

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana
Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" (ICBP)

Efectos del ácido fólico sobre las características histológicas del páncreas en conejos alcohólicos adolescentes

Folic acid effects upon histological characteristics of pancreas in alcoholic adolescent rabbits

Liana Yanet Rojas Rodríguez^I, Aleida Herrera Batista^{II}, Héctor Juan Ruiz Candina^{III}, Jaime Valenti Pérez^{IV}

^I Especialista Primer Grado en Histología. Profesora Auxiliar. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Enrique Cabrera". La Habana. Cuba. e.mail: lyanetr@infomed.sld.cu

^{II} Doctora en Ciencias Médicas. Especialista Segundo Grado. Profesora Titular y Consultante. ICBP "Victoria de Girón". La Habana. Cuba. e.mail: aleidajosefa@infomed.sld.cu

^{III} Especialista Segundo Grado en Estomatología General Integral. Profesor Auxiliar. ICBP "Victoria de Girón". La Habana. Cuba. e.mail: aleidajosefa@infomed.sld.cu

^{IV} Especialista Segundo Grado en Histología. Profesor Titular. ICBP "Victoria de Girón". La Habana. Cuba. e.mail: jvalenti@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: la hepatitis y la pancreatitis constituyen las complicaciones más frecuentes del alcoholismo crónico.

Objetivo: determinar el efecto del ácido fólico sobre las características histológicas del páncreas en la pancreatitis alcohólica de conejos machos adolescentes.

Material y Métodos: se utilizaron 24 conejos adolescentes divididos en cuatro grupos experimentales: Grupo A (tratados con etanol), B (tratados con etanol y ácido fólico), C (tratados con ácido fólico) y D (control). A las 16 semanas de

tratamiento se practicó eutanasia; se extrajeron fragmentos del páncreas de 1cm³ para estudio histológico.

Resultados: el grupo tratado con etanol presentó zonas normales alternando con zonas que mostraron material hialino y acidófilo en la luz de los conductos intra e interlobulillares y epitelio aplanado en los conductos intralobulillares pequeños, así como signos de tumefacción en los acinos. El grupo control y el tratado con ácido fólico no mostraron alteraciones histológicas. El grupo tratado con etanol y ácido fólico presentó una apariencia bastante normal con sólo escasos conductos alterados.

Conclusiones: el consumo de etanol provocó alteraciones histológicas en el páncreas a la dosis y tiempo utilizados, que pudieran catalogarse como una pancreatitis sub-aguda que fueron evitadas en gran medida con el tratamiento con ácido fólico.

Palabras clave: alcoholismo, adolescencia, pancreatitis alcohólica, ácido fólico, conejo.

ABSTRACT

Introduction: hepatitis and pancreatitis are the most frequent complications of chronic alcoholism.

Objective: the purpose of this paper was to determine the effect of folic acid on histological features of alcoholic pancreatitis in male adolescent rabbits.

Material y Methods: twenty four adolescent rabbits divided into 4 groups were used: Group A (treated with ethanol), group B (treated with ethanol and folic acid) group C (treated with folic acid), group D (untreated controls). The experiment lasted 16 weeks. At that moment, fragments of pancreatic tissue of one centimeter were obtained for histological study.

Results: group D present areas with ducts intra and interlobulars ducts with acidophilic and hialinic material between areas with normal ducts. There were planed epithelial cells in small ducts, instead of cubic cells; and in acinars cells it was found tumefaction signal. Groups B and C did not present alterations at all. Group treated with ethanol and folic acid presented appearance almost normal with few ducts with alteration.

Conclusions: ethanol provoked histological features alterations on pancreas and it was avoided with acid folic treatment

Key words: alcoholism, adolescence, alcoholic pancreatitis, folic acid, rabbits.

INTRODUCCIÓN

La ingestión de bebidas alcohólicas constituye un problema de salud a nivel mundial, que reduce aproximadamente 10 años la expectativa de vida y produce más fallecimientos que el abuso de cualquier otra droga psicoactiva.^{1, 2}

Reportes de la literatura señalan un aumento del consumo de alcohol por parte de los adolescentes³ y se considera esta etapa de la vida como un factor de riesgo para el consumo del tóxico, determinado por factores como la reafirmación de la

independencia, la virilidad, la libertad en la adopción de decisiones, creencia de determinados mitos o imitación a los adultos.⁴

El consumo excesivo de bebidas alcohólicas provoca daños biológicos, psicológicos y sociales que afectan al individuo, sobre todo, en la adolescencia, donde se plantea que un solo estado de embriaguez puede ocasionar daños irreversibles en diversos órganos.⁵

Una de las consecuencias más frecuentes del alcoholismo es la pancreatitis, tanto aguda como crónica. La misma se define como una enfermedad inflamatoria caracterizada por cambios morfológicos irreversibles, que cursa con dolor intenso en la porción superior del abdomen y se identifica por disfunción de la porción exocrina y endocrina; aunque de esta última se tiene poca información. Se ha planteado que en el páncreas puede encontrarse destrucción irreversible del parénquima, reducción del tejido glandular, fibrosis proliferativa, calcificación y estenosis ductal.⁶

Se reconoce que el estrés oxidativo está vinculado al daño tisular que ocasiona el consumo de alcohol^{7, 8} y se ha señalado el efecto antioxidante que tiene el ácido fólico.⁹⁻¹¹ Por esta razón, cabría esperarse que la suplementación con esta vitamina sea un recurso adecuado para minimizar o contrarrestar los efectos del etanol. Teniendo en cuenta lo antes planteado, el presente trabajo tuvo como **objetivo** determinar el efecto del ácido fólico sobre las características histológicas en la pancreatitis alcohólica de conejos machos adolescentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental, prospectivo y descriptivo para lo cual se utilizaron 24 conejos de la raza Nueva Zelanda, machos, de 100 días de vida postnatal. Se conformaron cuatro grupos, de idéntico tamaño, de la siguiente forma:

Grupo A: tratados con etanol.

Grupo B: tratados con etanol y ácido fólico.

Grupo C: tratados con ácido fólico.

Grupo D: control.

La asignación a cada grupo se hizo al azar utilizando una tabla de números aleatorios. Se colocaron en jaulas separadas, se numeraron y marcaron. Se les suministró pienso para conejo *ad libitum*. Para el tratamiento con etanol se midió la cantidad de agua ingerida diariamente por los animales y se halló la media de estas cantidades. Se les suministró sólo esa cantidad de agua diaria a la cual se añadió una dosis total de 5 gramos /kg de peso corporal de etanol. Los conejos se pesaron todas las semanas y con los valores obtenidos se calculó la cantidad de etanol a suministrar. El tratamiento tuvo una duración de 16 semanas. Este esquema de tratamiento se realizó teniendo en cuenta resultados de estudios anteriores de nuestro laboratorio.¹² A los animales del grupo B, además se les suministró ácido fólico a razón de 1mg/kg de peso corporal por día. Los del grupo C fueron tratados con ácido fólico a la misma dosis diluido en agua como único tratamiento, los animales del grupo D recibieron sólo agua. Al final de la experiencia los animales

fueron anestesiados y se sometieron a eutanasia. Se extrajo el páncreas y se tomaron fragmentos de 1cm³, los cuales se fijaron en formalina neutra tamponada a 12%. Los fragmentos se procesaron por el método de inclusión en parafina y se obtuvieron cortes de cuatro micrómetros, que se colorearon con hematoxilina y eosina.

En el estudio histológico del páncreas se evaluaron las siguientes variables cualitativas: ¹³

Tumefacción celular: Dada por la presencia de vacuolas claras en el citoplasma de las células acinares.

Edema tisular: Presencia de un exceso de fluido en el tejido intersticial que se observa como el incremento en la separación de los elementos tisulares. Se tradujo como áreas no teñidas.

Reacción inflamatoria aguda: Presencia de leucocitos en el área observada y se clasificó de la forma siguiente:

Ausente (0): Ninguna célula de la inflamación en el tejido.

Ligera (x): Presencia de células de la inflamación aisladas.

Moderada (xx): Grupos de células de la inflamación en algunas áreas.

Intensa (x x x): Células inflamatorias ocupando áreas extensas en el tejido.

Muerte por apoptosis: Células con núcleos con cromatina marginada y en forma de media luna, talla aparentemente menor que el resto de las células.

Necrosis celular: Células con aumento de la eosinofilia, con aspecto hialino y más homogéneo que el de las células normales, vacuolización citoplasmática y signos de cariólisis en los núcleos por desvanecimiento de la cromatina.

Hemorragia intersticial: Presencia de elementos formes de la sangre en el tejido intersticial.

Taponamientos intraductales: Presencia de material hialino y acidófilo en la luz de los conductos.

Fibrosis perilobulillar e intralobulillar: Sustitución de los acinos pancreáticos por tejido fibroconectivo que se clasificó como:

Fibrosis perilobulillar: Se distribuye de forma irregular.

Fibrosis intralobulillar: Se encuentra distribuida de manera uniforme con fibrosis periacinar.

RESULTADOS

En los animales del grupo tratado con etanol y en el momento de la eutanasia se observó como dato macroscópico importante que el tejido pancreático de los conejos fue muy escaso y disperso. El estudio histológico reveló en estos conejos presencia de signos de tumefacción celular de las células parenquimatosas acinares en algunas zonas del tejido, contrastando con otras aparentemente normales. (Figura 1).

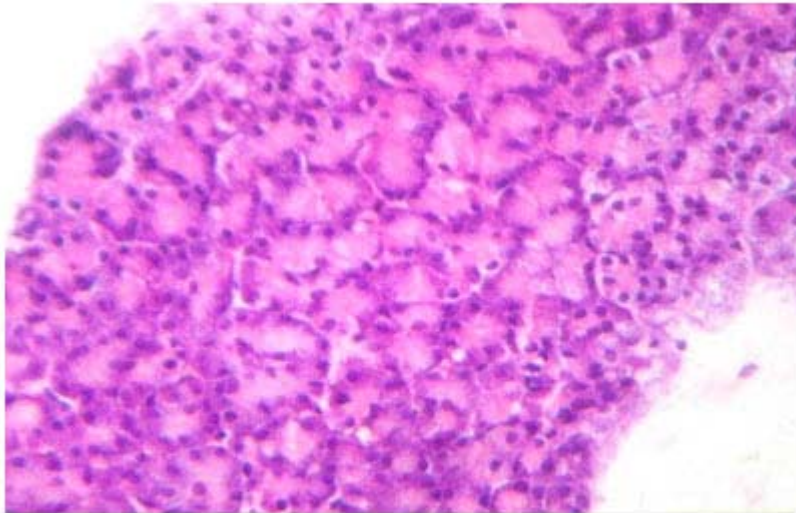


Figura 1. Fotomicrografía de páncreas de un conejo tratado con etanol. Se observan células de los acinos con signos de tumefacción celular. Técnica de hematoxilina y eosina.

En algunas áreas se observaron células de los acinos y los islotes pancreáticos con signos de muerte celular, aparentemente por apoptosis. Las células aparentaban menor tamaño que otras y sus núcleos presentaban la cromatina marginada, íntimamente unida a la envoltura nuclear.

En el sistema de conductos se observó que la mayoría de los conductos intralobulillares presentaba un epitelio muy aplanado, con material acidófilo que ocupaba toda su luz. En los conductos interlobulillares también se observó este material acidófilo que ocupaba gran parte de la luz de los mismos. (Figuras 2 y 3). No se observaron signos de inflamación, fibrosis, ni hemorragias en el tejido. Las células ductales no mostraron signos de muerte por necrosis ni por apoptosis. Los islotes pancreáticos no mostraron grandes alteraciones. (Figura 4).

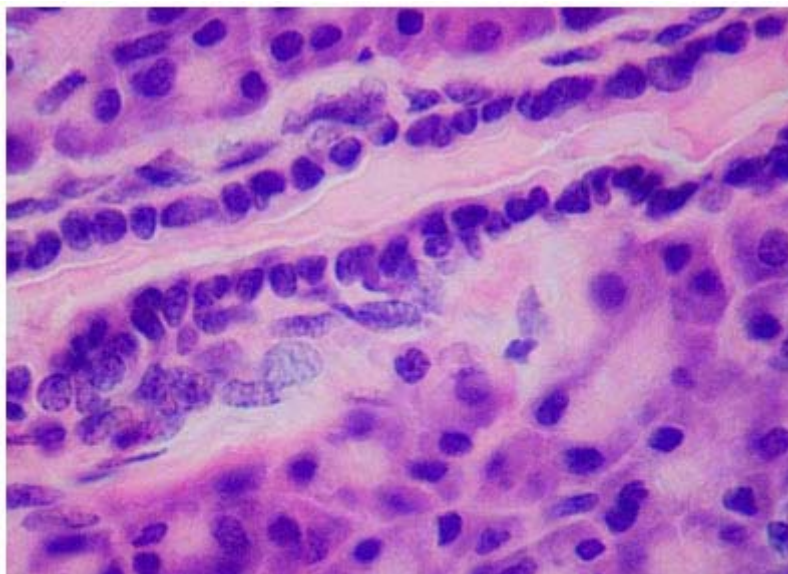


Figura 2. Fotomicrografía de páncreas de conejo tratado con etanol. Se observa material eosinófilo que ocupa toda la luz del conducto. Técnica de hematoxilina y eosina.

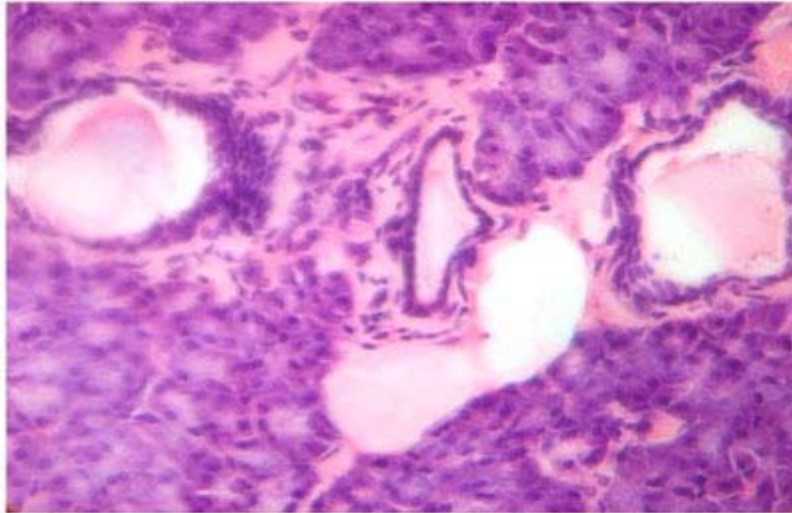


Figura 3. Fotomicrografía de páncreas al microscopio óptico. Conejo tratado con etanol. Se observa material eosinófilo en la luz de varios conductos interlobulillares. Técnica de hematoxilina y eosina.

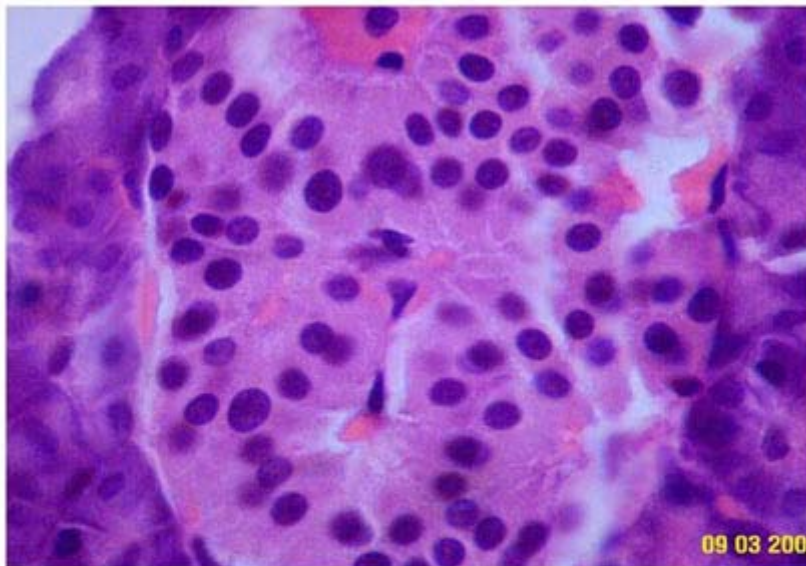


Figura 4. Fotomicrografía de páncreas de un conejo tratado con etanol. Se observa un islote pancreático con características normales. Las células endocrinas se disponen en forma de empalizada alrededor de los vasos sanguíneos. Técnica de hematoxilina y eosina.

Los conejos del grupo B tratados con alcohol y ácido fólico presentaron acinos de aspecto normal. En relación con el sistema de conductos se comprobó que existían sólo aislados conductos intralobulillares e interlobulillares con el material hialino y acidófilo en la luz. No se observó tumefacción celular. No hubo inflamación, fibrosis ni hemorragias en el tejido del páncreas exocrino ni a nivel de los islotes pancreáticos.

Los conejos del grupo C tratados con ácido fólico no mostraron alteraciones histológicas ni tampoco los conejos del grupo D o control (Figura 5).

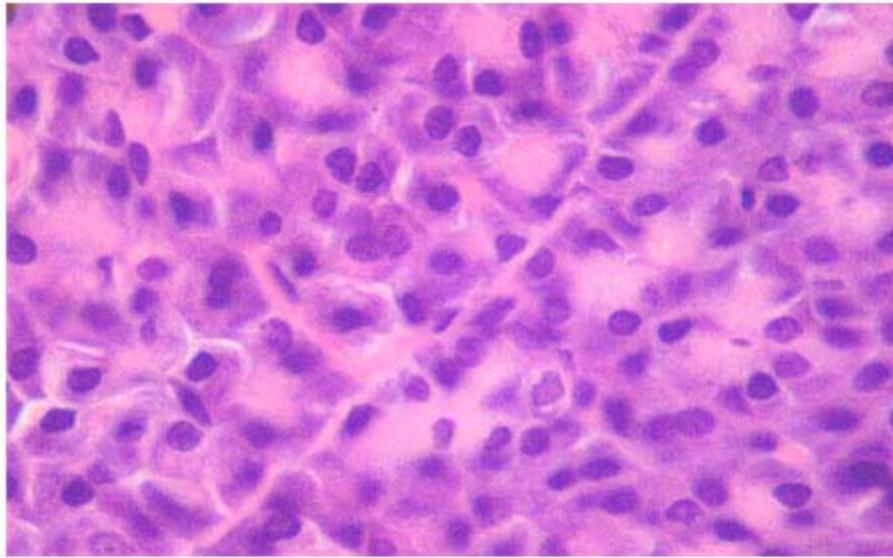


Figura 5. Fotomicrografía al microscopio óptico de páncreas. Conejo control. Se observa la estructura normal de los acinos pancreáticos. Técnica de hematoxilina y eosina.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que el páncreas mostró células parenquimatosas acinares con signos de tumefacción celular en el grupo que consumió etanol como único tratamiento. Se ha planteado que las células muestran una respuesta adaptativa ante estímulos fisiológicos excesivos y estímulos patológicos. Sin embargo, cuando se exceden los límites de la respuesta adaptativa, la célula aunque conserva su viabilidad presenta alteraciones morfológicas y funcionales; a tales cambios se les ha llamado lesión celular.¹³ Esto explicaría la presencia de tumefacción celular en los resultados obtenidos. La tumefacción celular puede ser interpretada como un signo primario e importante del efecto del etanol sobre las células acinares pancreáticas y puede ser reversible si el estímulo no persiste. Aparece cuando las células son incapaces de mantener la homeostasis hidroiónica y se manifiesta por la presencia de vacuolas claras en el interior de las mismas con alteraciones de sus organitos, similares a las que se observan en la hepatitis alcohólica, así como en otros órganos dianas de los efectos del alcohol y que ha sido reportado por otros investigadores.^{5,11, 13, 14}

Se ha planteado que el abuso del alcohol es el principal factor etiológico de la pancreatitis dado que este factor está presente en 30-50% de los casos de pancreatitis aguda y en 60-90% de los casos de pancreatitis crónica aunque aún no se entienden bien los mecanismos patogénicos de la pancreatitis alcohólica.^{15,16}

Otro hallazgo de interés en el grupo que ingirió sólo etanol fue la presencia de material acidófilo y hialino en la luz de numerosos conductos intralobulillares e interlobulillares. Otros autores han planteado que la destrucción de los acinos en la pancreatitis alcohólica resulta de la hipertensión ocasionada por la obstrucción dentro del sistema de conductos por la precipitación de material proteínico.¹⁵ Esta hipótesis plantea que la ingestión desmedida y crónica de etanol provoca una disminución de la concentración de bicarbonato y el volumen fluido de la secreción pancreática, y de esta forma la asociación de proteínas precipitadas y cristales de

calcio en la luz del conducto causan la obstrucción,¹⁴ hipótesis que consideran plausible los autores de la presente investigación.

La presencia de estos tapones proteicos observados en casi todos los conductos en los animales alcohólicos de la presente serie, demuestra un aumento en la secreción por parte de las células acinares y constituye, junto a la tumefacción celular, una manifestación del daño pancreático provocado por la ingestión de etanol a altas dosis y durante un tiempo prolongado. Por lo que los resultados del presente trabajo confirman la hipótesis de que el consumo de etanol a grandes dosis y por tiempo prolongado puede provocar lesión pancreática, como ha sido planteado por otros autores.^{11, 16, 17} Por lo antes expuesto, se puede afirmar que los conejos que ingirieron etanol en la presente investigación desarrollaron pancreatitis alcohólica.

En los conejos alcohólicos no se pudieron demostrar alteraciones tales como: fibrosis, hemorragias, células de la inflamación ni células estrelladas como ha sido planteado por otros investigadores.^{13, 14, 18} La pancreatitis puede tener un curso agudo o crónico. En su forma aguda puede ser un cuadro leve y auto limitado, o un cuadro grave que lleve al paciente a la muerte, con características histológicas muy floridas.¹⁹ En la forma crónica, esta evoluciona de manera más silente, con manifestaciones que pueden confundirse con otras entidades nosológicas y su característica principal es la presencia de tejido fibroso.¹⁸ Es posible que los conejos alcohólicos de la presente investigación presenten un estadio que podría ser catalogado como subagudo. También es probable que utilizando otros métodos para suministrar el etanol, como podría ser la cánula esofágica, los animales de este estudio hubiesen desarrollado un cuadro de alteraciones histológicas mucho más florido, como se ha reportado en análisis anteriores en los que se ha utilizado el método de referencia.^{10, 19, 20}

El grupo B tratado con etanol y ácido fólico mostró un aspecto prácticamente normal, sólo se observó la presencia del material proteináceo en escasos conductos, sin otras alteraciones histológicas. Estos resultados pudieran interpretarse como un efecto beneficioso y protector del ácido fólico contra los efectos dañinos del etanol, lo que coincide con trabajos que señalan que el ácido fólico puede contrarrestar o minimizar los efectos nefastos del etanol.^{10, 11, 21} Los conejos del grupo C tratado con ácido fólico presentaron un cuadro histológico normal y similar a los del grupo D o control.

CONCLUSIONES

El consumo de etanol provocó alteraciones histológicas en el páncreas a la dosis y tiempo utilizados, que pudieran catalogarse como una pancreatitis sub-aguda, y fueron evitadas en gran medida con el tratamiento con ácido fólico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González Menéndez R. Misión rescate de adictos. Guía para la relación de ayuda con toxicomanos. La Habana: Ediciones Abril; 2012, p.21-27.

2. Contreras Camacho I, Luna Domínguez MdelC, Arrieta Pérez RT. Auto-concepto del adolescente con y sin consumo de tabaco y alcohol; Rev Fac Med UNAM. 2008; 51 (6):239-242.
3. Martínez Martínez KI, Pedroza Cabrera FJ, Vacío Muro MA, Jiménez Pérez AL, Salazar Garza ML. Consejo breve para adolescentes escolares que abusan del alcohol. Rev. Mex. Anal. Conducta. 2008; 34 (2): 320-331.
4. Rodríguez Sánchez L, Castillo Ledo L, Torres Lugo DJ, Jiménez Hernández Y, Zurita Pacheco DM. Alcoholismo y adolescencia, tendencias actuales. Rev Psiquiatría Psicol niño adolescente. 2007; 7(1).
5. Ruiz Candina H, Herrera Batista A, Puldón Seguí G. Enfermedades médicas y estomatológicas provocadas por el alcoholismo en adultos y adolescentes. Modelos animales. Rev Cubana Invest Biomed [revista en la Internet]. 2012 Mar; 31(1): 26-36. [Citado 2012 Sep 09]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002012000100003&lng=es
6. Quevedo Guanche L. Pancreatitis crónica: Definición, clasificación, diagnóstico y tratamiento. Rev Cubana Cir [revista en la Internet]. 2007 Sep; 46(3). [Citado 2012 Ago 31]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74932007000300014&lng=es
7. Martínez Sánchez G. Debate acerca del estrés oxidativo y su incidencia en las enfermedades. Rev Cubana Farm [revista en la Internet]. 2007 Ago;41(2). [Citado 2012 Ago 31]; Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152007000200001&lng=es
8. Moreno Otero R, Cortés JR, Nutrición y alcoholismo crónico. Nutr. Hosp. 2008 Mayo [revista en la Internet]. 2012; 23(2). [Citado 2012 Sep 01]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112008000600002&lng=es
9. García Rodríguez S, Argüelles S, Llopis R, Murillo ML, Machado A, Carreras O, Ayala A. Effect of prenatal exposure to ethanol on hepatic elongation factor-2 and proteome in 21 d old rats: protective effect of folic acid. Free Radic Biol Med. 2003; 35(4): 428-37.
10. Zumeta Dubé MT, Herrera Batista A, González Bravo M, Falcón Camas V, *et al.* Efecto protector del ácido fólico sobre las características ultraestructurales del hígado de ratas con síndrome fetal alcohólico. Acta Microscópica. 2009; 18(1):19-27.
11. Herrera Batista A, Rojas Rodríguez LY, Bacallao Gallestey J, Lebreo Álvarez I. Efectos protectores del ácido fólico sobre los hepatocitos de conejos machos adolescentes alcohólicos. Rev Cubana Invest Biomed [revista en la Internet]. 2007 Jun; 26(2). [Citado 2012 Ago 23]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002007000200007&lng=es
12. Herrera Batista A, Lebreo Álvarez I, Falcón Vilaú L, Bacallao Gallestey J. Características morfométricas de la aorta de conejos sometidos a ingestión de

etanol y dieta hipercolesterolémica desde la adolescencia. Rev Cubana Invest Biomed. 2007;26(2).

13. Robbins S. Patología Estructural y Funcional. Ciudad de La Habana: Pueblo y Educación; 2000.
14. Aghdassi AA, Mayerle J, Sandra Christochowitz S, Weiss Frank U, Sandler M, Lerch MM. Animal models for investigating chronic pancreatitis. Fibrogenesis Tissue Repair. 2011; 4: 26. Published online 2011 diciembre 1. doi: 10.1186/1755-1536-4-26 [PMCID: PMC3274456]
15. Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute pancreatitis: bench to the bedside. Gastroenterology. 2007; 132: 1127-51.
16. Pandol SJ, Lugea A, Mareninova OA, *et al.* Investigating the pathobiology of alcoholic pancreatitis. Alcohol Clin Exp Res. 2011; 35:830-7. [PMC free article] [PubMed].
17. Herreros Villanueva M, Hijona E, Bañales JM, Cosme A, Bujanda L. Alcohol consumption on pancreatic diseases. World J Gastroenterol. 2013 February 7; 19(5): 638-647. [PMC free article] [PubMed].
18. Di Magno MJ, Di Magno EP. Chronic Pancreatitis. Curr Opin Gastroenterol. 2012 September; 28(5): 523-531.
19. Puldón Seguí G, Herrera Batista A, Ruiz Candina H. Efectos de la ingestión crónica de etanol sobre las características histológicas del riñón de ratas machos adolescentes. Rev Cubana Invest Biomed [revista en la Internet]. 2010 Dic 29(4): 445-453. [Citado 2013 Abr 03]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002010000400005&lng=es.
20. Herrera Batista A, Puldón Seguí G, Ruiz Candina H. Alteraciones en las características morfométricas del riñón de ratas albinas machos provocadas por la ingestión crónica de etanol desde la adolescencia. Rev Cubana Invest Biomed [revista en la Internet]. 2010 Jun;29(2):194-202. [Citado 2013 Abr 03]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002010000200004&lng=es.
21. Wang LL, Zhang Z, Li Q, Yang R, Pei X, Xu Y, *et al.* Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. Hum Reprod. 2009; 24(3):562-79.

Recibido: 28 de junio de 2013

Aprobado: 23 de agosto de 2013