



---

**Universidad de Valladolid**

**GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y  
DIETÉTICA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Cambios inmunohistológicos en intestino delgado  
de ratón expuesto a dieta rica en grasa**

**ALUMNA: BEATRIZ MANSO GAMAZO**

**TUTORA 1: DRA. ELVIRA GONZÁLEZ**

**Servicio de Anatomía Patológica Hospital Clínico Universitario de Valladolid**

**TUTORA 2: DRA. ANA OBESO CÁCERES**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología**

**FACULTAD DE MEDICINA VALLADOLID, 27 DE JUNIO 2018 (CURSO 2017-2018)**

## Agradecimientos.

*A mi familia por el apoyo que me ha dado estos cuatro años de carrera y el esfuerzo que han realizado para que siga hacia delante y no pierda la ilusión por el camino.*

*A Marta Ayllón e Isabel de Vega, por esas mañanas y tardes de laboratorio que tanto me han ayudado para la realización de este maravilloso trabajo.*

*A mis tutoras por la ayuda brindada, la colaboración y la oportunidad de poder realizar un trabajo experimental.*

## Resumen.

**INTRODUCCION:** Tanto la obesidad como el síndrome metabólico, son dos enfermedades asociadas entre sí, no sólo por el aumento de peso y el tejido adiposo, sino también porque se origina una inflamación leve y crónica en el organismo. Esta inflamación puede afectar al intestino delgado, órgano importante del organismo que posee un complejo sistema inmunitario que puede responder a esa inflamación.

**OBJETIVO:** Observar si se producen cambios histológicos o inmunoquímicos en el yeyuno de ratones expuestos a una dieta rica en grasa.

**METODOS:** Se trata de un estudio experimental donde se ha realizado la histología de yeyuno murino con tinción de hematoxilina eosina; y una inmunofluorescencia de los receptores para TNF- $\alpha$  e IL-1.

**RESULTADOS:** El estudio muestra cambios en la morfología y composición celular de las vellosidades del epitelio de la mucosa intestinal, así como una diferencia entre los marcadores de inflamación situados en el yeyuno (TNF- $\alpha$ , IL-1).

**CONCLUSION:** La dieta rica en grasas produce una alteración tanto a nivel del tejido de la mucosa, como a nivel de los mediadores de la inflamación situados en el intestino delgado.

**Palabras clave:** obesidad, síndrome metabólico, inflamación, intestino delgado, dieta rica en grasas, TNF- $\alpha$ , IL-1

## 2 Índice de contenidos.

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>2</b>
<b>3 ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>3</b>
<b>4 ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>3</b>
<b>5 ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>6 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
6.1 LA OBESIDAD.....	6
6.1.1 <i>Historia de la obesidad.....</i>	6
6.1.2 <i>Patologías asociadas a la obesidad.....</i>	7
6.1.3 <i>Inflamación en la obesidad.....</i>	8
6.2 SÍNDROME METABÓLICO.....	10
6.2.1 <i>Historia del síndrome metabólico.....</i>	10
6.2.2 <i>Comorbilidades del SM.....</i>	11
6.2.3 <i>Inflamación en el SM.....</i>	11
6.3 EL INTESTINO DELGADO.....	12
6.3.1 <i>Anatomía e histología del intestino delgado.....</i>	12
6.3.2 <i>Sistema inmune de la mucosa intestinal.....</i>	14
6.3.3 <i>Inflamación en el intestino.....</i>	16
<b>7 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>8 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>9 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
9.1 DISEÑO.....	19
9.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
9.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	19
9.3.1 <i>Sujetos.....</i>	19
9.3.2 <i>Metodología.....</i>	21
<b>10 RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
10.1 PESOS Y VALORES DE GLUCOSA Y DE INSULINA EN SANGRE DE LOS RATONES.....	26
10.2 HISTOLOGÍA.....	26
10.3 INMUNOFLORESCENCIA.....	28
<b>11 DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>12 CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>13 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34</b>

### 3 Índice de tablas.

TABLA 1 DIAGNÓSTICO DE LA OBESIDAD SEGÚN LOS CRITERIOS DE LA OMS (1)	6
TABLA 2 COMPOSICIÓN DE LA DIETA ADMINISTRADA A LOS RATONES CONTROLES Y EXPUESTOS.	20
TABLA 3 PROGRAMA DEL PROCESADOR DE TEJIDOS PARA REALIZAR LA INCLUSIÓN EN PARAFINA	22
TABLA 4 PROTOCOLO DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA EN SECCIONES DE INTESTINO DELGADO DE RATÓN CONTROL Y HFD	23
TABLA 5 MEDIDAS DE LAS VELLOSIDADES (ALTURA, ANCHURA A NIVEL MEDIO Y ANCHURA A NIVEL DISTAL) Y MEDIAS DE LAS 6 MEDIDAS, TOMADAS DE UN RATÓN CONTROL REPRESENTATIVO Y DE OTRO HFD (DEL RATÓN CONTROL 1.5 Y EL RATÓN HFD 2.1).	27
TABLA 6 CONTEO CELULAR DE MARCAJE EN RATONES CONTROL SEGÚN EL ANTICUERPO, NÚMERO DE CORTE Y MEDIA DE LOS ANTICUERPOS.	28

### 4 Índice de figuras.

FIGURA 1 ESTRUCTURA Y CAPAS DEL ID.	12
FIGURA 2 VISTA DE PLIEGUES CIRCULARES, VELLOSIDADES Y MICROVELLOSIDADES DEL ID.	13
FIGURA 3 REPRESENTACIÓN DE LOS ELEMENTOS DEL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA MUCOSA INTESTINAL: GALT ORGANIZADO O INDUCTOR; Y GALT DIFUSO O EFECTOR. RAMIRO-PUIG, E. <i>ET AL. REV. ESP. ENFERM. DIG. 2008.</i>	15
FIGURA 4. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UN SEGMENTO DE INTESTINO DELGADO DE RATÓN CONTROL, A Y RATÓN HFD, B (OBJETIVO 10X). MEDIDA DE LA ALTURA DE UNA VELLOSIDAD TOMADA DESDE LA BASE DEL EPITELIO HASTA EL EXTREMO DISTAL; MEDIA DEL DIÁMETRO TRANSVERSAL A NIVEL MEDIO Y DISTAL DE UNA VELLOSIDAD. LAS VELLOSIDADES DE LOS RATONES HFD SON MÁS CORTAS Y MÁS ANCHAS QUE LAS DE LOS RATONES CONTROLES. BARRA DE CALIBRACIÓN A 100 MM.	26
FIGURA 5. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UN SEGMENTO DE INTESTINO DELGADO DE RATÓN CONTROL, A Y RATÓN HFD, B; (OBJETIVO X40). COMPARANDO LA EL EPITELIO DE LA MUCOSA ENTRE AMBOS GRUPOS DE RATONES, SE OBSERVA QUE LAS CÉLULAS CALICIFORMES (CÍRCULOS AZULES) PARECEN ESTAR EN MAYOR PROPORCIÓN Y TAMAÑO EN EL INTESTINO DE RATÓN HFD QUE EN LOS CONTROLES. IGUALMENTE, PARECE EXISTIR INCREMENTO EN EL NÚMERO DE LAS CÉLULAS NEUROENDOCRINAS POR CRIPTA (CÍRCULOS ROJOS) EN LOS RATONES HFD QUE EN LOS CONTROLES. BARRA DE CALIBRACIÓN 10 MM.	27
FIGURA 6 FOTO A: ID RATÓN 1.4 CONTROL 40X DAPI Y FITC CON IL-1. FOTO A1: ID RATÓN 2.4 HFD 40X FITC CON IL-1. FOTO A: SECCIÓN DE ID CON MARCAJE INDIVIDUAL DE UNA CÉLULA DE LA FOTO A. BARRA DE CALIBRACIÓN 10 MM.	29
FIGURA 7 FOTO B: ID RATÓN 1.4 CONTROL 40X DAPI Y FITC CON TNF-A. FOTO B1: ID RATÓN 2.4 HFD 40X DAPI Y FITC CON TNF-A. BARRA DE CALIBRACIÓN 10 MM.	29

FIGURA 8 FOTO C: ID RATÓN 1.1 CONTROL 40X DAPI Y FITC CON IL-1. FOTO C1: ID RATÓN 2.1 HFD 40X FITC CON IL-1. BARRA DE CALIBRACIÓN 10 MM..... 30

FIGURA 9 FOTO D: ID RATÓN 1.3 CONTROL 40X FITC CON IL-1. FOTO D1: ID RATÓN 2.3 HFD 40X DAPI Y FITC CON IL-1. BARRA DE CALIBRACIÓN 10 MM. .... 30

FIGURA 10 FOTO E: ID RATÓN 1.5 CONTROL 40X DAPI Y FITC CON IL-1. FOTO E1: ID RATÓN 2.5 HFD 40X DAPI Y FITC CON IL-1. BARRA DE CALIBRACIÓN 10 MM..... 30

## 5 Abreviaturas.

**Ab:** Anticuerpo.

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol.

**ECV:** Enfermedad Cardiovascular.

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína.

**GALT:** Tejido Linfoide Asociado al Tubo Digestivo

**HE:** Hematoxilina-Eosina.

**HFD:** High Fat Diet (dieta rica en grasa).

**HSHF:** High Sucrose - High Fat (rica en sacarosa – rica en grasas).

**ID:** Intestino Delgado.

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IgAs:** Inmunoglobulinas A secretoras.

**IL-12:** Interleucina 12

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 $\beta$

**IL-6:** Interleucina 6

**IMC:** Índice de Masa Corporal.

**LPS:** Lipopolisacárido.

**AOS:** Apnea Obstructiva Del Sueño.

**PB:** Buffer de fosfato

**PBS:** Buffer de fosfato salino.

**PF:** Paraformaldehído.

**SM:** Síndrome Metabólico

**SRIS:** Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

**TLR4:** Toll-Like-Receptor 4

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral alfa

## 6 Introducción.

### 6.1 La obesidad.

#### 6.1.1 Historia de la obesidad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso y la obesidad como “una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud” (1).

Una forma de determinar el sobrepeso y la obesidad es mediante el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) y comparándolo con los valores estandarizados de umbrales. Se trata de una forma muy simplificada de determinar una relación entre el peso y la talla.

Su diagnóstico es muy sencillo:

Edad	IMC	Diagnóstico
Adultos	$\geq 25 \text{ kg/m}^2$	Sobrepeso
	$\geq 30 \text{ kg/m}^2$	Obesidad
Niños menores de 5 años	Peso para la altura + 2DS por encima de la mediana <sup>1</sup>	Sobrepeso
	Peso para la altura + 3DS por encima de la mediana	Obesidad
Niños de 5 a 19 años	IMC + 1DS por encima de la mediana <sup>2</sup>	Sobrepeso
	Peso para la altura + 2DS por encima de la mediana	Obesidad

**Tabla 1 Diagnóstico de la obesidad según los criterios de la OMS (1)**

Para darnos cuenta de la importancia de esta enfermedad, debemos de saber que a partir de año 1975, la obesidad se ha triplicado en todo el mundo. Se trata de una enfermedad que en muchos países es una de las principales causas de muerte, y esto es grave ya que se puede prevenir.

Además, la evolución va a peor, ya que la obesidad infanto-juvenil también está en aumento, siendo en 2016 más de 340 millones de niños y adolescentes de entre 5 y 19 años los afectados por esta enfermedad. En 1975 había menos de 1% de niños y adolescentes con obesidad; y en el 2016 hay 124 millones (6% ♀ y 8% ♂) (1).

<sup>1</sup> Según los patrones de la OMS.

<sup>2</sup> Según los patrones de la OMS.



En el caso de los adultos, en el año 2016 más de 1900 millones de adultos (mayores de 18 años) tenían sobrepeso, dentro de los cuales 650 millones tenían obesidad.

Existen múltiples causas de esta enfermedad, entre las que figuran (2):

1. Herencia genética. La obesidad suele ser hereditaria. Se cree que un gen que se trasmite de generación en generación que puede ser capaz de modificar la regulación del peso corporal.
2. Edad. Con el envejecimiento, el organismo tiende a disminuir el gasto de energía y por tanto de necesidades. No adaptarse a los cambios del envejecimiento implica el aumento de peso en un futuro.
3. Sexo. Las mujeres suelen aumentar su peso en etapas menopaúsicas y queman menos energía. Por el contrario, el hombre quema más energía en reposo, lo que implica mayor ingesta.
4. Ambiente y hábitos alimenticios. Los restaurantes *fast-food*, el ambiente obesogénico, la comida rica en grasa, alimentos industriales procesados, son factores que se han instaurado entre los hábitos diarios de las personas.
5. Sedentarismo. Produce un desequilibrio energético en las personas; la falta de ejercicio no compensa las kilocalorías de más que se ingieren día tras día.
6. Embarazo. Un 15% de las embarazadas aumenta su peso con cada embarazo.
7. Enfermedades. Algunas enfermedades que incluyen problemas hormonales, depresión y enfermedades cerebrales poco frecuentes.
8. Obesidad infantil. Cuando un niño ha sido obeso, las probabilidades de ser obeso en la edad adulta, son mayores. Se cree que los adipocitos adquiridos en la infancia están en el organismo hasta la edad adulta.
9. Fármacos. Como la familia de los corticoesteroides y algunos antidepresivos.
10. Trastornos alimentarios. Como pueden ser los atracones y las ingestas nocturnas colaboran un 10-20%.

### 6.1.2 Patologías asociadas a la obesidad.

La obesidad, además de aumentar la grasa visceral del organismo, y como consecuencia de ello a medio largo plazo, suele ir acompañada de una o varias complicaciones o patologías (3):

- Diabetes Mellitus tipo 2.
- Enfermedades cardiovasculares (ECV).
- Accidentes cerebrovasculares.
- Hipertensión.
- Dislipemias.

- Cáncer. De esófago, páncreas, colon, recto, riñón, ovario, vesícula, mama o hígado.
- Esteatohepatitis no alcohólica.
- Dolor de espalda y artrosis.
- Problemas respiratorios. Apnea Obstructiva del Suelo (AOS), asma.
- Incontinencia urinaria

### 6.1.3 Inflamación en la obesidad.

El tejido adiposo no solo almacena grasa, sino que funciona como una gran glándula endocrina que ayuda al mantenimiento de la homeostasis en el organismo (energético, inmunitario...). Histológicamente, el tejido adiposo no es homogéneo sino que se encuentra formado por multitud de células diferentes además del adipocito: monocitos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y del músculo liso vascular (4).

La inflamación clásica se conoce como la respuesta del organismo frente a un agente externo patógeno o dañino, desencadenando en el sujeto un proceso de inflamación, dolor, fiebre, rubor con el fin de lograr la eliminación del agente externo y recuperar de nuevo la homeostasis en el organismo.

En el caso concreto de la obesidad, se puede observar una leve inflamación, la cual se denomina **inflamación crónica de bajo grado** o **para-inflamación**. No se ha demostrado hasta el momento que esta inflamación tenga algún efecto beneficioso para el organismo (5).

Algunos autores relacionan esta inflamación con el cambio del ambiente que rodea al ser humano, diferente al del ser humano primitivo. Pueden influir desde la dieta rica en calorías y grasa actuales, el propio envejecimiento de las personas, el ambiente obesogénico, el sedentarismo...

#### Proceso De Inflamación Crónica De Bajo Grado.

Toda respuesta inflamatoria se inicia a partir del reconocimiento por parte del organismo de las señales infecciosas o inflamatorias que desencadenan la presencia de patógenos. En este punto, las células inmunitarias son liberadas para su acción y se reparten por el organismo. Cuando las células se diseminan y distribuyen por todo el organismo, se desencadena el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS), una activación celular de tipo endocrino. En este punto, se inicia la defensa del organismo y se liberan las correspondientes moléculas que poseen función proinflamatoria: las citocinas. Pueden ser moléculas como Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina 12 (IL-12), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y, en ocasiones la Interleucina 6 (IL-6). Todas estas citocinas proinflamatorias se

encuentran reguladas por inmunorreguladores (inhibidores específicos y receptores solubles de las propias citocinas).

Cuando el organismo está en unas condiciones fisiológicas adecuadas o normales, la respuesta inmunomoduladora es capaz de regular y evitar el daño excesivo de la respuesta inflamatoria. Por el contrario, cuando hay obesidad, la respuesta inmunomoduladora no es capaz de contrarrestar completamente el efecto de la inflamación a pesar de que sea de bajo grado; ya que se trata de una inflamación crónica

Además, debemos de tener en cuenta que el tejido adiposo contiene macrófagos además de realizar una respuesta de inflamación generaliza, se han relacionado con el desarrollo y el mantenimiento de la inflamación que se origina en la obesidad y en el tejido adiposo (mediante la secreción de moléculas proinflamatorias que se sintetizan en el propio tejido adiposo (6).

No se conoce con exactitud cómo se desencadena esta inflamación en la obesidad o quién es el causante de la misma. Sin embargo, se han postulado tres mecanismos posibles para responder a estas preguntas:

1. El primer mecanismo estaría relacionado con el estrés que sufren los retículos endoplasmáticos al no poder aportar todas las necesidades de las que son requeridos.
2. Un segundo mecanismo desencadenante podría ser el propio estrés oxidativo. Debido a una constante situación de hiperglucemia (el tejido adiposo capta glucosa constantemente), se incrementa la aparición de especies reactivas del oxígeno en las mitocondrias, lo que desencadena una respuesta inflamatoria ocasionada por el daño oxidativo.
3. El tercer mecanismo se relaciona con la insulina. La alta presencia en el tejido adiposo de niveles altos de TNF- $\alpha$  y ácidos grasos libres, disminuyen la sensibilidad a la insulina en el organismo (por lo que existe mayor propensión a desarrollar Diabetes Mellitus tipo 2). Uno de los tratamientos para la prevención y mejora de la diabetes mellitus tipo 2 es la pérdida de peso, que además se acompaña de una disminución de la inflamación.

## 6.2 Síndrome metabólico.

### 6.2.1 Historia del síndrome metabólico.

En los años 60 se observó la existencia de una correlación entre los triglicéridos séricos, la presencia de obesidad, resistencia insulínica, intolerancia a la glucosa, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (ECV). Más tarde, en 1988, el doctor Reaven acuña el nombre de “Síndrome X” o “Síndrome metabólico”, que agrupaba todos aquellos factores de riesgo relacionados con una ECV que solían encontrarse agrupados. Más tarde, el mismo grupo investigador propuso que la base del síndrome X provenía de la resistencia a la insulina, con lo que se postuló el nombre de Síndrome de Resistencia de Insulina. En 1998, la OMS publicó una serie de criterios diagnósticos definidos para el síndrome metabólico (7).

Desde este momento, son muchas las organizaciones e instituciones que definen el síndrome metabólico (SM) y muchas las que proponen sus criterios diagnósticos o modifican los propuestos con anterioridad (8):

1. En 1998, la Organización Mundial de la Salud postula sus criterios diagnósticos.
2. En 1999, el European Group for Study of Insulin Resistance (EGIR) propone sus criterios.
3. En 2001, el National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III), introduce sus criterios para el SM.
4. En el año 2003, la American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) realizó unos cambios en los criterios diagnósticos propuestos por la ATP III.
5. En el 2005, la International Diabetes Foundation (IDF) publica sus propios criterios. En el mismo año, la American Heart Association (AHA) y el National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) publican sus criterios para el diagnóstico de SM.

Por tanto, podemos definir el SM como un compendio de factores de riesgo que incrementan la posibilidad de padecer una ECV y que se representan, principalmente por obesidad central, dislipemia, hipertensión y resistencia a la insulina.

Epidemiológicamente hablando, la prevalencia de este síndrome es elevada y varía de un país a otro, entre sexos, etnias, edad y estilo de vida. En España, según un estudio (9), de todos los participantes incluidos en el mismo, había una prevalencia del 32% en varones y del 29% en mujeres. Además según se aumentaba la edad, la prevalencia era mayor. Con esto podemos decir, que el riesgo de SM va en aumento; y que en algunos países como Estados Unidos ya son una epidemia.

### 6.2.2 Comorbilidades del SM.

El SM lleva asociado una serie de comorbilidades, que son:

- Obesidad central. Exceso de masa grasa y que se puede catalogar según el IMC del individuo (patrones de la OMS) y la circunferencia de cintura en hombres ( $\geq 102$  cm) y en mujeres ( $\geq 88$  cm).
- Resistencia a insulina.
- Dislipemia.
- Hipertensión. Generalmente causada por la resistencia a insulina y la obesidad. Esto se debe a que no hay liberación de óxido nítrico (potente vasodilatador) gracias a la presencia de insulina en el torrente sanguíneo. Cuando hay resistencia a insulina se produce una situación compensatoria que origina una hiperinsulinemia; activando el sistema renina-angiotensina-aldosterona que provocan vasoconstricción e hipertensión.
- Enfermedad cardiovascular y/o enfermedad cardíaca crónica. Se trata de la primera causa mortal en la zona occidental, siendo aproximadamente 17 millones de fallecidos al año (10).
- Diabetes mellitus tipo 2.
- Cáncer. El SM puede actuar como detonante o ayudar a la progresión o pronóstico de ciertos tipos de cáncer.

### 6.2.3 Inflamación en el SM.

Como en la obesidad, el SM tiene un proceso inflamatorio de bajo grado, caracterizado por un aumento de las citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y proteína C reactiva). Esto es debido a una producción excesiva de estos mediadores en el tejido adiposo.

Además, en el caso concreto del SM, existe una citoquina con efecto antiinflamatorio llamada adiponectina, producida en los adipocitos. Su función es mejorar la sensibilidad a la insulina y permitir el paso de glucosa al músculo, aumentando la oxidación de los ácidos grasos para la obtención de energía. Sin embargo, cuando el organismo se encuentra en un estado de SM, la concentración de adiponectina es baja, por lo que no ayuda a la mejora del estado para-inflamatorio (11).

## 6.3 El intestino delgado.

### 6.3.1 Anatomía e histología del intestino delgado.

El intestino delgado (ID) es un órgano complejo cuya principal función es la de digestión y absorción de la mayoría de los nutrientes.

Se puede describir como un tubo muscular de trazado tortuoso que se inicia en el esfínter pilórico y finaliza en el intestino grueso. Se sitúa en la cavidad abdominal, suspendido en forma de abanico entre la pared abdominal posterior y el mesenterio.

Podemos dividirlo en tres partes:

1. Duodeno. Primera parte del ID y la más corta; mide unos 25 centímetros. Inicia en el esfínter pilórico y finaliza en el ángulo duodenoyeyunal. En él desembocan los conductos pancreático y biliar para la secreción de enzimas y bilis.
2. Yeyuno. Es la segunda sección del intestino, y mide aproximadamente 2,5 metros. Empieza en el ángulo duodenoyeyunal y tiene la capacidad de modificar su morfología a lo largo del tramo y finaliza en el íleon.
3. Íleon. Es la última parte del intestino delgado y con mayor longitud, unos 3,5 metros. Finaliza en la válvula ileocecal, es decir, la zona que une el íleon distal con el ciego.

El intestino delgado es el lugar donde se inicia verdaderamente la digestión química de los alimentos con la llegada del quimo desde el estómago. La regulación del paso del quimo del estómago al duodeno es compleja y en ella intervienen reflejos nerviosos y factores hormonales que van a permitir ese paso de alimento en función de su composición y en función de que el duodeno sea capaz de manipular pequeñas cantidades (12).

A lo largo de su trayecto, el intestino delgado mantiene el mismo patrón estructural, es decir, todo ellos está conformado por cuatro paredes diferentes (Figura 1Figura 1 Estructura y capas del ID):

1. Mucosa. Formada por un epitelio de revestimiento, lamina propia (tejido conjuntivo) y la capa muscular de la mucosa (músculo liso). La lámina propia

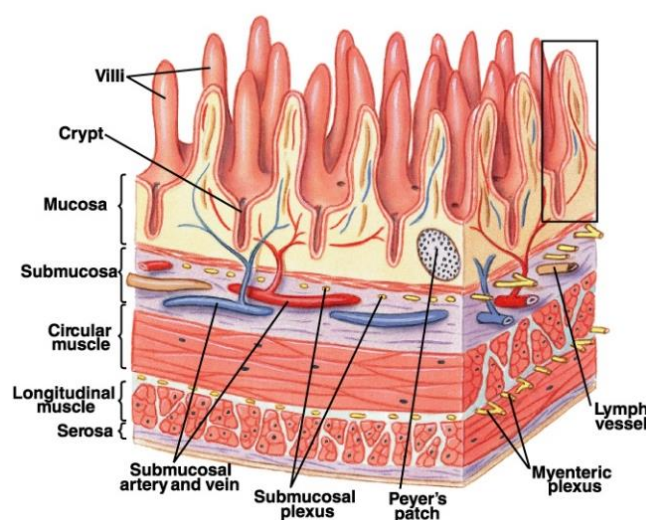


Figura 1 Estructura y capas del ID.

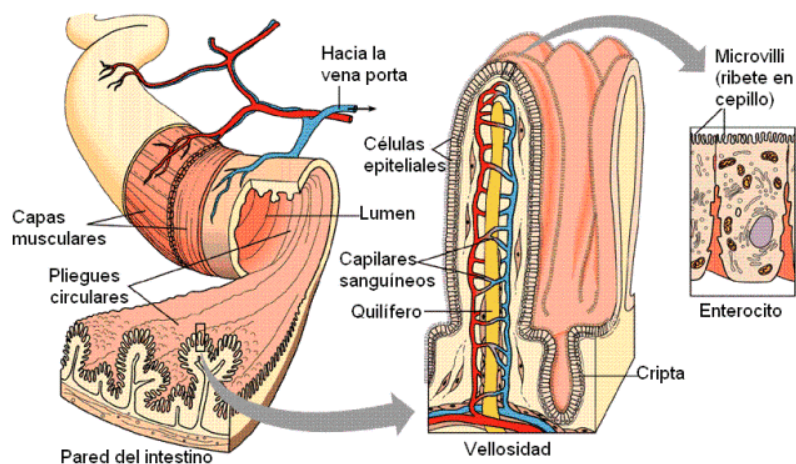
rodea las glándulas intestinales y contiene abundantes células del sistema inmunitario además de contener nódulos linfáticos o placas de Peyer. La muscular lisa se encuentra formada por una capa de tejido muscular liso circular interna y una longitudinal externa.

La mucosa se encuentra formada por tres estructuras importantes que permiten aumentar la superficie de absorción (Figura 2):

- Microvellosidades. Son unas pequeñas emanaciones de las células que componen la mucosa. Son las que aportan una fisonomía similar a un cepillo. Pueden denominarse también borde ciliado. Ayudan a la absorción y digestión de los nutrientes a lo largo del ID.
- Vellosidades. Son evaginaciones de la mucosa, con una forma similar a la de un dedo que aportan la fisonomía aterciopelada del ID. Cada una de ellas posee un vaso quilífero (capilares linfáticos adaptados) y un lecho capilar.
- Pliegues circulares. Se trata de pliegues con profundidad a lo largo de la mucosa y submucosa. Son conocidos también por el nombre de *válvulas de Kerckring*. Comienzan a verse entre los 5-6 cm después del píloro.

En el epitelio de la mucosa podemos encontrar cinco tipos de células diferentes:

- Enterocitos. Encargados de la absorción de nutrientes.
- Células caliciformes. Glándulas secretoras de mucina.
- Células de Paneth. Células que mantienen la inmunidad innata con la secreción de antimicrobianos.
- Células enteroendocrinas o neuroendocrinas. Son enterocitos especializados en la producción de hormonas endocrinas y paracrinas.
- Células M (células con micropliegues). Cubren los nódulos linfáticos en la lámina propia.



**Figura 2 Vista de pliegues circulares, vellosidades y microvellosidades del ID.**

2. Submucosa. Formada por una capa de tejido conjuntivo denso irregular. En algunas secciones del intestino, como el duodeno, podemos encontrar glándulas submucosas (glándulas de Brunner). Muchas de las secreciones que realizan estas glándulas, poseen un pH alcalino que permite proteger el epitelio de las secreciones ácidas del estómago y permitir la acción de enzimas pancreáticas.
3. Muscular externa. En la mayor parte del intestino, está formada por dos capas de músculo: una capa muscular lisa circular en el interior y otra en disposición longitudinal en el exterior. En ella se sitúa el plexo mientérico que permite las contracciones de los músculos y que origina dos tipos de movimientos:
  - Contracciones de segmentación. Contracciones localizadas cuya función es la segmentación del contenido. Son causadas por la capa circular. Además, logra que el quimo se mezcle con las enzimas y que se encuentre en contacto con la mucosa para la absorción.
  - Peristalsis. Se trata de una contracción coordinada entre la capa muscular circular y longitudinal que consiguen desplazar el contenido del intestino a lo largo del tubo.
4. Serosa. Se trata de una membrana formada por un epitelio plano simple junto con un poco de tejido conjuntivo subyacente. Además, en la zona de la pared del tubo donde se une/fija a las estructuras contiguas, podemos encontrar la capa adventicia formada exclusivamente por tejido conjuntivo.

La sección del yeyuno es la que posee mayor porcentaje de absorción a lo largo del todo el tubo digestivo. Sus enterocitos poseen una forma más digitiforme y se encuentran envueltas por células epiteliales cilíndricas absorptivas, aunque se pueden encontrar en menor cantidad células caliciformes y enteroendocrinas. Las vellosidades pueden ser más cortas debido a la contracción del músculo. (13)

### 6.3.2 Sistema inmune de la mucosa intestinal.

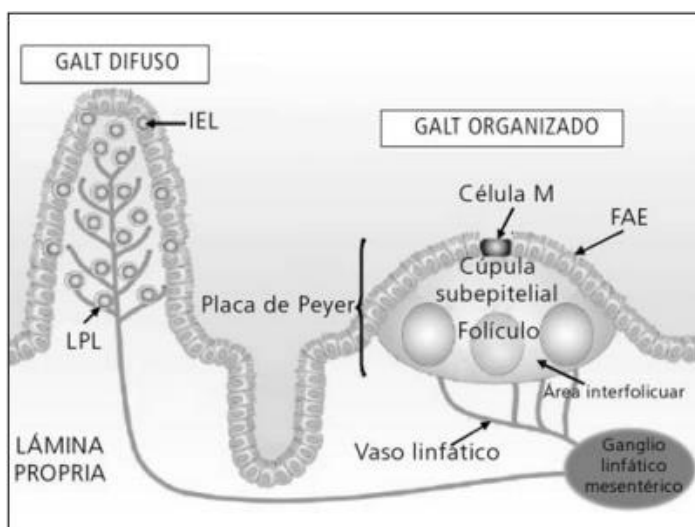
Las mucosas del intestino delgado probablemente poseen el sistema inmunitario más complejo y numeroso del propio sistema inmunitario. Su función no sólo es protegernos de microorganismos y antígenos patógenos, sino que debe de reconocer la propia microflora y antígenos que provienen de los alimentos que ingerimos diariamente.

El epitelio de la mucosa está formado por múltiples tipos de uniones denominadas uniones estrechas o *zónula occludens*, que permiten la continuidad del epitelio. Estas uniones estrechas imponen una permeabilidad selectiva, que aumenta ante la presencia de citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  o el IFN- $\gamma$  (hacen que las uniones “cedan”).



En el epitelio se producen mucinas y péptidos antimicrobianos en las células de Goblet y en las células de Paneth respectivamente. Las mucinas son proteínas envueltas por una gran variedad de polisacáridos que poseen una permeabilidad selectiva. Se secreta continuamente debido a su baja tasa de vida media (minutos o pocas horas). La protección que aporta al epitelio frente a patógenos es muy eficaz. Los péptidos antimicrobianos son defensinas, catelicidinas y lisozima (entre otras) embebidas en la propia secreción mucosa. Cuando estas zonas son activadas, liberan citocinas inflamatorias que son capaces de reunir diferentes tipos de poblaciones leucocitarias. Su activación se produce gracias a los TLR (*toll-like-receptor*), lectina de tipo C, NLR (*nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing gene family*), RLR (*RIG-like receptors*) y los receptores depuradores (*scavenger*); todos ellos pertenecientes al grupo de receptores RRP (receptores de reconocimiento de patrones).

Otro componente importante de la mucosa es la IgA secretora (IgAs). Es producida mayormente en plasmocitos de la lámina propia y es transportada hacia la superficie de las células epiteliales. Su papel es el de neutralizar las toxinas producidas por los microbios y bloquear además los receptores que son expresados en la superficie de los microbios para inhibir su capacidad de colonización (14).



**Figura 3 Representación de los elementos del tejido linfático asociado a la mucosa intestinal: GALT organizado o inductor; y GALT difuso o efector.** Ramiro-Puig, E. et al. Rev. Esp. Enferm. Dig. 2008.

La organización del sistema

inmunitario de los linfocitos y estructuras linfoides, se denomina **MALT** (tejido linfático asociado a las mucosas), que puede estar en diferentes localizaciones:

- **GALT:** tejido linfático asociado al tubo digestivo.
- **BALT:** tejido linfático asociado al árbol bronquial.
- **NALT:** tejido linfático asociado al tracto nasofaríngeo.
- Tejido linfático asociado a las glándulas salivales.
- Tejido linfático asociado a la glándula mamaria.
- Tejido linfático asociado a los órganos genitourinarios.
- Tejido linfático asociado al oído interno.

En el caso concreto del GALT, podemos encontrar dos tipos de compartimentos (15):

1. GALT organizado o inductor de la respuesta inmunitaria.

- Placas de Peyer. Se trata de una especie de centro germinal formado por agregados linfoides macroscópicos. En su interior se generan linfocitos B. sólo presentan vasos linfáticos eferentes.
- Ganglios linfáticos mesentéricos. Se dividen en tres regiones: corteza, paracorteza y médula. La corteza contiene folículos ricos en linfocitos B y células dendríticas; la paracorteza por un elevado contenido en linfocitos T y células dendríticas; y la médula (región más interna), está integrada tanto por linfocitos T como de linfocitos B además de células plasmáticas.
- Folículos linfoides aislados que se encuentran en la lámina propia. Pueden encontrarse formando parte de las placas de Peyer o de forma aislada. Cuando se encuentran aislados, se encuentran rodeados de células que conforman el endotelio asociado a los folículos (FAE), donde están las células M. Las células M son enterocitos especializados en la captación de antígenos lumenales. Poseen una función importante: traslocar los antígenos desde la luz del tracto hasta la lámina propia mediante diferentes mecanismos:
  - ◆ Vesículas endocíticas.
  - ◆ Endocitosis.
  - ◆ Algunos tipos de parásitos y bacterias pueden ser fagocitados.

2. GALT difuso o efector de la respuesta inmunitaria. Formado por poblaciones de linfocitos dispersas en el entramado epitelial o en las láminas propias.

### 6.3.3 Inflamación en el intestino.

Muchos estudios describen que la obesidad causada por una dieta rica en grasa (*high fat diet*, HFD), va asociada en muchas ocasiones con un cambio en la microbiota del intestino. Sin embargo, son pocos los estudios que observen el estado del intestino, es decir, que determinen si la para-inflamación causada por la obesidad afecta al intestino o si se produce una inflamación en el propio intestino debido a la dieta.

Claire Barbier *et al.* (16), realizó un estudio sobre la HFD en ratas para observar los cambios en la microbiota. Los resultados obtenidos indicaban que se observaba una inflamación en la zona del íleon, sobre todo en las ratas que eran propensas a la obesidad. Además, con la activación de la vía TLR-4, se producían alteraciones en las uniones estrechas, con la consiguiente alteración de la permeabilidad intestinal. Por otra parte se realizaron técnicas de inmunofluorescencia y se observó la presencia de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  como modificadoras de las uniones estrechas de la mucosa.

Otro estudio con ratones (17) observó que ratones modificados con déficit de TLR4 y sometidos a una HFD, tenían una expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 disminuida respecto a ratones con una expresión normal de TLR4 y HFD. Además relacionaron la exposición a una HFD con el desarrollo de colitis.

Xin, Z *et al.* (18), experimentaron en ratas con una dieta rica en sacarosa y grasa (high sucrose - high fat, HSHF) con una exposición de 48 semanas. En la semana 12 de exposición observaron un incremento de TNF- $\alpha$ , IL-6 y LPS (lipopolisacárido) en ratas con HSHF, que se mantuvo hasta el final de la exposición.

Algunos estudios (19) indican que el mecanismo entre la HFD y la inflamación puede estar relacionado con el LPS. El LPS es una molécula compleja, es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desempeñando una importante función en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias. Su estructura se compone de tres partes: el lípido A, un oligosacárido y el antígeno O. El lípido A es una endotoxina que es reconocida por el TLR4. Muchas de las enfermedades metabólicas que asocian inflamación, podrían deberse a la gran activación de células inmunes estimuladas por la LPS.

Se ha postulado que una ingesta elevada de grasas, podría facilitar la absorción de LPS en el intestino. La absorción de LPS se realiza desde el enterocito para incorporarse en forma de triglicéridos a los quilomicrones, que pasarán a la linfa mesentérica. Una vez haya llegado a la circulación sistémica, la lipoproteína es capaz de liberar ácidos grasos libres que reaccionan con las lipasas de la lipoproteínas que se localizan en el endotelio; lo que podría explicar la inflamación. El LPS presente en quilomicrones que llegan al hígado, puede ser eliminado por los mecanismos de detoxificación que posee, no dándose en casos de hiperquilomicronemia.

Además, la activación de mastocitos del epitelio de la mucosa intestinal con la ingesta de grasa, podría generar la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-13 así como triptasa, que ayuda a la translocación de LPS. La exposición crónica y sistémica a niveles ligeramente elevados de LPS, podría iniciar una respuesta inmune con la correspondiente señalización y activar vías de señalización que acaban en un estado de inflamación.

Aún con todos estos estudios analizados, se desconoce el origen de la inflamación en el intestino delgado ante una exposición a una dieta rica en grasa, y también cuál es el mecanismo o mecanismos que desencadenan este problema.

## 7 Justificación.

Este trabajo trata de relacionar el efecto que causa una dieta rica en grasa, que sigue los patrones de la dieta de la población actual, en el intestino delgado. Dado que la HFD se relaciona con dos enfermedades de alta importancia en la salud pública del mundo: la obesidad y el síndrome metabólico.

Tras realizar una búsqueda en PubMed, MedLine, SciELO o Google Scholar, se pudo observar que en los últimos años, las investigaciones donde figuraban los conceptos “intestino delgado”, “dieta rica en grasa” e “inflamación” (principalmente), apenas aportaban información sobre el efecto que se producía. Muchas de las investigaciones se encuentran relacionadas con la microbiota intestinal y no con la inflamación intestinal; y con patologías no localizadas en el intestino delgado.

Por ello, se planteó para este TFG la realización de una parte experimental para poder determinar si la exposición a una HFD conocida (tanto en su composición como en el tiempo de exposición) producía efectos en el tejido del intestino y si algún de los mediadores de la inflamación situados en el intestino se encontraba aumentado tras la exposición.

Con ello, lo que buscamos es saber si hay relación entre la obesidad y el síndrome metabólico con la afección intestinal, hecho que es desconocido hasta el momento. Además, podrían abrirse nuevas vías de estudio para patologías relacionadas con el intestino y la obesidad, como podría ser la apnea obstructiva del sueño.

## 8 Objetivos.

El objetivo general de este trabajo es estudiar en un modelo experimental de ratón si la exposición a una dieta rica en grasa (que simula un estado de obesidad y síndrome metabólico) produce alteraciones en el intestino delgado de un ratón sufrirá modificaciones.

Como objetivos específicos:

1. Comprobar si la exposición a una dieta rica en grasa, modifica la estructura histológica del intestino delgado (yeyuno medio) comparado con animales controles.
2. Comprobar si una dieta rica en grasa produce cambios en la expresión de ciertos mediadores de la inflamación en intestino delgado, comparado con animales controles.

## 9 Material y métodos.

### 9.1 Diseño.

El presente Trabajo de Fin de Grado de una primera parte de búsqueda bibliográfica donde se realiza una revisión del tema en trabajos publicados para conocer el estado actual y qué relaciones se pueden establecer con otras áreas. La segunda parte del diseño es experimental, se ha utilizado un modelo animal murino al que se ha sometido a dieta rica en grasa para ver los efectos en intestino delgado comparando los animales controles alimentados con una dieta equilibrada o control.

### 9.2 Revisión bibliográfica.

Para la elaboración del presente trabajo, se procedió a la búsqueda de información proveniente de artículos científicos, investigaciones, libros de texto, revisiones sistemáticas y páginas web.

La búsqueda de artículos científicos e investigaciones se ha realizado en las bases de datos con mayor relevancia: PubMed, SciELO, MedLine y Google Scholar.

Para acotar la búsqueda se emplearon las palabras clave: *gut, inflammation, immunity, high fat diet, obesity, metabolic syndrome, TNF- $\alpha$ , IL-1, intestine*. De todos los artículos que contenían las palabras clave, se ha hecho una selección de los artículos de los últimos 10 años, teniendo en cuenta el año de publicación, el título, la revista de la publicación y el resumen. Se escogieron tanto en inglés como en español.

### 9.3 Parte experimental.

#### 9.3.1 Sujetos.

El estudio, previamente aprobado por el Comité ético de la Universidad de Valladolid, se realizó con ratones de raza Swiss machos, de 3 meses de edad mantenidos hasta la edad de 4 meses y 1 semana (5 semanas) en las instalaciones para animales de la Universidad, situada en la Facultad de Medicina. Se mantuvieron en un régimen regular, es decir, jaulas estándar, a temperatura de 20-24°C, con régimen de 12 horas luz/día, agua y alimentos *ad libitum*. Todos los ratones fueron pesados al inicio y al final del periodo de exposición.

Los ratones (n=10) se dividieron inicialmente de forma aleatoria en dos grupos:

- Grupo control (n=5), que fueron alimentados durante 5 semanas con una dieta normal o estándar.
- Grupo experimental (n=5), fueron alimentados durante 5 semanas con una dieta rica en grasa e hidratos de carbono (y sacarosa).

A continuación se exponen las dietas de los ratones control y los expuestos a una dieta rica en grasa.

DIETA RATON CONTROL		DIETA RATON EXPUESTO		
Crude Nutrients	% en peso	Producto #D12451	Gramos%	kcal%
Protein	19	Proteínas	24	20
Fiber	4.9	Carbohidratos	41	35
<b>Fat</b>	<b>3.3</b>	<b>Grasas</b>	<b>24</b>	<b>45</b>
Ash	6.4	<b>Ingrediente</b>	<b>Gramos</b>	<b>kcal</b>
Calcium	1	Caseína, Malla 30	200	800
Phosphorus	0.7	L-Cistina	3	1212
		Maicena	72.8	291
		Maltodextrina 10	100	400
		Sacarosa	172.8	691
		Celulosa, BW200	50	0
		Aceite de soja	25	225
		Manteca de cerdo*	177.5	1598
		Mezcla de minerales S10026	10	0
		Fosfato de dicálcico	13	0
		Carbonato cálcico	5.5	0
		Citrato de potasio, 1 H2O	16.5	0
		Mezcla vitaminas V1001	10	40
		Bitartrato de colina	2	0
		FD&C Red Dye #40	0.05	0
<b>Total</b>		<b>Total</b>	<b>858.15</b>	<b>4057</b>

**Tabla 2 Composición de la dieta administrada a los ratones controles y expuestos.**

\*Análisis típico de manteca de cerdo = 0.72 mg/gramo

Colesterol (mg)/4057 kcal = 127.8

Colesterol (mg)/kg = 148.9

Las dietas fueron compradas a Ssniff Spezialdiäten GmbH®, y la HFD pertenece a Open Source Diets®

Una vez finalizado el tiempo de exposición, los ratones fueron eutanasiados con éter y sometidos a decapitación. Para la extracción del intestino, se accedió por el abdomen tras abrir las capas de piel y músculos abdominales; extrayendo un segmento de intestino delgado en la zona del yeyuno medio.

### 9.3.2 Metodología.

Para la elaboración de las diferentes pruebas experimentales, se procedió a la elaboración de protocolos de actuación en cada una de ellas.

## 1.- INCLUSIÓN EN PARAFINA DE LAS MUESTRAS DE ID DE RATONES CONTROL Y HFD.

Una vez extraídos los segmentos de intestino delgado de cada ratón, estos se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PF) al 4% en un buffer de fosfato (PB) 0.1M.

Del segmento de intestino de cada ratón se prepararon dos cassettes, que contenían respectivamente:

- Una sección circular denominada A.
- Una sección longitudinal denominada B.

Se identificó a los ratones de la siguiente forma:

- Controles: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5.
- High Fat Diet (HFD): 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5.

Cada cassette fue identificada con el tipo de muestra, tipo de ratón y la fecha de inclusión.

Para la inclusión en parafina de los tejidos, se empleó un procesador de tejidos (*Procesador de Tejido STP-120*) con el protocolo que se muestra en la Tabla 3. Posteriormente se incluyen las muestras en bloques de parafina (*centro de inclusión EC 350*) hasta ser cortados

<b>PROCESADOR DE TEJIDOS</b>				
				Hoja de programa
Programa número (01 al 10)		04	Observaciones:	
Realizado por:		María José		
Fecha:		24/02/2010		
<b>Vaso</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo (HH:MM)</b>	<b>Agitación (0/1/2)</b>	<b>Notas</b>
<b>1</b>	ETOH 70%	1h		
<b>2</b>	ETOH 96%	1h		
<b>3</b>	ETOH 96%	1h		
<b>4</b>	ETOH 100%	1h		
<b>5</b>	ETOH 100%	1h		
<b>6</b>	ETOH 100%	1h		
<b>7</b>	Xileno	1h		
<b>8</b>	-	-		Cubeta limpieza
<b>9</b>	Xileno	1h		
<b>10</b>	Xileno	1h		
<b>11</b>	Parafina	2h	2L	
<b>12</b>	Parafina	2h		

**Tabla 3 Programa del procesador de tejidos para realizar la inclusión en parafina**



## 2.- TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA DE SECCIONES DE ID DE RATONES CONTROL Y HFD.

De cada bloque de parafina del grupo control y experimental se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor que se tiñeron con hemtoxilina y eosina siguiendo el protocolo que se especifica en la Tabla 4. Las muestras fueron examinadas al microscopio (*Carl Zeiss Axioskop 2 mot plus*), se fotografiaron con una cámara acoplada al microscopio (*Photometrics Cool Snap cf*).

Vaso	Reactivo	Tiempo (MM:SS)	Notas
1	Xileno	6 min	Desparafinado
2	Xileno	6 min	
3	Xileno	6 min	
4	Etanol 100%	5 min	
5	Etanol 100%	5 min	
6	Etanol 96%	5 min	
7	Etanol 96%	5 min	
8	Etanol 70%	5 min	
9	Etanol 70%	5 min	
10	Agua corriente	5 min	
11	Agua acidulada	m/s	
12	Agua corriente	m/s	
13	Agua amoniacal	m/s	
14	Agua corriente	m/s	
15	Hematoxilina	6 min	
16	Agua corriente	m/s	
17	Eosina	2 min	
18	Agua corriente	m/s	
19	Etanol 100%	2 min	
20	Etanol 96%	2 min	
21	Etanol 70%	2 min	
22	Xileno	1 min	
23	Xileno	1 min	

Tabla 4 Protocolo de tinción con hematoxilina-eosina en secciones de intestino delgado de ratón control y HFD

### **3.- INMUNOFLUORESCENCIA REALIZADA SOBRE SECCIONES DE INTESTINO DELGADO DE RATONES CONTROL Y HFD.**

Se realizaron 16 tinciones de inmunofluorescencia, 8 de las cuales pertenecían a ratones control y otras 8 a ratones experimentales. Se emplearon dos tipos de anticuerpos: para receptores de TNF- $\alpha$  e IL-1. Se realizaron el mismo número de técnicas de inmunofluorescencia para TNF- $\alpha$  como para IL-1

Previamente a la realización del protocolo de inmunofluorescencia, se desparafinan las muestras y se hidratan como en el protocolo de tinción con hematoxilina-eosina:

- 1) Xileno. Tres Pases durante 6 minutos cada uno.
- 2) Alcohol 100%. Dos pases durante 5 minutos cada uno.
- 3) Alcohol 96%. Dos pases durante 5 minutos cada uno.
- 4) Alcohol 70%. Dos pases durante 5 minutos cada uno.

A continuación se muestra el protocolo de la inmunofluorescencia:

- 1) Lavar en Buffer de Fosfato Salino (PBS) 10mM durante 5 minutos.
- 2) Secar bien los restos de PBS alrededor de la muestra mediante aspiración. Trazar una circunferencia alrededor de las muestras con ayuda de un lápiz graso.
- 3) Permeabilizar las muestras con solución A que contiene PBS 10mM, Tritón x100 al 0.01% y suero normal de cabra [NGS] al 0.02% con la suficiente cantidad que no rebose de la marca de lápiz graso y que cubra todas las muestras. Dejar reposar con la solución A durante 15 minutos.
- 4) Secar bien los restos de Solución A con la aspiración de la misma, sin tocar las muestras.
- 5) Añadir el anticuerpo (Ab) primario, en este caso anticuerpos anti-receptor de IL-1 (mouse anti-IL1R, Santa Cruz) y anti receptor de TNF- $\alpha$  (mouse anti- TNF- $\alpha$ R, Santa Cruz), ambos a una dilución 1:50 en solución A. se colocaron en una caja opaca y en ambiente húmedo (con papel de filtro y una esterilla) para evitar que las muestras histológicas se sequen. Se deja incubando toda la noche a 4°C.
- 6) Secar bien los restos de solución A+Ab.
- 7) Lavar con PBS durante 6 minutos dos veces.
- 8) Secar bien el PBS aspirando los restos alrededor de la muestra.
- 9) Añadir el anticuerpo secundario: Goat – antimouse – FITC diluido a 1:1000 en solución B (PBS mM y NGS al 0.2%) que además contiene el marcador nuclear

DAPI diluido a 1:2000. Se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

10) Lavar con PBS durante 6 minutos dos veces.

11) Lavar con agua destilada.

12) Montar el portaobjetos con Vectashield.

13) Las muestras se examinaron con un microscopio *Carl Zeiss Axioskop 2 mot plus*. Se fotografiaron imágenes utilizando una cámara digital (*CoolSNAP, Photometric, Roper Scientific*) acoplada al microscopio. Las imágenes fueron analizadas utilizando un programa de análisis de imagen (*Metamorph 6.3 software*).

## 10 Resultados.

### 10.1 Pesos y valores de glucosa y de insulina en sangre de los ratones.

El peso de los ratones tras las 5 semanas de exposición fue una media de 32.4 g en los ratones control versus 41.4 g en los ratones HFD. La significación fue de  $p < 0.05$ . Por tanto, tras el periodo de exposición, se observó un aumento de peso en los ratones experimentales.

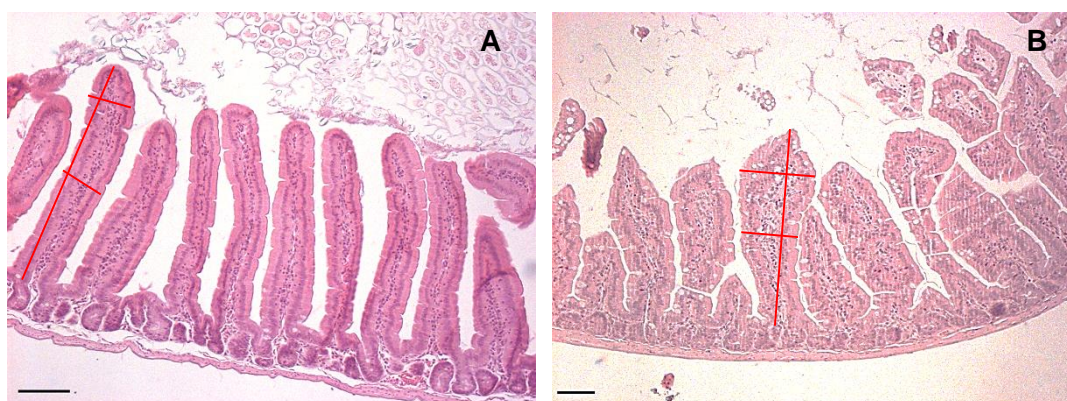
Previo al sacrificio de los animales, se procedió además, a la determinación de las glucemias basales y los niveles de insulina en plasma de los ratones. Los datos de glucemia e insulina en ayunas fueron:

- Glucosa: 67.2 mg/dL (Control) versus 102.8 mg/dL (HFD)  $p < 0.05$
- Insulina: 0.16  $\mu\text{g/L}$  (Control) versus 0.19  $\mu\text{g/L}$  (HFD)  $p = \text{n.s.}$

Estos datos reflejan que, tras el periodo de exposición a la HFD, los ratones HFD generan una resistencia a la insulina debido a sus elevadas glucemias en sangre sin cambio en los niveles de insulina.

### 10.2 Histología.

A pequeño aumento se aprecia una diferencia en la morfología de las vellosidades intestinales. En la Figura 4, podemos observar como en A, las vellosidades tienen mayor longitud y son más estrechas. En la fotografía B, que corresponde a ratone HFD, se aprecia que la altura de la vellosidad es menor y que la zona distal de la misma tiene mayor diámetro en comparación con el resto del cuerpo de la vellosidad (similar a unos palillos de tambor).



**Figura 4. Tinción con Hematoxilina y Eosina de una sección longitudinal de un segmento de intestino delgado de ratón control, A y ratón HFD, B (objetivo 10x). Medida de la altura de una vellosidad tomada desde la base del epitelio hasta el extremo distal; media del diámetro transversal a nivel medio y distal de una vellosidad. Las vellosidades de los ratones HFD son más cortas y más anchas que las de los ratones controles. Barra de calibración a 100  $\mu\text{m}$ .**

Una vez tomadas las fotografías, se procedió a la medida de la altura, la anchura a nivel medio y la anchura distal de las vellosidades más representativas de la Figura 4. En la Tabla 5, se muestran dichas y medidas y las medidas y las medias de los valores en los ratones del grupo control y del grupo HFD.

Ratón Control			Ratón con HFD			
	Altura vellosidad	Anchura media	Anchura distal	Altura vellosidad	Anchura media	Anchura distal
1	439	90	94	324	99	101
2	419	72	70	300	103	112
3	404	55	55	378	108	148
4	404	83	69	234	95	71
5	407	75	78	303	116	112
6	382	73	66	336	46	140
<b>Media</b>	<b>409,16</b>	<b>74,67</b>	<b>72</b>	<b>312,5</b>	<b>94,5</b>	<b>114</b>

Tabla 5 Medidas de las vellosidades (altura, anchura a nivel medio y anchura a nivel distal) y medias de las 6 medidas, tomadas de un ratón control representativo y de otro HFD (del ratón Control 1.5 y el ratón HFD 2.1).

De forma cuantitativa, podemos afirmar que existe una diferencia en la morfología de las vellosidades, tanto en altura, anchura media y distal como se puede ver en los valores de las medias entre ratón control versus ratón HFD.

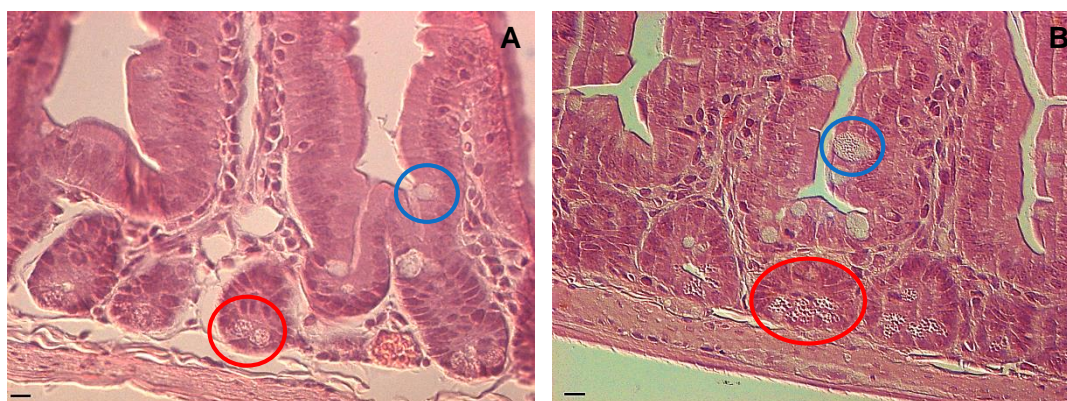


Figura 5. Tinción con Hematoxilina y Eosina de una sección longitudinal de un segmento de intestino delgado de ratón control, A y ratón HFD, B; (objetivo x40). Comparando la el epitelio de la mucosa entre ambos grupos de ratones, se observa que las células caliciformes (círculos azules) parecen estar en mayor proporción y tamaño en el intestino de ratón HFD que en los controles. Igualmente, parece existir un incremento en el número de las células neuroendocrinas por cripta (círculos rojos) en los ratones HFD que en los controles. Barra de calibración 10  $\mu$ m.

Además de las diferencias morfológicas de las vellosidades, también observamos diferencias en la composición del epitelio de la mucosa. En la Figura 5 se muestran las diferencias en la composición celular del epitelio, marcadas en dos zonas de cada imagen. Las secciones azules nos muestran una célula caliciforme, que parece encontrarse en mayor proporción en los ratones HFD que en los ratones control. Con un círculo rojo se señalan las células neuroendocrinas, que parecen encontrarse en mayor número por cripta en los ratones HFD respecto a los ratones control.

### 10.3 Inmunofluorescencia.

Las diferentes preparaciones de fluorescencia para los receptores de IL-1 y TNF- $\alpha$  se examinaron al microscopio de fluorescencia (*Carl Zeiss Axioskop 2 mot plus*) a una amplificación de 40x. Se capturaron imágenes con una cámara digital (*CoolSNAP Photometric Roper Scientific*) acoplada al microscopio y se procesaron mediante el programa Metamorph 6.3 software. Se muestran los resultados en las Figura 6 – 7 – 8 – 9 y 10. Haciendo comparaciones entre controles y experimentales.

Una vez examinadas las preparaciones al microscopio, en un principio se procedió a contar el número de células marcadas sólo en los ratones controles, debido a que en los ratones HFD el marcaje era tan elevado que no se pudo determinar con exactitud el número de células marcadas. Los resultados obtenidos del conteo fueron los siguientes:

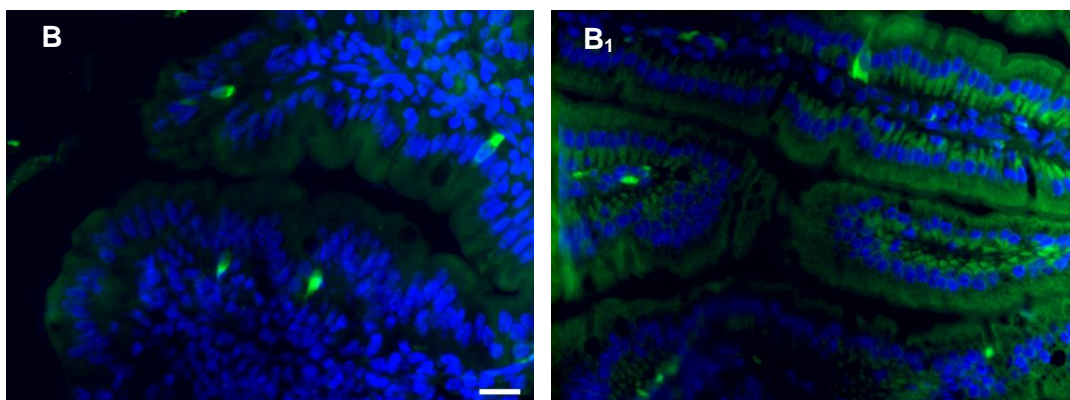
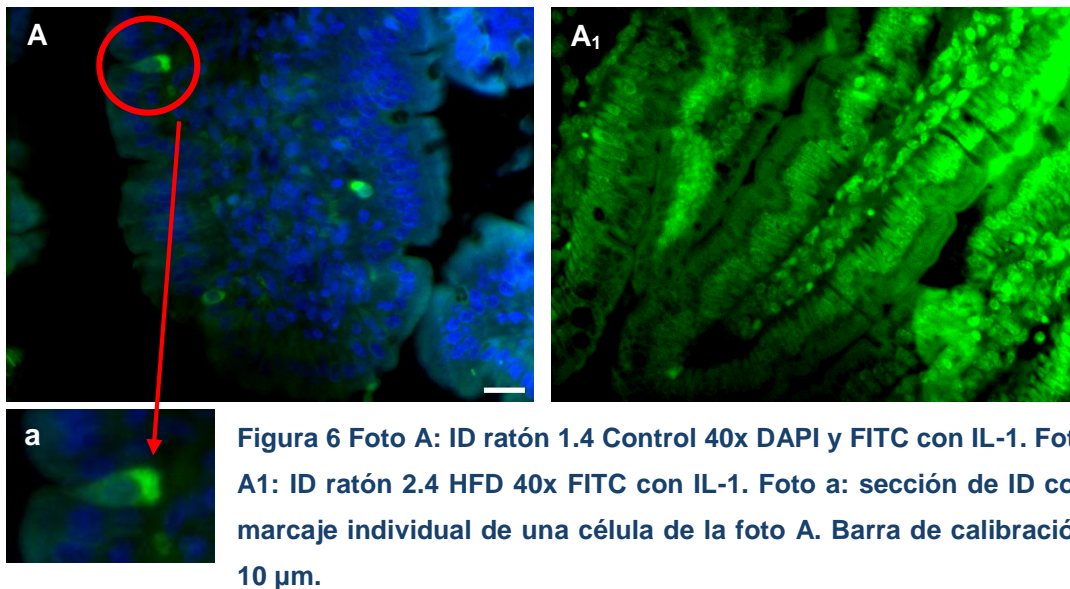
Muestra	Anticuerpo	Corte 1	Corte 2	Corte 3	Total Porta	Media según Ab
1.1.5 A Control	IL-1	39	36	29	104	122,75
1.3.6 A Control	IL-1	49	48	38	135	
1.4.6 A Control	IL-1	26	29	47	102	
1.5.3 A Control	IL-1	50	46	54	150	
1.1.6 bis A Control	TNF- $\alpha$	22	21	21	64	209,5
1.3.4 A Control	TNF- $\alpha$	48	49	58	155	
1.4.5 A Control	TNF- $\alpha$	72	37	92	201	
1.5.2 B Control	TNF- $\alpha$	198	125	95	418	

Tabla 6 Conteo celular de marcaje en ratones control según el anticuerpo, número de corte y media de los anticuerpos.

En Tabla 6 podemos ver, que la presencia del receptor de IL-1 es mucho más constante y en menor cantidad respecto a las inmunos que identifican al receptor de TNF- $\alpha$ .

En la Figura 6 A<sub>1</sub> podemos observar que el marcaje de IL-1 se produce sobre todo en el interior de las vellosidades, mientras que en la Figura 7 B<sub>1</sub> el marcaje de las células con TNF- $\alpha$  se limita a toda la zona del epitelio, es decir, a los enterocitos, células caliciformes y enteroendocrinas.

En el caso concreto del ratón 2.4 HFD, podemos ver y comparar ambos marcajes. En la Figura 6 se aprecia la mayor presencia de IL-1, con que hay una mayor presencia del mismo tras la exposición. En la Figura 7 se aprecia claramente un marcaje, pero menos intenso, lo que nos indica que la presencia de TNF- $\alpha$  en el intestino tras una exposición a HFD también se eleva.



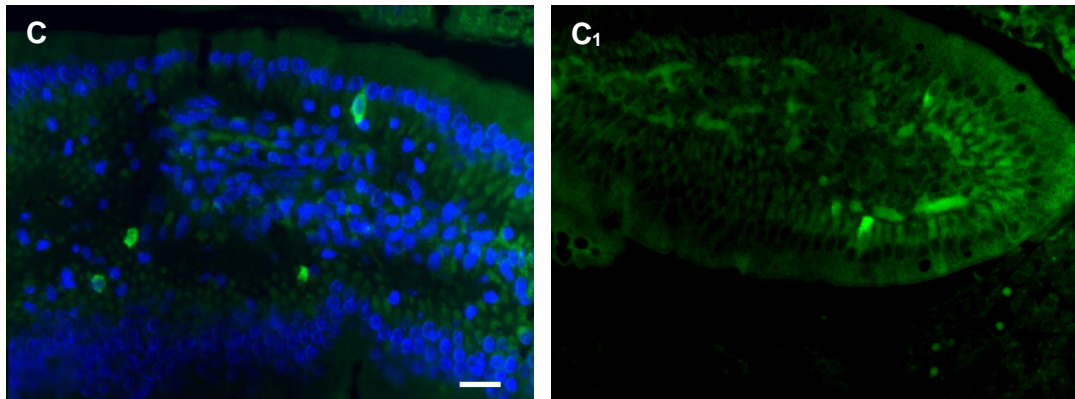


Figura 8 Foto C: ID ratón 1.1 Control 40x DAPI y FITC con IL-1. Foto C1: ID ratón 2.1 HFD 40x FITC con IL-1. Barra de calibración 10 µm.

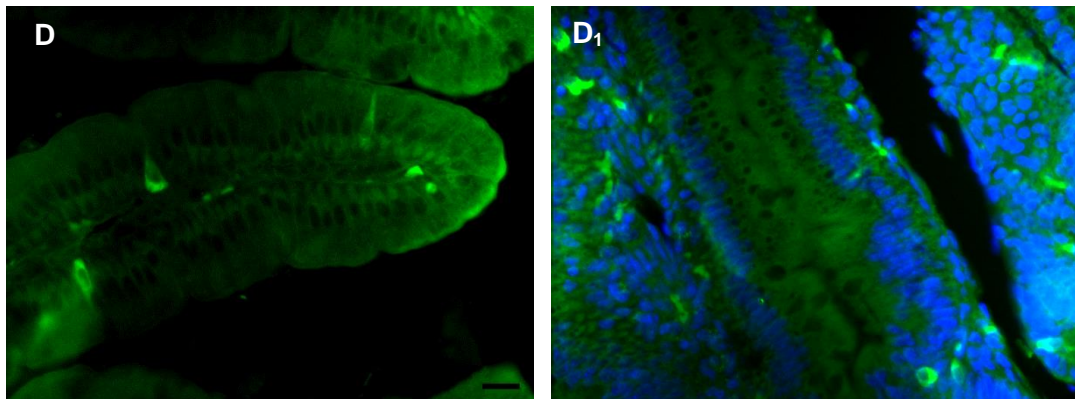


Figura 9 Foto D: ID ratón 1.3 Control 40x FITC con IL-1. Foto D1: ID ratón 2.3 HFD 40x DAPI y FITC con IL-1. Barra de calibración 10 µm.

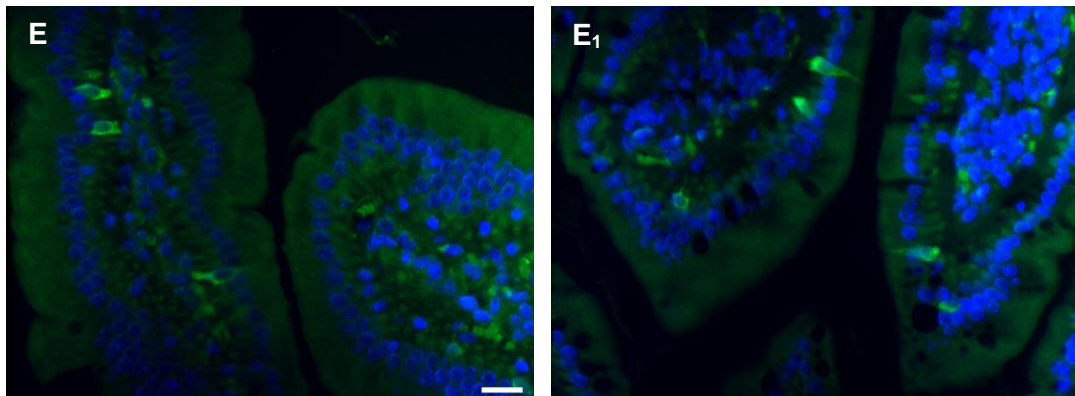


Figura 10 Foto E: ID ratón 1.5 Control 40x DAPI y FITC con IL-1. Foto E1: ID ratón 2.5 HFD 40x DAPI y FITC con IL-1. Barra de calibración 10 µm.



En general, se aprecia una diferencia cualitativa entre los ratones control y los ratones expuestos, sobre todo en el caso del TNF- $\alpha$  que es más homogéneo mientras que el receptor para IL-1 es más específica en algunas secciones del intestino, por lo que sería interesante poder observar secciones de duodeno e íleon.

Debido a las limitaciones del trabajo, sería apropiado en investigaciones futuras poder realizar una comparación cuantitativa del marcaje, mediante otras técnicas como el Western, conocer valores específicos de esas diferencias.

## 11 Discusión.

El SM, asociado con la obesidad central y la resistencia a insulina, son tres factores de riesgo que afectan directamente a las enfermedades cardiovasculares. Es un hecho en la actualidad que la mayoría de las personas poseen uno o varios factores de riesgo cardiovascular asociados al SM y que además, va en aumento.

Existen patologías y afecciones en el intestino que a día de hoy se desconoce su causa incluso no son posibles diagnosticadas debido a su desconocimiento y a la falta de investigación en este tema en concreto. Así como se sabe que una dieta rica en grasa produce inflamación generalizada de mayor o menor grado, puede haber síntomas de la propia enfermedad como pueda ser afectación/inflamación intestinal que no se haya diagnosticado ni, hasta el momento, se haya relacionado con la dieta rica en grasa y la obesidad produce alteraciones morfológicas e inflamatorias en el intestino delgado en modelo murino de obesidad.

Además, este trabajo puede dar iniciativas a nuevas vías de investigación relacionadas con la inflamación y la obesidad, como puede ser en sujetos con alteración del sueño como es la apnea obstructiva del sueño, AOS en donde se produce hipoxia intermitente crónica y un estado inflamatorio generalizado. David Gozal *et al.* (20) postularon que la exposición a hipoxia intermitente (simulación de AOS), causaba un incremento de sustancias proinflamatorias y radicales libres de oxígeno que podían causar inflamación en el organismo y además la alteración de la función de lípidos, proteínas y ADN; dando además un posible papel carcinogénico a la dicha alteración del sueño AOS. Otro estudio (21) postula que la hipoxia intermitente de la AOS puede contribuir a la inflamación mediante la activación de células endoteliales, leucocitos y plaquetas. Además puede haber un mayor riesgo de desarrollar SM, dislipemias, hipertensión, arritmias... así como mayor formación de radicales libres de oxígeno.

Los resultados obtenidos en este trabajo han mostrado que la dieta rica en grasas provoca cambios en el epitelio de la mucosa intestinal. Una posible explicación al ensanchamiento de las vellosidades intestinales de los ratones HFD podría ser que los vasos linfáticos de los ejes de las vellosidades intestinales se dilatan para poder transportar mayor cantidad de grasa. El probable incremento en las células caliciformes observado, así como la tendencia al incremento de las células neuroendocrinas en las criptas que parece existir en los epitelios de los ratones HFD puede ser consecuencia directa de las características del contenido intestinal HFD y de los cambios en la señalización neuroendocrina que provocan.

Otras vías de investigación, podría ser la presencia de diferentes mediadores inmunológicos (receptor de IL-6) o de moléculas que se han visto relacionadas con la inflamación en el intestino como la LPS, ya que de esta manera, podríamos conocer con mayor exactitud qué es lo que desencadena la respuesta inflamatoria en el intestino.

Desde el punto de vista de la nutrición, la educación nutricional y los hábitos saludables son uno de los factores más importantes a tener en cuenta en una sociedad que está rodeada por un ambiente obesogénico. La publicidad enfocada a alimentos ultraprocesados (ricos en grasas saturadas y azúcares simples añadidos), productos de carácter “saludable”, productos cuya composición no se corresponde con el propio producto (panes integrales, por ejemplo) o la publicidad dirigida a niños; son diferentes estrategias de la industria alimentaria para sugestionar a la población. Una correcta educación con buenos hábitos podría ayudar a la prevención de muchas de estas patologías, lo que mejoraría la calidad de vida de millones de personas.

## 12 Conclusiones.

Con todo lo expuesto anteriormente, podemos obtener varias conclusiones:

1. Una exposición de 5 semanas a una dieta rica en grasa provoca el aumento de peso en ratones.
2. El aumento de peso en los ratones expuestos a dieta rica en grasa causa la aparición de una resistencia a insulina.
3. Se produce una alteración en la morfología de las vellosidades en los ratones expuestos a dieta rica en grasa respecto a los ratones alimentados con dieta control; siendo unas vellosidades más cortas y más anchas, sobre todo en la zona distal de la vellosidad.
4. Hay un aumento de células caliciformes y neuroendocrinas en el epitelio de la mucosa intestinal del intestino delgado de los ratones expuestos a dieta rica en grasa comparado con los controles.
5. Hay un aumento de los marcadores pro-inflamatorios, tanto para los receptores de TNF- $\alpha$  como para los receptores de IL-1 en el intestino delgado de los ratones alimentados con dieta rica en grasa, comparado con los controles.

## 13 Bibliografía

1. OMS. Organización Mundial de la Salud. [Online].; 2017 [cited 2018 Mayo 25. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. THI. Texas Heart Institute. [Online]. [cited 2018 Junio 5. Available from: <https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/obesidad-y-sobrepeso/>.
3. NHLBI. National Heart, Lung and Blood Institute. [Online]. [cited 2018 Junio 1. Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/overweight-and-obesity>.
4. Ruiz Álvarez V, Puig Peña Y, Rodríguez Acosta M. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*. 2010; 29(3): p. 364-397.
5. Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Catalán V, Frühbeck G. Papel del tejido adiposo en la inflamacion asociada a la obesidad. *Revista Española de Obesidad*. 2008 Septiembre-octubre; 6(5): p. 264-279.
6. Blancas-Flores G, Almanza-Pérez JC, López-Roa RI, Alarcón-Aguilar FJ, García-Macedo R, Cruz M. La obesidad como proceso inflamatorio. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex*. 2010 mar/abril; 67(2): p. 88-97.
7. Pineda CA. Síndrome metabólico: definición, historia, criterios. *Colombia Médica*. 2008 Enero-Febrero; 39(1): p. 96-106.
8. Lizarzaburu Robles JC. Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *An Fad. Med*. 2013; 74(4): p. 315-20.
9. Fernández-Bergés D, Cabrera de León A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, et al. Síndrome metabólico en españa: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. Estudio DARIOS. *Revista Española de Cardiología*. 2012; 65(3): p. 241-248.
10. O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*. 2015 Jan; 16(1): p. 1-12.
11. Mahmoodi Z. Metabolic syndrome (a review). *Journal of Current Medical Research and Opinion*. 2018; 1(01): p. 9-12.

12. N. Marieb E. Anatomía y Fisiología Humana. 9th ed. Martín-Romo M, editor.: PEARSON Addison Wesley; 2008.
13. Pawlina W. Histología. Texto y Atlas. Correlación con biología molecular y celular. 7th ed. Merino B, editor.: Wolters Kluwer Health; 2015.
14. Fainboim L, Geffner J. Introducción a la Inmunología Humana. 6th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2011.
15. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. Rev. Esp. Enferm. Dig. 2008; 100(1): p. 29-34.
16. Barbier de La Sarre C, Ellis CL, Lee J, Hartman L, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010; 299: p. G440-G448.
17. Kyung-Ah K, Wan G, In-Ah L, Eun-Ha J, Dong-Hyun K. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. PLoS One. 2012 October; 7(10).
18. Xin Z, Dewu H, Ruiling X, Suhong L, Huiwen W, Chongxiao Q, et al. A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats a high fat and high sucrose diet. PLoS One. 2014 Dec; 9(12).
19. Boroni Moreira AP, Fliche Salles Teixeira T, Barbosa Ferreira A, Gouveia Peluzio MdC, Gonçalves Alfenas RdC. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. British Journal of Nutrition. 2012 Sep; 108(5): p. 801-809.
20. Gozal D, Farré R, Nieto FJ. Putative links between sleep apnea and cancer. CHEST. 2015; 148(5): p. 1140-1147.
21. Almendros I, Yang W, Gozal D. The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014 Jul; 307(2).