

Ultraestructura del epitelio del intestino delgado en terneros con diarrea espontánea y provocada

T. VERDURA Y O. ANCHETA

con la colaboración técnica de María Elena Ramos y María Cristina de la Rosa

Laboratorio de Patología, Rama Agropecuaria y Laboratorio de Microscopía Electrónica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba

Recibido: 12 Julio de 1974

ABSTRACT. Much has been said about the diarrheal syndrome in newborn calves. Yet, the morphological changes have been considered in part as the producing agents of this syndrome. Its experimental reproduction by means of several methods has been made. Among the experiments performed our interest was directed to the influence of the association of Reserpine drug with the endotoxines from *E. Coli*; this technique was widely used by Fayet, (1971) in calves on calostrum stage. The characterization of the structural changes in optical microscopy has been described and special attention given in its comparison with spontaneous cases. Based on previous findings, ultrastructural alterations in the small intestine were studied in calves under these conditions. 15 Holstein calves from to 1-15 days of age. Among them, 5 were used as healthy controls, 5 underwent spontaneous diarrhea and 5 were injected Reserpine with *E. Coli* endotoxine to provoke the syndrome. Samples were obtained from byopsia before slaughter and processed to be studied under electron microscopy. The loss of microvilly in some zones was observed being continued with cytoplasmic disruption in animals injected with reserpine and endotoxine. More stressed alterations were confirmed in spontaneous cases. Controls maintained the normal structural. The morphological changes observed are discussed in this paper as well as their relation to the fisiopatología of this syndrome.

RESUMEN. Dentro del síndrome diarreico del ternero recién nacido muchos aspectos han sido dilucidados. No obstante los cambios morfológicos se ha discutido en parte como responsables de los mismos en la fisiopatología de este síndrome. La necesidad de una mejor comprensión del mismo condujo a su reproducción experimental por diversas vías. Dentro de estas ha sido de nuestro interés el detenernos en la asociación del fármaco Reserpina con las endotoxinas procedentes de *E. Coli*, técnica preconizada por Fayet, (1971) en terneros calostrá-

dos. La caracterización de los cambios estructurales a nivel de microscopía óptica fue descrita por nosotros y su comparación con casos espontáneos fue motivo de especial consideración. Basándonos en los hallazgos así obtenidos se estudiaron las alteraciones ultraestructurales del intestino delgado en terneros sometidos a dichas condiciones. Se emplearon 15 terneros con edades entre 1-15 días de nacidos de la raza Holstein: 5 como controles sano, 5 que sufrieron diarrea espontánea y 5 a los que se le indujo el síndrome mediante la inyección de reserpina asociada a endotoxina de *E. Coli*. Las muestras se obtuvieron por biopsia antemorte y se procesaron para su estudio en microscopía electrónica. Dentro del conjunto de cambios observados se destacó la pérdida en zonas de las microvellosidades las que se continuaron con disrupción citoplasmática para los animales que recibieron reserpina más endotoxina. En los casos espontáneos se constató una más descrita severidad en cuanto a estas alteraciones. Los controles mantuvieron la integridad de su ultraestructura. Se discuten los cambios morfológicos observados y se correlacionan éstos con la fisiopatología del síndrome.

INTRODUCCION

La diarrea del ternero se desarrolla principalmente dentro de las tres primeras semanas de vida del animal (*Sojka, 1965*). La misma se caracteriza por heces líquidas de color gris, amarillento o blanquecinas y se acompaña de desequilibrio electrolítico y shock anhidrémico circulatorio, culminando con la muerte del animal en muchos casos.

Se responsabiliza a la *Escherichia Coli* como una de las causas de este síndrome, implicándose serotipos patógenos con importancia tanto para el hombre como a los animales (*Tennant, 1971*). Sin embargo, los fallos en muchos intentos de reproducción experimental con *E. Coli*, así como la influencia de otros factores externos, señalan la participación del stress y los defectos de homeostasis como parte de la etiopatogenia del síndrome en cuestión (*Comline y Silver, 1966a y b; Oplistil, 1970 y Schoenares, 1970*). Modelos experimentales que reúnan estos conceptos, fueron desarrollados por Fayet, (*1971*) en base al uso de la reserpina con y sin endotoxinas (*E. Coli*) para la inducción de diarrea en terrenos que recibieron calostro.

Los diferentes cambios observados en el intestino de terneros sometidos a este sistema experimental, así como sus analogías y diferencias con los encontrados en aquellos con síndrome espontáneo, han sido descritos por Verdura, (*1972*) a nivel del microscopio de campo brillante.

El objeto de este trabajo es el de caracterizar los cambios ultraestructurales del epitelio intestinal en la porción delgada del mismo en la diarrea experimental por reserpina-endotoxinas (*E. Coli*) y compararlas con las del síndrome espontáneo.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 15 terneros machos de la raza Holstein de menos de tres semanas de nacido; cinco como testigos sanos, cinco que sufrían de diarrea espontánea y cinco a los que se les indujo la diarrea mediante el uso de reserpina (Serpasil-Ciba) a la dosis de $0.3 \text{ mg} \times \text{kg}$ con endotoxinas *E. Coli* a $0.30 \mu\text{g} \times \text{kg}$ por vías subcutáneas y endovenosa respectivamente.

Las muestras fueron obtenidas previo sacrificio del animal, tomándose inmediatamente fragmentos de duodeno, yeyuno e ileon para microscopía de campo brillante, al mismo tiempo se tomaron cortes de 1 mm^3 aproximadamente para microscopía electrónica los que se prefijaron en glutaraldehído al 3.2% en buffer de fosfato por una hora. Fueron lavados en buffer durante una noche, pasándose a una solución de tetróxido de osmio al 2% en buffer fosfato (*Millonig, 1961*). Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico, siendo finalmente incluidas en Epon 812 y polimerizadas en la estufa a 60°C durante 48 horas (*Luft, 1961*).

Todas las muestras se cortaron en un ultramicrotomo Ultratome III LKB. Los cortes de plateado a amarillo claro fueron montados en rejillas de cobre de 400 mesh sin membrana soporte y se postcontrastaron según Reynolds, (*1963*). Se observaron en un microscopio electrónico Hitachi HS-7 tomándose un promedio de 10 fotos por muestra.

RESULTADOS

Microvellosidades.

Las microvellosidades aparecen destruidas en zonas coincidiendo con las células que sufren alteraciones generales más graves tanto en los experimentales como en los diarréicos espontáneos, siendo más notoria esta alteración en los primeros. (Figs. 1a y 1b).

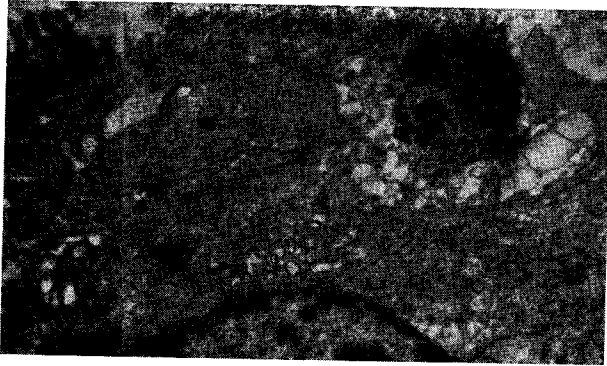


Fig. 1a.

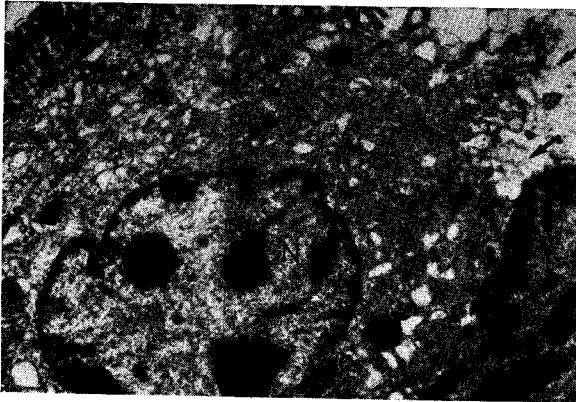


Fig. 1b.

Figs. 1a y 1b. Pérdida de las microvellosidades con pérdida de la integridad citoplasmática. Diarrea experimental, a: 18 400 x y b: 18 400 x.

Los testigos conservaron su disposición y morfología típica. (Figs. 2a y b). Cualitativamente se aprecia un acortamiento de las microvellosidades y tendencia al ensanchamiento de las mismas en los casos patológicos.

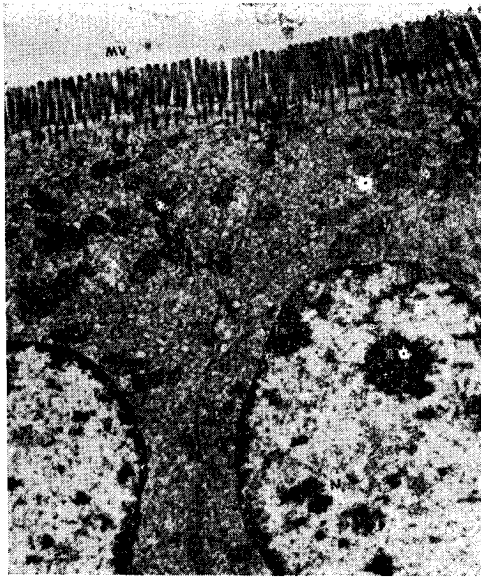


Fig. 2a.

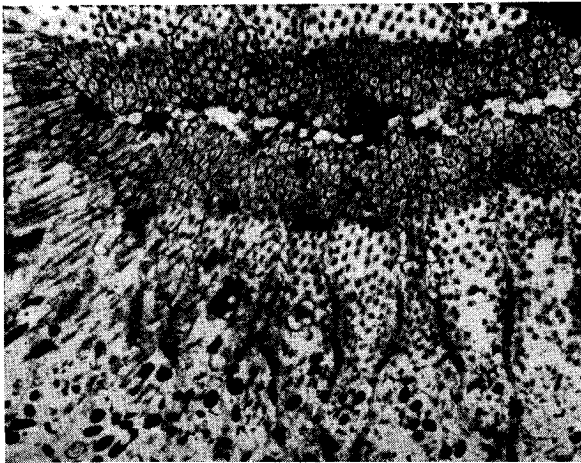


Fig. 2b.

Figs. 2a y b. a) Testigo mostrando sus microvellosidades íntegras al igual que en el resto de las estructuras. 36 900 x. b) Corte transversal de las microvellosidades de un testigo, con ultraestructura normal. 36 900 x.

Cuantitativamente, como se refleja en la Tabla I, se confirma la menor talla en las microvellosidades del yeyuno y del ileon, pudiendo remarcarse cambios más acusados a nivel yeyunal en este sentido.

TABLA I

Medida en micras de la longitud de las microvellocidades del epitelio en el intestino delgado. Valores comparativos entre testigos y diarréicos

Duodeno	Testigo	Reserpina	D. Espontánea
\bar{x}	0.717	0.729	0.608
s	0.102	0.125	0.093
Yeyuno			
\bar{x}	0.996*	0.414*	0.587
s	0.163	0.082	0.062
Ileon			
\bar{x}	0.746**	0.432**	0.56
s	0.11	0.069	0.075

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

Mitocondrias.

Las mitocondrias tanto en los reserpinizados como en los que sufren de diarrea espontánea muestran marcada tumefacción con pérdida de su estructura normal, esto se traduce por acortamiento de sus crestas así como borramiento de su matriz en los casos más graves. (Fig. 3).

Aparato de Golgi.

En los testigos no fue siempre posible observarlo y cuando se observó presentó su estructura característica así como su disposición intracito-

plasmática típica. (Fig. 2a). Una dilatación ostensible de sus sáculos se constata frecuentemente en las preparaciones que corresponden a los experimentales. Esto mismo es observable en los animales que sufrieron el síndrome espontáneo pero con menor intensidad. (Figs. 4a, b y c).

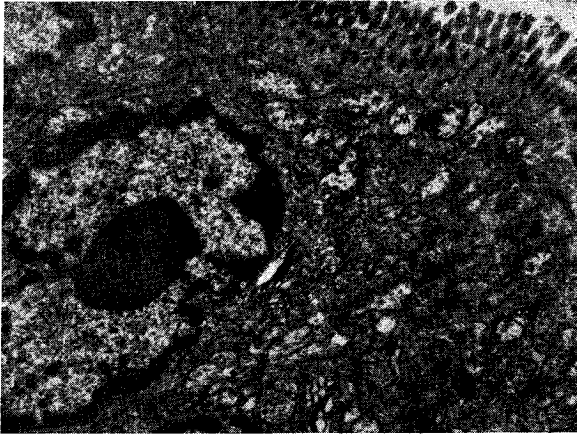


Fig. 3. Mitocondrias de aspecto tumefacto con pérdida de la estructura normal, marcado acortamiento de sus crestas, así como borramiento de la matriz en algunas de ellas. Diarrea experimental 19 600 x.

Retículo Endoplásmico.

No se apreciaron variaciones del retículo endoplásmico en cuanto a su desarrollo, en ninguno de los casos patológicos.

Uniones Celulares.

Las uniones en los casos experimentales con alteraciones más severas en sus estructuras se muestran fuertemente dilatados. (Fig. 5).

En los animales que sufrieron de diarrea espontánea se presentaron casos similares también en los de evolución más grave.

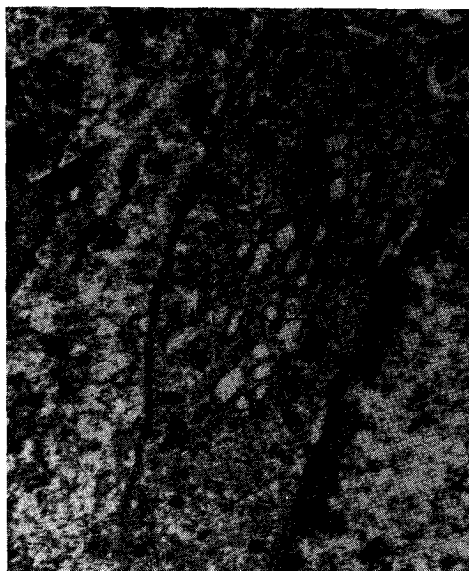


Fig. 4a.

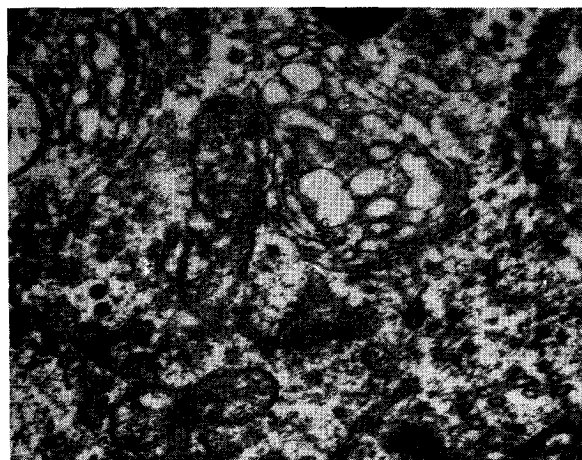


Fig. 4b.

Figs. 4a, b y c. Aparato de Golgi ostensiblemente dilatados en casos experimentales y espontáneos. a) 21 560 x b) 39 000 x c) 9 800 x.

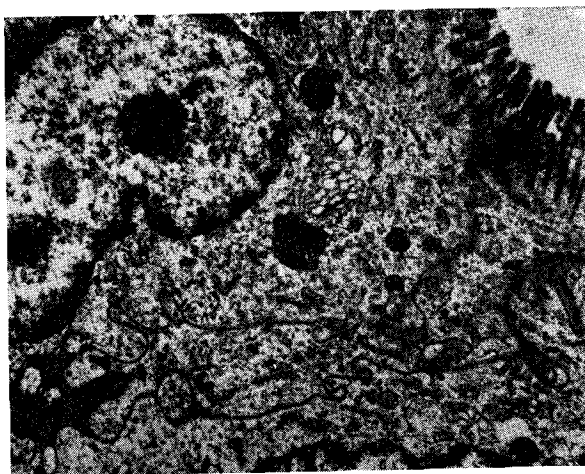


Fig. 4c.



Fig. 5. Fuerte dilatación de las uniones intercelulares. Núcleo mostrando indentaciones. Diarrea espontánea. 16 000 x.

Núcleo.

Este se aprecia con su forma ovalada y disposición basal en los normales. La heterocromatina formando una estrecha banda se encuentra rechazada hacia la envoltura nuclear (Fig. 6). Un cuerpo intranuclear con forma mielínica en uno de los casos también fue constatado.

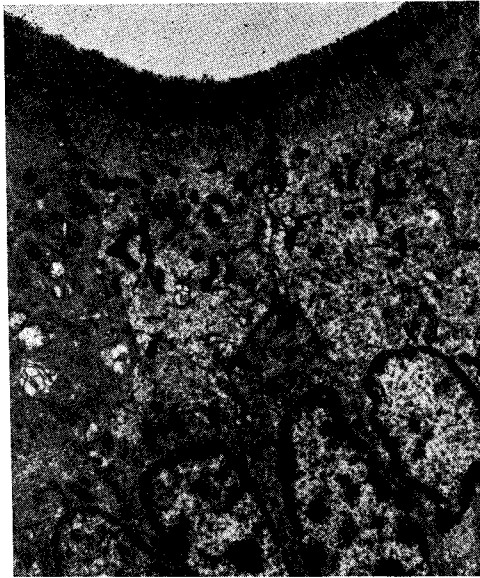


Fig. 6. Núcleo en testigos de forma ovalada y disposición basal. Heterocromatina formando una estrecha banda rechazada hacia la envoltura nuclear. 10 120 x.

Los que recibieron reserpina-endotoxina presentaron algunos núcleos irregulares con abundantes indentaciones y aplanamiento de los mismos. (Figs. 7a y b). Las mismas indentaciones aunque con menor desarrollo se apreciaron en los núcleos de algunas células en diarréicos espontáneos. (Fig. 5).

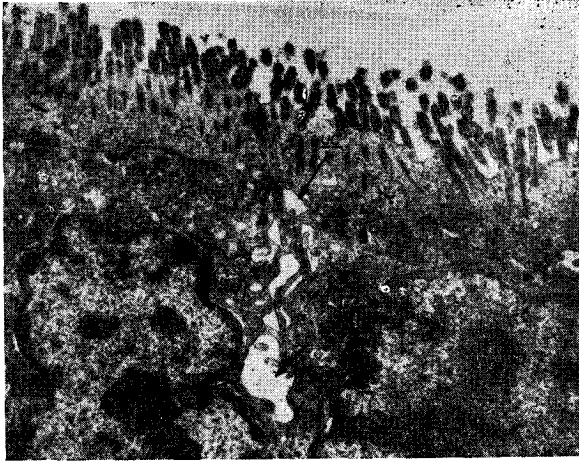


Fig. 7a. Núcleos irregulares con indentaciones. Acortamiento de las microvellosidades y dilatación de las uniones celulares. 23 650 x.

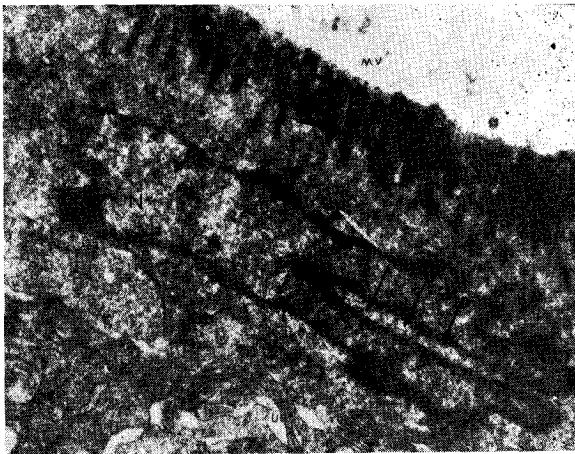


Fig. 7b. Diarrea experimental. 34 540 x.

DISCUSION

Uno de los signos más sobresalientes encontrados en nuestros resultados es la gran destrucción citoplasmática de los casos reserpinizados lo cual pudiera explicar en parte la abundancia de detritus celulares en la luz del intestino observados al microscopio óptico (*Verdura, 1972*). Las alteraciones en las microvellosidades dadas por tendencia al acortamiento y pérdida en zonas de las mismas fue también un rasgo significativo y común a ambos procesos, es decir, tanto en los diarreicos experimentales como en los espontáneos si bien es necesario señalar que para estos últimos las lesiones se comportaron de un modo más discreto. Las microvellosidades adoptan una morfología semejante a la descrita por Laumonier y cols., (*1970*) en síndrome de mal absorción en humano.

Los cambios estructurales mitocondriales encontrados por nosotros coinciden con los reportados por Kenworthy y cols., (*1967*) para síndrome de mala absorción en cerdos. Estos cambios mitocondriales tan marcados en período evolutivos relativamente cortos pudieran estar relacionados con trastornos de pH y osmolaridad así como con trastornos enzimáticos de la pared mitocondrial (*Verdura y Ortíz, 1973*).

Han sido señaladas alteraciones mitocondriales similares a las encontradas por nosotros por Anichkov y cols., (*1968*) en períodos de evolución tan cortos como 15 minutos relacionándolos con cambios enzimáticos en la pared mitocondrial producido por acciones irritativas, estos hallazgos fueron en mucosa gástrica de conejos.

En contraposición a todo este conjunto de alteraciones, Elliot y cols., (*1970*) no reportaron diferencias en el epitelio de perros sometidos a un síndrome diarreico por exotoxina colérica comparado con los patrones normales. Lo cual induce a pensar en mecanismos diferentes para estos tipos de diarreas.

La dilatación de las vesículas del aparato de Golgi, ha sido descrita por otros autores, Elliot y cols., (*1970*) y Freeman, (*1962*) asociados a un aumento del Retículo Endoplasmático Rugoso tomándolo como índice de actividad secretora en células caliciformes. Nosotros, además de estos hallazgos hemos encontrado dilataciones del aparato de Golgi en las células epiteliales absortivas en los animales con diarrea espontánea y provocada, planteándose que esto pudiera estar relacionado con fenómenos osmóticos.

En general se destaca una mayor distorsión de la ultraestructura celular en los casos de diarrea experimental, lo que denota una mayor gravedad en el desarrollo de las lesiones. Esta apreciación ha sido constatada anteriormente desde un punto de vista bioquímico-clínico (Fayet, 1971) y clínico patológico (Verdura, 1972 y Verdura y cols., 1973).

Por otra parte, no debemos dejar de señalar que en los casos de diarrea espontánea se observaron cambios mitocondriales así como en las microvellosidades, que aunque más discretos que los experimentales poseen elementos de semejanza.

Estos últimos aspectos señalan la posible relación de algunos factores comunes dentro de la patogenia de ambos procesos.

REFERENCIAS

- ANICHKOV S. V., ZAVODBKAYA I. S., MOREVA E. V. AND KORKHOV V. V. Mitochondrial changes in gastric mucosa and liner under Neurogenic Dystrophies. *Pharm.*, 1, 2, 1968.
- COMLINE R. S. AND SILVER M. Development of activity in the adrenal medulla of the factus and new-born animal. *Brit Med. Bull.*, 22, 16, 1966a.
- COMLINE R. S. AND SILVER M. The development of the adrenal medulla of the faetal and new born calf. *J. Physiol.*, 183, 305, 1966b.
- ELLIOT H. L., CARPENTER C. C., SACK R. B. AND VARDLEY J. A. H. Small bowell morphology in experimental canine cholera. *Lab. Invest.*, 22, 112, 1970.
- FAYET J. C. Experimental induction of diarrhea in calostrum fed young calves. In: Symposium of Physiology and Pathology of the Rearing of calves and Piglets held at Zidlo Koruce, 1 — 2 June, 1971.
- KENWORTHY R., STUBBS J. M. AND SYME G. Ultraestructure of samll-intestinal epithelium in weaned and unweaned pigs and pigs with pots-weaning diarrhoea. *J. Pathol. Bact.*, 93, 493. 1967.
- LAUMONIER R., MARCHE C. I. AND METAYER J. La cellule abserbante intestinale danes les syndrome de malabsorption. *La Press Medicale*, 78, 1089, 1970.
- LUFT J. K. Improvements in Epoxy resin embelding methods. *J. of Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409, 1961.
- MILLONING G. Advantage of Phospate Buffer for O_sO_4 solution in fictation. *J. of Appl. Phys.*, 32, 1637, 1961.
- OPLISTIL M. Contribution to the Role of Adrenal Conter in the development of blood electrolytic composition disorders in scouring calves. *Acta Vet. Brno.*, 39, 17, 1970.

- REYNOLDS E. S. The use of lead citrate of high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J. cell. Biol.*, 17, 208, 1963.
- SCHOENARES F. Reproduction experimentale de la colibacillose du veau La diarrhée des veaux nouveau-nés maladies infectieuse ou (et) métabolique. Theix 13-14-15 Oct., 1970.
- SOJKA W. J. Escherischia coli in domestics animals and poultry. Rev. Ser. Common. Bu. Anim. Health No. 7.
- TENNANT B. Introduction to neonatal enteric infections caused by Escherischia Coli. Ann New York. Acad. Sci., 176, 7, 1971.
- VERDURA T. Morphologie histochimie du système entero chromaffine et motricité de l'intestin au cours de la diarrhée spontanée ou expérimentale du veau nouveau-né 130 p, Thèse Doct. 3ème. Cycle, Clermont-Ferrand, 1972.
- VERDURA T. Y ORTÍZ R. Datos no publicados, 1973.
- VERDURA T., CASTELLANOS R., JOA R. Y FIGUEREDO J. M. Alteraciones tisulares y hemáticas en la reproducción experimental de la diarrea del ternero con reserpina y endotoxina. III Jornada de Ciencias Veterinarias, La Habana, Dic. 1973.
- FREEMAN J. A. Fine structure of the goblet cell mucous secretory process. *Anat. Rec.*, 144, 341, 1962.