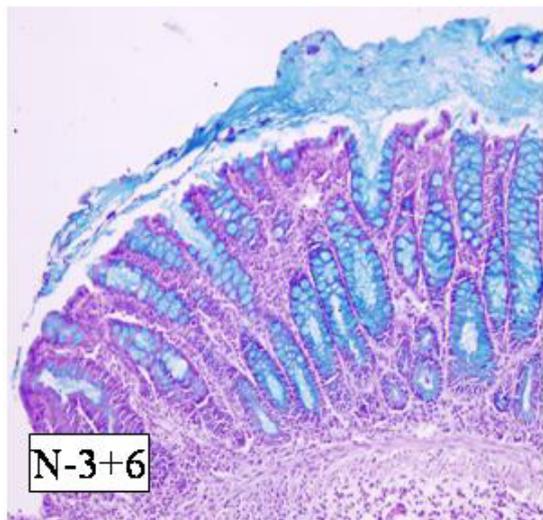
	<b>Tabla 3. Células caliciformes por cripta y tipo de mucina</b>			
	<b>Células/ cripta</b>	<b>%PAS +</b>	<b>%PAS-AA+</b>	<b>%AA+</b>
<b>TNBS</b>	46.47±1.87 <sup>a</sup>	7.10±1.46 <sup>b</sup>	80.30±2.77 <sup>a</sup>	13.03±2.29
<b>Control</b>	28.50±1.49	2.18±0.83	30.85±2.34	66.97±2.61



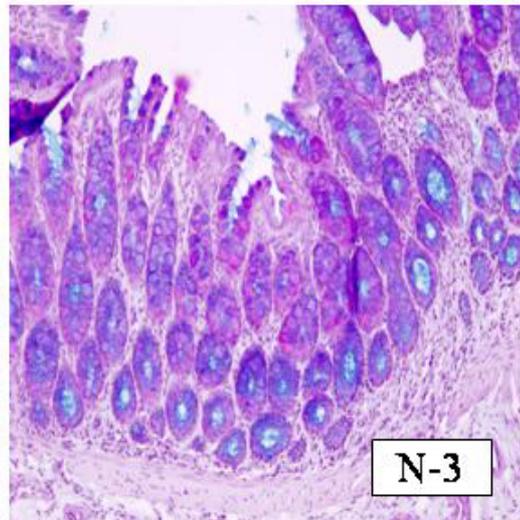
**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**

*Influencia de la dieta en la colitis ulcerosa inducida por TNBS*

Tras la administración de las distintas dietas durante 1 semana, analizamos los valores de la actividad mieloperoxidasa (MPO) para ver el efecto de las mismas sobre el grado de inflamación producido por la administración de TNBS (Tabla 4)

Todos los grupos experimentales presentaban alteraciones debido al TNBS (TCh, Tn-3, Tn-3+n-6 y Tn-9), aunque ese grado de alteración variaba según la dieta recibida en el periodo de recuperación.

En el grupo TCh observamos alteración de la mucosa, observándose distorsiones en la arquitectura normal de las criptas, como fusiones entre ellas en la

región apical y vertido de mucina intraluminal. En la zona de las criptas aparecían áreas con acumulación de mucina y restos celulares. La lámina propia aparece engrosada y con una intensa infiltración de leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, eosinófilos, y macrófagos (Figura 5). En los grupos Tn-9 (Figura 6) y Tn-3+n-6 (Figura 7) todas estas manifestaciones eran mucho más prominentes, en especial el grupo Tn-3+n-6 (Figura 7) que presentaba una fuerte fusión de las criptas en las áreas apicales. Además había evidencias de una fuerte peroxidación lipídica representada por áreas PAS + de la lámina propia. También aparecen abundantes áreas bursiformes (restos de criptas dilatadas, de epitelio engrosado anormalmente con apariencia pluricelular, sin apenas células caliciformes y, en ocasiones con contenido mucínico y restos celulares). A nivel del epitelio, las áreas de ulceración y descamación del mismo, provocadas por TNBS son frecuentes e intensas en los grupos Tn-9 y Tn-3+n-6.

**Tabla 4.** Actividad mieloperoxidasa tras la inducción de colitis y con las diferentes dietas

<b>Dieta</b>	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo TNBS</b>
n-9	2992±353	7586±1100 <sup>c</sup>
n-3	4016±442	5392±749 <sup>c</sup>
n-3+n-6	6060±466 <sup>ab</sup>	11180±979 <sup>abc</sup>
chow	3322±234	9448±875.2 <sup>bc</sup>

Los resultados están expresados mU de proteína para MPO como media aritmética ±SEM; n=10 para cada grupo. Control: grupos tratados con NaCl al 0.9%; colitis: grupos tratados con 80 mg/kg de peso de TNBS.; MPO: mieloperoxidasa. Significación estadística: P<0.005; a: vs. vko; b: vs. n-3; c: vs. el correspondiente control

En el grupo Tn-3 (Figura 8) la dilatación de las criptas era significativamente menor, así como la fusión y distorsión de las mismas, el lumen no aparecía dilatado y con poco o ningún contenido mucínico vertido. No se pudo detectar en este grupo ningún área bursiforme. El grupo Tn-3 fue, comparativamente, el grupo menos afectado con pocas áreas ulcerosas y mayor preservación del epitelio.

Se detectaron alteraciones tanto en el número total de células caliciformes por cripta como en el contenido mucínico de las mismas, descubriéndose una influencia del factor dieta. En los grupos TCh, Tn-3 y Tn-9, comparados con sus respectivos grupos control (CCh, Cn-3 y Cn-9) se encontró un aumento muy significativo del número total de células caliciformes por cripta, mientras que en el grupo Tn-3+n-6 se observa una fuerte reducción del número de células caliciformes por cripta (tabla 5).

En cuanto a la naturaleza de la mucina contenida en las células caliciformes se observó que en todos los grupos controles son mayoritarias las células AA+ (ácidas) reflejando un alto grado de maduración mucínica. Sin embargo, los grupos Cn-9 y Cn-3+n-6 presentan hay una disminución significativa del número de células AA+ frente al grupo control CCh, que sólo puede ser debido al factor dieta. El grupo TCh presentó graves alteraciones de la composición mucínica, aumentando considerablemente los porcentajes de células PAS+ y PAS-AA+ respecto a su grupo control y disminuyendo fuertemente el número de células AA+ . El comportamiento del grupo recuperado con AGPI n-3 difiere fuertemente del grupo TCh en cuanto al número de células PAS-AA+ y AA+ y no difiere nada respecto a su grupo control. Por su parte, el grupo Tn-3+n-6 presenta mayor cantidad de células inmaduras (PAS+).

**Tabla 5.** N° total de células caliciformes/cripta

Grupo	N° total/cripta
CCh	28.50±1.49
Cn-3	30.63±0.87
Cn-3+n-6	37.60±1.15 <sup>a1b3</sup>
Cn-9	26.37±1.39 <sup>c1</sup>
Tch	46.47±1.87 <sup>d1</sup>
Tn-3	44.23±1.74 <sup>d1</sup>
Tn-3+n-6	16.38±2.58 <sup>d1e1f1</sup>
Tn-9	49.29±5.88 <sup>d1g1</sup>

Los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  SEM. **a:** vs. Cch; **b:** vs. Cn-3; **c:** vs. Cn-3+n-6; **d:** Cada grupo TNBS vs. su Control; **e:** vs. Tn-3; **g:** vs. Tn-3+n-6. 1:  $p < 0.001$ ; 2:  $p < 0.01$ ; 3:  $p < 0.05$ .

**Tabla 6.** Porcentaje relativo de células mucina PAS+, AA- y AA+

Grupo	%PAS+	%PAS-AA+	%AA+
CCh	2.18±0.83	30.85±2.34	66.97±2.61
Cn-3	7.82±2.04 <sup>a3</sup>	32.19±3.26	59.99±4.80
Cn-3+n-6	18.33±1.76 <sup>a1b1</sup>	40.00±2.22	41.67±2.10 <sup>a1b2</sup>
Cn-9	4.81±1.16 <sup>c1</sup>	30.16±4.45	65.03±4.95 <sup>c1</sup>
Tch	7.10±1.46 <sup>d3</sup>	80.30±2.77 <sup>d1</sup>	12.60±2.25 <sup>d1</sup>
Tn-3	2.81±1.12 <sup>d3</sup>	46.55±5.38 <sup>d2e1</sup>	50.64±5.76 <sup>e1</sup>
Tn-3+n-6	4.17±2.85 <sup>d1</sup>	4.17±2.85 <sup>d1e1f1</sup>	91.67±5.69 <sup>d1e1f1</sup>
Tn-9	12.10±2.81 <sup>d2f1g2</sup>	48.33±6.90 <sup>d2e1g1</sup>	39.57±8.99 <sup>d1e1g1</sup>

Los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  SEM. **a:** vs. Cch; **b:** vs. Cn-3; **c:** vs. Cn-3+n-6; **d:** Cada grupo TNBS vs. su Control; **e:** vs. Tn-3; **g:** vs. Tn-3+n-6. 1:  $p < 0.001$ ; 2:  $p < 0.01$ ; 3:  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

La presencia de áreas de ulceración con pérdida del epitelio intestinal de la mucosa, la presencia de infiltración a nivel de la lámina propia y la aparición de criptitis son características del tratamiento con TNBS (Hibi et. al. 2002. *Gastroenterology* 37: 409-417). Esta criptitis puede ser potencialmente utilizada para detectar de forma rápida y eficaz las alteraciones inflamatorias en ausencia de marcadores bioquímicos específicos.

Utilizamos la tinción PAS/AA para distinguir entre mucina de naturaleza neutra y ácida. El contenido celular de mucina neutra es PAS + en contraste con la mucina ácida que es AA +. Las mucinas ácidas son un indicador de la función secretora epitelial del colon, y está compuesta principalmente por sulfomucinas y sialomucinas (Singh et. al. 1989. *J Clin Pathol* 42:881-4.). La alteración de la composición de las mucinas podría ser la causa de la disminución de la protección de la mucosa en la enfermedad inflamatoria intestinal inducida por TNBS y reflejaría la respuesta a la alteración por diferentes componentes de las distintas

dietas. El análisis de la naturaleza química de la mucina identificada puede ser útil como indicador temprano del daño epitelial del colon. Hemos detectado cambios en la composición química de la mucina intestinal en respuesta al daño inducido por TNBS y por el efecto de la suplementación con las diferentes dietas.

Los cambios en las mucinas intestinales están directamente unidos a un equilibrio dinámico entre su biosíntesis por parte de las células caliciformes y su degradación dentro del lumen intestinal, por ello es pertinente cuantificar los efectos de la dieta sobre la síntesis y la secreción de glicoproteínas neutras, ácidas y sulfatadas. Por tanto, la composición de la dieta tal como hemos demostrado en este trabajo, influye en la arquitectura de la mucosa intestinal y en el modelo de secreción de las mucinas.

Nuestros resultados sugieren que el incremento en el número de células caliciformes en el grupo TNBS puede reflejar un aumento en la proliferación celular como mecanismo de reparación tisular en respuesta al daño inducido por el hapteno (TNBS). Esta hipótesis está sustentada por el cambio que se produce en la naturaleza química de la mucina contenida en las células caliciformes. El incremento en el porcentaje de células PAS+ (contienen mucosustancias neutras) pone en evidencia que el proceso de maduración de las células caliciformes se ve alterado, probablemente en relación con el incremento que se produce en la proliferación celular de dichas células. Las células caliciformes se pueden ver forzadas a tener que realizar una rápida protección (en respuesta al daño inducido por el TNBS) secretando mucinas de naturaleza inmadura en áreas que aparentemente no aparecían patológicamente alteradas. Destaca la anormal distribución en ambas regiones, a nivel basal y apical, de las células AA+ y la pérdida de éstas a nivel epitelial en contacto con el lumen.

La dieta puede regular la función secretora de las células caliciformes. Las mucinas son responsables de las propiedades de protección en el tracto gastrointestinal y son sintetizadas y secretadas por células especializadas llamadas células caliciformes. Además de esta función actúan como una barrera selectiva para la absorción de nutrientes. De ahí, el interés de determinar todos aquellos parámetros que puedan afectar a las biosíntesis de las mucinas, alterar su composición química o aumentar su degradación. Por tanto, la composición de la dieta influye en la arquitectura de la mucosa intestinal y en el modelo de secreción de las mucinas.

Los estudios a microscopía óptica evidenciaron que sólo los animales alimentados con dieta AGMI n-9 y AGPI n-3, los que mostraban una buena reparación del epitelio, la respuesta inflamatoria fue menor en estos grupos como se demostró por una significativa disminución de la actividad MPO. Se sabe que las prostaglandinas contra-inflamatorias tienen un efecto citoprotector en la mucosa intestinal previniendo la ulceración y el daño celular (Wallace et. al. 2001. *Gastroenterol Clin North Am.* 30(4):971-80). Otros eicosanoides, como el LT B4 son mediadores de la inflamación y son importantes en la colitis ulcerosa porque pueden alterar las funciones de absorción y secreción, e incluso la inmunidad celular (Hillier et. al., 1991. *Gut* 32:1151-55.). La presencia de ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3) en el aceite de pescado podría contribuir a limitar la síntesis de LTB4. De acuerdo con nuestros datos, la suplementación de la dieta con aceites de oliva y de pescado parece tener un papel protector en la inflamación de la colitis ulcerosa.