

1986-1

Registro 79200891

Universidad de Guadalajara

Facultad de Ciencias Biológicas



Estudio Citoquímico del Establecimiento de la Barrera
Intestinal de Cerdos Recién Nacidos

Tesis Profesional

Para obtener el Título de:

Licenciado en Biología

Presenta:

Norma Rosete Hernández

Guadalajara, Jalisco. 1990.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

1340/89

Número

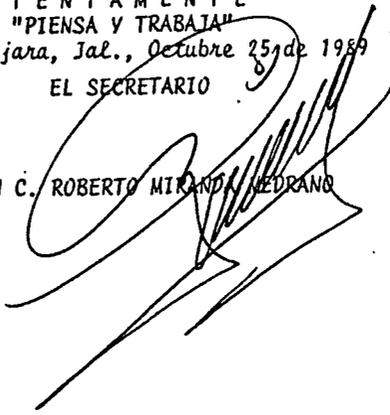
SRITA. NORMA ROSETE HERNANDEZ
P R E S E N T E . -

Manifetamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTUDIO CITOQUIMICO DEL ESTABLECIMIENTO DE LA BARRERA INTESTINAL DE CERDOS RECIEN NACIDOS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al M.en C. Juan Mora Galindo.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Octubre 25 de 1989
EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO



c.c.p. M.en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Guadalajara, Jal., 28 de Septiembre 1990.

M. en C. Carlos Beas Zarate,
Director de la Facultad de Ciencias Biologicas,
Universidad de Guadalajara,
Presente.

Por medio de la presente me permito saludarlo y comunicar a usted que la señorita ROSETE HERNANDEZ NORMA, pasante de la Licenciatura en Biología con número de código: 079200891 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulada:

"ESTUDIO CITOQUIMICO DEL ESTABLECIMIENTO DE LA BARRERA
INTESTINAL DE CERDOS RECIEN NACIDOS"

Realizado en el Departamente de Investigacion Cientifica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo.

Sin mas por el momento me despido de usted s. s. s.

ATENTAMENTE;



M. en C. Juan Mora Galindo.

A LA MEMORIA DE MI

PADRE

POR CREER EN MI Y EN LO QUE HAGO

**A MI FAMILIA POR SU INFINITO: APOYO
AMOR
RESPETO
Y
PACIENCIA**

A MI GRAN AMIGO POR ESTAS BENDICIONES

ASESORES

M. EN C. ESTHER ALBARRAN RODRIGUEZ

M. EN C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

CUORA



BIBLIOTECA CENTRAL

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. JUAN MORA GALINDO

CREDITOS INSTITUCIONALES

**A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD
DE SUPERARME ACADEMICA Y PROFESIONALMENTE**

**AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) POR EL
APOYO ECONOMICO BRINDADO AL PROYECTO (PCSACNA-050735)**

**A LA FAC. DE MED. VET. Y ZOOTECNIA Y EN ESPECIAL AL DEPTO.
DE INVESTIGACION Y POSTA ZOOTECNICA COFRADIA POR PERMITIR LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO**

**ESTUDIO CITOQUIMICO DEL ESTABLECIMIENTO DE LA BARRERA
INTESTINAL DE CERDOS RECIEN NACIDOS.**

I N D I C E

C O N T E N I D O	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
JUSTIFICACION	10
HIPOTESIS	11
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y METODOS	13
RESULTADOS	19
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFIA	45

RESUMEN

Para estudiar la influencia del calostro y la edad en el fenómeno de absorción y establecimiento de la "barrera intestinal"; se utilizaron 15 lechones en 5 grupos de tres; con edades de 12-24 h, 4 y 6 días alimentados normalmente, lechones de 4 días privados de calostro y de la misma edad pero sacrificados 1 día después de la ingestión del calostro. Se formó un asa control y otra experimental a esta última se le inyectó 10mg/ml de peroxidasa. Después se determinó citoquímicamente la presencia de la enzima en el duodeno, yeyuno e íleon de cada lechón. Fragmentos de ambas asas se incubaron en medios; completo de Karnovsky, con inhibidor (3'3-aminotriazol) y en ausencia de H_2O_2 . El material se revisó en cortes de criostato y parafina. En las asas experimentales incubadas en el medio completo se observó una diferente actividad absortiva en las distintas regiones del intestino. Los lechones de 24 h de edad mostraron abundantes depósitos intracelulares de peroxidasa en las tres regiones del intestino delgado, en lechones de 4 días alimentados normalmente la actividad absortiva fué menor, en los otros animales de ésta misma edad; que no ingirieron calostro y que lo recibieron tardíamente, se incrementó notablemente la capacidad de absorción de peroxidasa en todo el intestino delgado. En estos lechones, a diferencia de los controles se observaron vacuolas intracitoplasmáticas en las células columnares presentes en la parte apical y media de las vellosidades indicativas de la incorporación masiva de substancias intraluminales y su almacenamiento transitorio en vacuolas. A los seis días de edad únicamente se observaron escasos residuos intracelulares de marcador en yeyuno e íleon. Solamente se localizó la peroxidasa en el espacio intracitoplásmico como agregados de aspecto vesicular o en el glucocalix de células absortivas. Los resultados obtenidos indican que por la ingestión retardada o la ausencia del calostro no se establece la permeabilidad específica del epitelio intestinal dentro del período normal postnatal, asimismo la presencia intraluminal del calostro es un estímulo intenso para la endocitosis.

BA



BIBLIOTECA CENTRAL

INTRODUCCION

Muchos de los mamíferos, entre éstos el hombre y los simios adquieren durante la gestación resistencia natural a agentes infecciosos o tóxicos, esto se conoce como inmunidad pasiva y sucede por el transporte de inmunoglobulinas a través de la placenta, por lo que al nacer los productos tienen anticuerpos (Ac) circulantes en el torrente sanguíneo.¹

La ingestión del calostro materno confiere una protección adicional en los lactantes, ya que mediante éste se incorporan cantidades importantes de Ac de distintos tipos, el intestino los absorbe y pasan al torrente sanguíneo durante las primeras 24 horas en gran cantidad, además el calostro contiene linfocitos inmunológicamente activos, polimorfonucleares y neutrófilos activados.²⁻⁴

En otros mamíferos no sucede la transferencia prenatal de inmunoglobulinas, por lo que los animales recién nacidos son altamente susceptibles a infecciones al carecer de mecanismos protectivos. La incapacidad de transferir Ac durante la gestación se debe al tipo de placenta; las proteínas sólo pueden atravesar la placenta en determinadas especies, sobre todo cuando ésta es hemocorial, en la que los vasos sanguíneos del feto y la madre están estrechamente relacionados. En la placenta epiteliocorial de equinos y suinos los vasos sanguíneos fetales y maternos están separados por capas tisulares gruesas que no permiten el transporte de Ac durante la gestación, en éstas especies es importante la ingestión del calostro por los recién nacidos para que puedan adquirir gamaglobulinas.⁴⁻⁴

Bajo éstas condiciones, para adquirir la inmunidad debe ingerirse el calostro materno durante las primeras 24 a 36 horas postnatales, de ésto depende la sobrevivencia de las crias debido a que su sistema reticulo-endotelial es poco desarrollado.^{2.4-6}

La absorción intestinal de macromoléculas del calostro no es selectiva, se ha demostrado que pueden penetrar moléculas heterólogas o no biológicas como el polietilenglicol, la permeabilidad de la mucosa persiste poco tiempo después del nacimiento. La duración de éste período varía según la especie y el momento en que se ingiere el calostro después del nacimiento, posteriormente se inicia un transporte altamente específico y solo bajo condiciones patológicas en que se lesiona la integridad del epitelio pueden volver a penetrar macromoléculas, así como partículas virales, tóxicas, restos de microorganismos bacterianos y polipéptidos que desencadenan severas respuestas inmunológicas.^{1.7.8}

Se han realizado diversos estudios sobre el mecanismo de incorporación transepitelial de macromoléculas mediante métodos fisiológicos, bioquímicos y estructurales, también se han propuesto varias explicaciones acerca de los factores que intervienen en la regulación del fenómeno de la "barrera intestinal", entre los más importantes están:

a) Edad.- Se relaciona con el grado de maduración del epitelio.^{9.10.11.12}

b).- El momento en que sucede la ingestión del calostro. Si se retrasa la ingestión del calostro se prolonga la capacidad de absorción de globulinas.¹³

Se han reportado también diferencias en la actividad absorptiva regional del intestino de recién nacidos, algunos investigadores señalan que el fenómeno sucede con mayor importancia en las regiones proximales del intestino delgado por la mayor cantidad de globulinas que se incorporan, mientras que otros atribuyen al ileon ésta propiedad.¹⁴⁻¹⁶

Las teorías más importantes para explicar el fenómeno de permeabilidad no selectiva al paso de macromoléculas proponen la incorporación de éstas a través del espacio intercelular hasta el endotelio linfático o sanguíneo, así como el transporte del material intraluminal por la formación de vesículas endocíticas en la membrana plasmática y la subsecuente exocitosis a nivel de la lámina basal, sin que se haya producido degradación por la actividad lisosomal intracitoplasmática de células epiteliales como normalmente ocurre.¹⁴⁻¹⁷

El intestino delgado del cerdo consta de duodeno, que en una porción está unido directamente a la pared abdominal y el yeyuno e ileon que son móviles, entre éstas tres regiones no se aprecian diferencias anatómicas. Entre las diversas estructuras especializadas se distinguen: pliegues circulares, vellosidades, glándulas especiales y nódulos linfoides.¹⁸⁻¹⁹

La pared intestinal consta de 4 capas que del exterior al lumen son: serosa, muscular, submucosa y mucosa. La primera está compuesta por células epiteliales escamosas (mesotelio) separadas de la muscular por una capa delgada de tejido conectivo laxo que cubre completamente al tubo alimenticio, la muscular presenta dos arreglos de músculo liso; longitudinal y circular.

La submucosa se encuentra entre la muscular interna y la mucosa, consiste de tejido conectivo, posee una red de vasos sanguíneos y linfáticos y está inervada por fibras nerviosas y plexus de Meissner.^{20,21}

La mucosa consta de: a) muscular-mucosa, b) lámina propia y c) revestimiento epitelial monoestratificado cilíndrico.^{18,22}

En el epitelio del intestino delgado se distinguen dos zonas bien diferenciadas; las criptas de Lieberkhun y las vellosidades. En las primeras sucede proliferación de células columnares, caliciformes o mucosecretoras, y se observan además células enterocromafines, de Paneth, figuras mitóticas y células indiferenciadas.²³⁻²⁵

En las vellosidades están presentes principalmente células columnares, caliciformes y enterocromafines en menor proporción.
¹⁹⁻²⁰ Los pliegues circulares que se proyectan en la luz del intestino se observan después del píloro, son más frecuentes y pronunciados en el duodeno y yeyuno superior, se hacen más pequeños en el yeyuno inferior y son casi invisibles en el íleon inferior.

Las vellosidades son pequeñas proyecciones de la superficie mucosa del intestino delgado, cada vellosidad está cubierta por un epitelio cilíndrico simple, contienen una rica red de vasos y un vaso linfático central ciego denominado quilífero, las vellosidades varían de forma en las diferentes regiones del intestino delgado. En el duodeno son bajas y anchas como hojas; en el yeyuno son más delgadas y digitiformes; en el íleon tienen forma de porra.

Las glándulas intestinales tubulares simples o criptas de

Lieberkhun se encuentran por todo el intestino delgado, están localizadas entre las vellosidades adyacentes y se extienden hasta la muscularis mucosae, pero no la penetran.

Las glándulas duodenales o de Brunner penetran en la submucosa, son estructuras túbulo-alveolares ramificadas.

El tejido linfoide nodular se encuentra distribuido por todo el intestino delgado. Los nódulos aparecen separadamente o en agregados denominados placas de Peyer. Los nódulos diseminados son más grandes y numerosos en las porciones posteriores del intestino delgado que en las anteriores y las placas de Peyer se encuentran principalmente en el ileon.²⁴

La mucosa del intestino delgado muestra el epitelio continuo de las criptas junto con el de las vellosidades. En una glándula de Lieberkhun pueden distinguirse cinco tipos de células epiteliales:

1-Células de Paneth. Se alinean en la base de las glándulas y contienen gránulos citoplasmáticos eosinofílicos.

2-Células caliciformes, cuando su citoplasma está lleno de material secretorio basófilo el núcleo se localiza en posición basal.

3-Células en división.

4-Células argentafines o enterocromafines (se requieren métodos especiales de tinción para su identificación histológica).

5-Células columnares ó absortivas.

El epitelio tiene funciones fundamentalmente absortivas, para ésto las células especializadas poseen una gran extensión de superficie de membrana mediante las microvellosidades. Debajo de

éstas se encuentra una red terminal de filamentos finos densamente arreglados, éstos hacen más rígida y estable la superficie apical.²⁴

El establecimiento de la "barrera intestinal" posiblemente se realiza por la presencia de sustancias inductoras del calostro, la acción del aparato lisosomal intracelular sobre las vesículas endocíticas, o por modificaciones en el potencial eléctrico transmembranaí.^{3.27}

La permeabilidad intestinal ha sido estudiada con marcadores que son sustancias orgánicas o inorgánicas que se utilizan para analizar los distintos mecanismos de transporte transepitelial "in vivo", "in vitro" e "in situ".

Entre las sustancias orgánicas que se utilizan con frecuencia está la peroxidasa, es una enzima porfirina-hierro que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en H_2O y O_2 . La reacción de la peroxidasa requiere la presencia de un sustrato oxidable (AH_2), así: $AH_2 + H_2O_2 \longrightarrow A + H_2O$

La enzima peroxidasa tiene un peso molecular de 44,000 daltons y normalmente existe peroxidasa endógena en los eritrocitos, granulocitos y leucocitos.^{24.28}

La peroxidasa de raíz fuerte se utiliza para estudios de permeabilidad intestinal mediante métodos inmunocitoquímicos en estudios "in situ" y para cuantificación indirecta.²⁹

Con el propósito anterior se han hecho estudios de absorción intestinal utilizando ferritina (10mg/ml) y partículas virales en yeyuno de ratas normales o con una dieta deficiente en proteínas. Se encontró que las células columnares de ambos grupos absorbieron

la ferritina y las partículas virales por pinocitosis. En ratas con la dieta deficiente en proteínas se observó además material exógeno en los espacios intercelulares del epitelio de la lamina propia y alteraciones en las uniones intercelulares apicales.³⁰

Se han realizado trabajos de infiltración linfocitaria en el epitelio intestinal de fetos de conejos, utilizando la peroxidasa como marcador y se ha encontrado ésta molécula en los espacios intercelulares del epitelio coincidiendo con el transporte de compuestos semejantes a través de dichos espacios hacia la lámina propia subyacente.³¹

Para estudiar la permeabilidad intestinal en cerdos recién nacidos de 0-168 h de edad, se ha utilizado una mezcla de polietilenglicol de diferentes tamaños (414-942 daltons) suministrado por tubo estomacal junto con ovoalbúmina y albúmina de suero bovino. Dos horas después del suministro se encontraron cantidades considerables de ovoalbumina y albumina en el suero de animales de 24 h de edad, mientras que pequeñas cantidades o nada fue encontrada en animales de mas edad. En contraste las partículas de polietilenglicol se encontraron en todos los cerdos incluyendo a los recién nacidos destetados.³²

Por lo antes mencionado y debido a que no se conoce la influencia particular de los diversos factores que perticipan en la regulación del transporte intestinal de los lechones recién nacidos se propuso el presente estudio, para analizar las variaciones en la permeabilidad del epitelio intestinal al paso de macromoléculas orgánicas, ya que el establecimiento del cierre intestinal es de suma importancia para la supervivencia y

conservación de la salud de los animales.

JUSTIFICACION

En la actualidad no está completamente entendida la manera como la edad y el momento después del nacimiento en que se ingiere calostro por primera vez afectan la permeabilidad intestinal del cerdo recién nacido. Para aumentar la información al respecto y por la gran importancia del fenómeno para la supervivencia de los animales neonatos se seleccionó al cerdo como modelo experimental ya que la placenta materna de esta especie no permite el transporte de inmunoglobulinas protectoras durante la vida intrauterina y su incorporación sucede a través del intestino en la vida postnatal inmediata, por lo que durante esta etapa de permeabilidad indiscriminada pueden incorporarse macromoléculas como la peroxidasa, que mediante técnicas citoquímicas se hacen visibles. Además, el cerdo es una especie de importancia alimenticia para el ser humano y sus productos se industrializan para la elaboración de diferentes artículos. En biomedicina estos animales se utilizan para obtener algunos biológicos, sueros hiperinmunes e insulina.

HIPOTESIS

La permeabilidad no selectiva del intestino delgado de cerdos neonatos varía en relación con la región intestinal, la edad y el inicio en la ingestión de calostro.

OBJETIVO GENERAL

Conocer las variaciones en la capacidad de incorporación de peroxidasa de raíz fuerte de las distintas regiones del intestino delgado de lechones recién nacidos y de cuatro y seis días de edad, en relación con la primera ingestión de calostro.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar las variaciones que normalmente suceden en la permeabilidad del intestino delgado de lechones recién nacidos a los cuatro y a los seis días de edad mediante el uso de peroxidasa de raíz fuerte.

2.- Analizar los efectos que provoca la ausencia de calostro o la ingestión retardada del mismo sobre la permeabilidad del intestino delgado de cerdos.

3.- Comparar las diferencias en la capacidad absorbente del duodeno, yeyuno e íleon de lechones en las edades descritas y bajo las mismas condiciones.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 15 lechones híbridos Duroc-Yorkshire de diferente sexo con edades entre 1 a 6 días con los que se formaron 5 grupos. El primer grupo consistió de 3 animales de 12 a 24 h de edad que ingirieron calostro normalmente. El segundo grupo estuvo formado por 3 lechones de cuatro días de edad, en condiciones normales. El tercer grupo con el mismo número de animales de 4 días de vida no recibieron calostro durante los 4 días de vida, solo se les suministró solución de electrolitos con el 5% de glucosa. El cuarto grupo se formó con tres lechones que recibieron calostro por primera vez a partir del tercer día postnatal y se sacrificaron un día después. El último grupo fue formado por tres cerdos de 6 días de edad que se alimentaron normalmente.

Los animales de los grupos experimentales 3 y 4 se retiraron de la camada inmediatamente después del nacimiento, se mantuvieron a temperatura constante de 30-32 °C y se les suministró una solución de electrolitos con el 5% de glucosa cada 60-90 minutos hasta el sacrificio ó inicio de suministro del calostro.

Antes de realizar los experimentos los animales fueron pesados, anestesiados mediante inyección intramuscular de Stresnil (azaperona, 2 mg/kg), seguida de una inyección intraperitoneal de Hipnodil (metomidato, 10 mg/kg) (Lab. Janssen), y se colocaron en decúbito dorsal sobre una base de madera para ser inmovilizados mediante cinta adhesiva antes de practicar laparotomía media abdominal. En la herida se colocaron gasas impregnadas con

solución salina fisiológica a temperatura corporal y se exteriorizó el intestino para localizar el ileon y formar las primeras dos asas de 5 cm de longitud (con mucha suavidad se desplazó el contenido del intestino antes de formar las asas) con separación de 10 cm entre una y otra. En el espacio intraluminal del asa más distal se inyectó 1 ml de solución salina que contenía 10 mg de peroxidasa (Tipo II, Sigma Chem. Corp.), en la segunda asa se inyectó el mismo volumen de solución salina, para luego volver este segmento a la cavidad abdominal y exponer el yeyuno y duodeno en donde se repitió el mismo procedimiento. Durante el experimento se humectaron constantemente los tejidos con solución salina y se mantuvo la temperatura corporal del animal con una lámpara incandescente (foco de 100 watts) colocada a 30 cm sobre el abdomen del lechón. Después que transcurrieron 30 a 45 min de haber inyectado la peroxidasa en el lumen intestinal se disectaron quirúrgicamente las asas siguiendo el orden postero-anterior en que se formaron, finalmente el animal se sacrificó por exanguinación mediante sección de la arteria abdominal posterior. Los segmentos intestinales se cortaron con navajas de rasurar a lo largo del borde mesentérico para extenderlos y enjuagarlos por 10 min en solución salina fisiológica a temperatura ambiente y formar rollos del tejido con la mucosa hacia el exterior, luego se transfirieron al medio de fijación de Karnovsky^{29,33} en el que permanecieron durante la noche a temperatura ambiente. Después de esto los tejidos se lavaron en dos cambios de 30 min en amortiguador de cacodilato de Sodio 0.1 M pH 7.2, luego se transfirieron a una solución Tris-HCl 0.05 pH

7.4 por 30 min. De este material se obtuvieron cortes de 40 μ m de espesor en un crióstato American Optical, así como fragmentos rectangulares de 4 a 5 mm de espesor. Se separaron los mejores cortes del crióstato, así como los fragmentos para formar tres grupos por cada asa control y experimental del duodeno, yeyuno e íleon respectivamente. El primer grupo de cortes y fragmentos rectangulares se depositaron en el medio de preincubación de Karnovsky (compuesto por 5 mg de diaminobencidina en 10 ml de amortiguador Tris-HCl) en cajas petri, se agitaron suavemente en intervalos de 5 min durante 15 min, después se agregaron 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 1%. En el segundo grupo, además del medio de preincubación se adicionaron 0.1 ml de inhibidor 3'3 amino-triazol, 1 M, finalmente los fragmentos restantes se mantuvieron en el medio de preincubación sin adición de ninguna otra sustancia. Una vez que se completaron los distintos medios que contenían los tejidos se dejaron transcurrir 30-45 min con agitaciones suaves, luego se lavaron los tejidos en dos cambios de 15 min con Tris-HCl. Los cortes obtenidos del crióstato se deshidrataron y montaron en portaobjetos para el análisis cualitativo de la reacción citoquímica mediante el uso de un microscopio de contraste de fases. Los fragmentos de 4 a 5 mm de espesor se enjuagaron con amortiguador de cocadilatos, y posteriormente se deshidrataron en series crecientes de etanol, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 3 a 5 μ m de espesor en un microtomo American-Optical, éstos se tiñeron ligeramente con azul de toluidina para el análisis descriptivo y cuantitativo al microscopio de luz.

El análisis cuantitativo se realizó con la ayuda de un micrómetro lineal, utilizando el objetivo 10x se cuantificó el número de vellosidades por cada 5 mm y el de aquellas que contenían producto de reacción.

De todo el material se obtuvieron imágenes en un fotomicroscópio Zeiss Fomi-III con película Fluxs-X-Pan de 35 mm ASA 125, con impresiones en papel se completó el estudio.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

15 LECHONES HÍBRIDOS DE AMBOS SEXOS, CON EDADES ENTRE 1 Y 6 DÍAS.

3 ANIMALES DE 24 h QUE INGERIERON CALOSTRO EN FORMA NORMAL.

3 LECHONES DE 4 DÍAS DE EDAD EN CONDICIONES NORMALES DE ALIMENTACIÓN.

3 LECHONES DE 4 DÍAS POSTNATALES QUE NO RECIBIERON CALOSTRO.

3 ANIMALES QUE RECIBIERON CALOSTRO HASTA EL TERCER DÍA DE EDAD DURANTE 24 h Y SE

3 CERDOS DE 6 DÍAS DE EDAD CRIADOS EN CONDICIONES NORMALES

ANESTESIA, PREPARACIÓN DEL ÁREA ABDOMINAL Y LAPAROTOMÍA MEDIA ABDOMINAL PARA LA EXPOSICIÓN DEL INTESTINO.

FORMACIÓN DE ASAS DE 5 cm DE LONGITUD CON 10 cm DE SEPARACIÓN EN LAS TRES REGIONES DEL INTESTINO DELGADO.

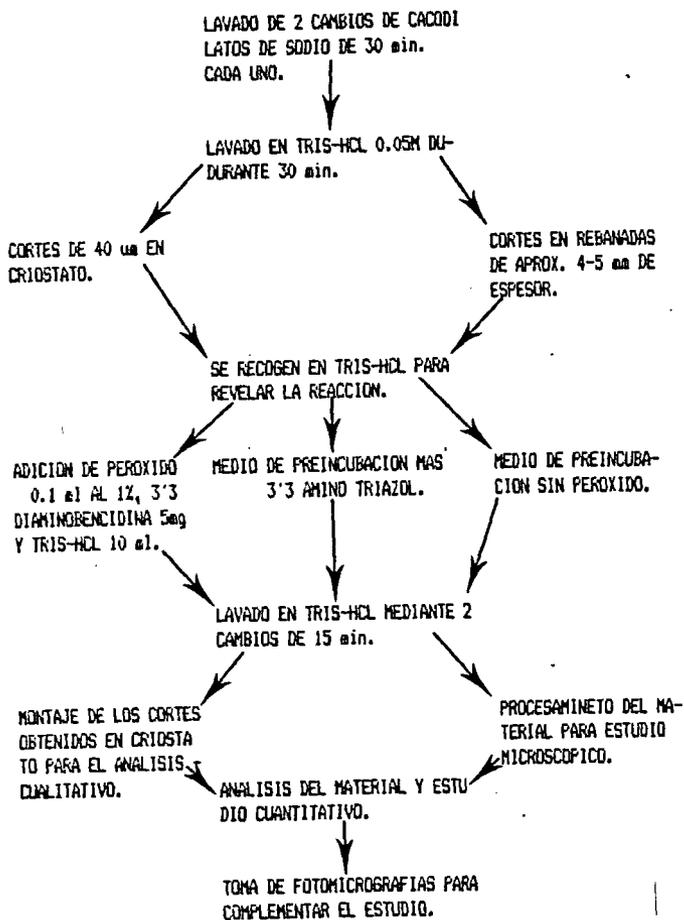
INYECCIÓN INTRALUMINAL DE 1 ml DE SOL. SALINA FISIOLÓGICA CON 10 mg DE PEROXIDASA.

INYECCIÓN DE 1 ml DE SOL. SALINA FISIOLÓGICA.

SECCIÓN DEL ASA INTESTINAL DESPUÉS DE 30 A 45 min DE CONTACTO CON LA SOLUCIÓN.

SECCIÓN DEL BORDE MESENTERICO EXPOSICIÓN DEL SEGMENTO Y LAVADO EN SOLUCIÓN SALINA DURANTE 10 min.

FIJACIÓN DE KARNOVSKY DURANTE TODA LA NOCHE (FORMACIÓN DE ROLLOS DE TEJIDOS) A TEMPERATURA AMBIENTE.



RESULTADOS.

Revelado de la reacción de peroxidasa exógena

En todos los lechones se encontró una reacción positiva evidente en las asas experimentales incubadas en el medio completo Karnovsky-peroxidasa, tanto los tejidos como el medio desarrollaron un color café oscuro.

En los otros tejidos provenientes de las asas experimentales incubadas en los medios con inhibidor y sin H_2O_2 ocasionalmente se observó una coloración café-amarillenta en el medio de revelado, sin embargo no se produjo reacción positiva en ninguno de los tejidos.

En el resto de las muestras controles sometidas a las diferentes condiciones experimentales, en todos los casos se encontró una reacción negativa por la ausencia de peroxidasa exógena en el asa o el medio de incubación utilizado.

En relación con la localización de la marca; principalmente se describen los resultados obtenidos del asa experimental en la que se inyectó peroxidasa y los tejidos fueron incubados en el medio completo de Karnovsky debido a que invariablemente se observó reacción negativa a peroxidasa exógena en los medios con inhibidor y sin H_2O_2 , los tejidos incubados en éstos se muestran con propósito estructural. Solo hubo falsos positivos por contaminación del medio, sin embargo en ninguno de éstos tejidos se observó marca.

Exámen de los tejidos mediante cortes en crióstato.

Lechones de 12-24 h de edad mantenidos en condiciones normales de crianza.

En este grupo la reacción citoquímica se observó en el tercio superior de las vellosidades (parte apical) en el duodeno e ileon, en el yeyuno la reacción fué intensamente positiva en las vellosidades completas y en los eritrocitos.

Cerdos neonatos de 4 días de edad mantenidos en condiciones normales de crianza.

Los tejidos provenientes de los animales de este grupo mostrarón reacción negativa extracelular e intracelular en las tres regiones intestinales examinadas, solo una muestra del ileon reveló reacción positiva en el epitelio y los eritrocitos.

Lechones de 4 días de edad sacrificados sin recibir calostro.

No se observó coloración indicativa de reacción positiva en el duodeno de ninguno de los lechones, en uno de los animales el yeyuno tampoco mostró reacción positiva, en los otros dos el producto de reacción a peroxidasa exógena tuvo diferente intensidad. En uno de los lechones el ileon presentó reacción negativa, un segundo animal reveló débil reacción positiva y el último mostró gran cantidad de peroxidasa.

Lechones mantenidos durante 3 días de edad con solución salina glicosada y sacrificados 1 día después de haber consumido calostro.

La reacción positiva se identificó claramente en todos estos cortes debido a una gran concentración de peroxidasa exógena sobre todo el epitelio. Solamente en el duodeno y yeyuno de uno de los lechones no se observó reacción positiva.

Cerdos neonatos de 6 días de edad mantenidos en condiciones normales.

En todos los lechones la reacción citoquímica fué negativa en duodeno, (Fig. 1). También lo fué en el yeyuno de uno de los lechones y positiva en los otros dos (Fig. 2), la marca se encontró distribuida en todas las vellosidades. En el ileon de dos lechones no se observó producto de reacción y en el ileon del otro animal se identificó reacción positiva en los dos tercios superiores de algunas vellosidades.

Material incluido en parafina.

Lechones de 12-24 h de edad mantenidos en condiciones normales.

En todos los animales la organización histológica de los tejidos examinados presentó un aspecto normal en las tres regiones estudiadas.

En un 37.24% de las vellosidades duodenales cuantificadas (tercio superior y medio) se observó marca intracelular positiva solamente en las células columnares, que también mostraron vacuolas y vesículas de diferente tamaño sobre todo aquellas células localizadas en las zonas media y apical de las vellosidades (Fig. 3). En este segmento la reacción fué ténue, tuvo mayor intensidad en el yeyuno donde se observó reacción positiva en el 45.63% de las vellosidades, los gránulos también se observaron en las células columnares. El ileon mostró reacción claramente distinguible en un 26.14% de las vellosidades cuantificadas (tercio superior y medio), en esta región la reacción citoquímica

también se evidenció como gránulos intracelulares presentes en la región apical de las células columnares (Cuadro 1); (Fig. 3a).

Cerdos neonatos de 4 días de edad mantenidos en condiciones normales de crianza.

Todos los lechones mantuvieron un estado de salud completamente normal. En el duodeno no se observó reacción positiva en la mayoría de las vellosidades examinadas, solamente se marcó un 2.22% de éstas, la peroxidasa se encontró sobre todo en la zona apical de las vellosidades como pequeños gránulos intracelulares, también se observó marca abundante entre las vellosidades en el espacio intersticial, los controles mostraron reacción negativa para peroxidasa de raíz fuerte, en los fragmentos incubados en ausencia de H₂O₂ solo se distinguió marca tenue en eritrocitos (Fig.4).

En los cortes de yeyuno se encontró reacción positiva intracelular en un 24.00% de las vellosidades (zona apical), la reacción también fué positiva para eritrocitos, en la mayoría de los tejidos incubados en el medio con inhibidor éstos no revelaron producto de reacción (Fig.5). En el íleon la reacción positiva intracelular se localizó distribuida irregularmente en el 1.19% de las vellosidades cuantificadas y fué muy tenue (Cuadro 1).

Lechones de 4 días de edad sacrificados sin haber recibido calostro a través del estudio.

En las tres regiones estudiadas una gran cantidad de células columnares revelaron vacuolas intracitoplasmáticas de diferente tamaño a lo largo de las vellosidades, en la parte apical se observaron las de mayor tamaño. En estos tejidos se identificó

marcador intracelular y en la zona del glucocalix de las vellosidades (Fig. 6).

En un 49.35% de las vellosidades duodenales cuantificadas se manifestó la reacción intracitoplasmática positiva desde el tercio medio hasta la zona apical. En el yeyuno se encontró un 40.66% de vellosidades con reacción intracelular en células columnares, la peroxidasa se encontró en forma de agregados granulares o gránulos dispersos alrededor de vacuolas pequeñas y grandes. Las capas muscular longitudinal y serosa también mostraron reacción positiva por la presencia de sangre en su superficie. En el íleon se encontró reacción positiva en un 24.13% de las vellosidades cuantificadas, la marca reveló las mismas características descritas para las otras dos regiones anteriores (Figs. 7 y 7a), (Cuadro 1). Lechones de 3 días de edad sacrificados 1 día después de haber ingerido calostro.

En las diferentes regiones intestinales de este grupo se observaron los mismos hallazgos descritos para el anterior, sobre todo por la abundancia de vacuolas. Un 54.06% de las vellosidades cuantificadas en duodeno revelaron reacción citoquímica positiva, en el yeyuno el porcentaje correspondió a un 78.57% (Fig. 8). En el íleon se encontró un 61.84% de vellosidades marcadas tanto en el espacio intracelular como en la membrana superficial (Cuadro 1), (Fig. 8a).

En las tres regiones también se observaron pequeñas vesículas y gránulos intracitoplasmáticos de peroxidasa en las células columnares presentes en los tercios medio y apical de las

vellosidades y marcador superficial en las capas muscular longitudinal y serosa. La reacción fué claramente identificable.

Cerdos neonatos de 6 días de edad criados en condiciones normales.

Del total de vellosidades examinadas en duodeno, un 2% reveló reacción citoquímica intracitoplasmática en forma de pequeños gránulos distribuidos irregularmente en toda la vellosidad. El yeyuno mostró un 39.90% de vellosidades marcadas, en éstas la peroxidasa estaba presente alrededor de las vellosidades y en el espacio intracelular. La reacción en esta región pudo identificarse claramente por la definición de los gránulos del marcador. En el ileon se localizó marcador en un 38.18% de las vellosidades, dentro de las células columnares se observaron claramente gránulos de peroxidasa dispersos en la matriz intracelular que en algunas imágenes parecen estar agrupados y delimitados por vesículas membranales, la distribución de la marca comprendió el tercio medio y superior de las vellosidades (Cuadro 1), (Figs. 9 y 9a).

Cuadro 1

Proporcion de vellosidades con peroxidasa intraepitelial/5mm.

GRUPO	DUODENO				YEYUNO			ILEON		
	N	Total de vell.	Vellos peroxid.	(%)	Total de vell.	Vellos peroxid.	(%)	Total de vell.	Vellos peroxid.	(%)
24 horas Alimentación convencional.	3	196	73	37.24	206	94	45.63	218	57	26.14
4 días Alimentación convencional.	3	180	4	2.22	225	54	24.00	168	2	1.19
4 días Sin calostro.	3	223	115	49.35	209	85	40.66	174	42	24.13
14 días. Sacrificados 24 h después de in- gerir calostro.	3	246	133	54.06	196	154	78.57	228	141	61.84
6 días de edad. Alimentación convencional.	3	250	5	2.00	208	83	39.90	165	63	38.18

FIG. 1

FOTOMICROGRAFIA DE UN CORTE DE CRIOSTATO DEL DUODENO DE UN LECHON CORRESPONDIENTE AL GRUPO DE ANIMALES DE 6 DIAS DE EDAD MANTENIDOS EN CONDICIONES NORMALES DE CRIANZA. (Asa experimental inyectada con peroxidasa e incubada en el medio con inhibidor (3'3 aminotriazol). EN LA PARTE INFERIOR DE LA IMAGEN SE OBSERVAN LAS CAPAS MUSCULAR (**cm**) Y SUBMUCOSA (**sm**) SIN NINGUN PRODUCTO DE REACCION A PESAR DE ESTAR PRESENTES VASOS SANGUINEOS QUE CONTIENEN ERITROCITOS (☆), SE OBSRVAN LAS VELLOSIDADES (**VS**) SIN PRODUCTO DE REACCION, X 172

FIG. 2

IMAGEN DE MEDIANA AMPLIACION DE UN CORTE DE CRIOSTATO DEL VEYUNO (Asa experimental) DE UN ANIMAL DEL GRUPO DE 6 DIAS MANTENIDOS EN CONDICIONES NORMALES DE CRIANZA, INCUBADO EN EL MEDIO COMPLETO. SE OBSERVA LA PEROXIDASA EXOGENA EN TODAS LAS CAPAS INTESTINALES Y CON MAYOR INTENSIDAD EN EL EPITELIO (→). LOS VASOS SANGUINEOS SE DISTINGUEN CLARAMENTE POR LA EXISTENCIA DE PEROXIDASA ENDOGENA EN LOS ERITROCITOS (☆), X 178

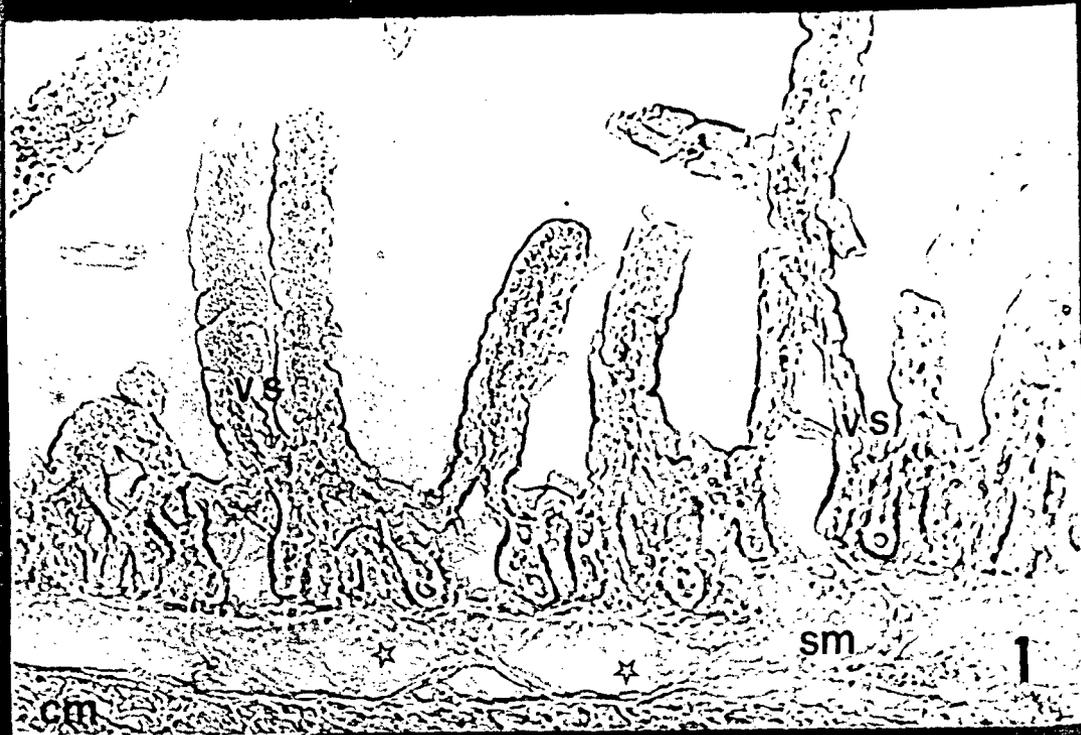


FIG. 3

FOTOMICROGRAFIA DEL DUODENO EXPERIMENTAL (Medio completo) DE UN ANIMAL DEL GRUPO DE 12-24 h; CONDICIONES CONVENCIONALES DE CRIANZA. SE MUESTRA LA REACCION POSITIVA INTRACELULAR EN FORMA DE VESICULAS () Y PEQUEÑOS GRANULOS () EN LA MATRIZ CITOPASMICA DE LAS CELULAS ABSORTIVAS PRESENTES EN LA ZONA BASAL Y MEDIA DE LAS VELLOSIDADES, X 453

FIG. 3a

FOTOMICROGRAFIA DEL ILEON DE UN LECHON (Animales de 12 a 24 h de edad, condiciones normales); ASA EXPERIMENTAL MEDIO COMPLETO. SE APRECIA EL MARCADOR EN FORMA DE VESICULAS INTRACELULARES (), X 962

FIG. 4

CORTE DUODENAL (Asa control) DE UN LECHON DEL GRUPO DE 4 DIAS DE EDAD; CONDICIONES NORMALES DE CRIANZA. SE APRECIAN CELULAS CALICIFORMES QUE SE DISTINGUEN POR SU MAYOR AFINIDAD TINTORIAL () Y CRIPTAS DE LIEBERKUHM SIN MARCA (), X 194



FIG. 5

IMAGEN DE MEDIANA AMPLIACION DEL YEYUNO EXPERIMENTAL DE UN LECHON DEL GRUPO DE 4 DIAS DE EDAD, CONDICIONES NORMALES DE CRIANZA, MEDIO CON INHIBIDOR (3'3 AMINO-TRIAZOL). SE MUESTRA EL EPITELIO (ep) SIN REACCION Y LOS ERITROCITOS QUE SE IDENTIFICAN EN EL ESPACIO LUMINAL DE LOS VASOS SANGUINEOS (☆) X 188.

FIG. 6

IMAGEN DE MEDIANA AMPLIFICACION DEL DUODENO DE UNO DE LOS LECHONES DEL GRUPO DE 4 DIAS DE EDAD SACRIFICADOS SIN HABER RECIBIDO CALOSTRO, (Asa experimental) EN LA QUE SE APRECIAN VACUOLAS INTRACITOPLASMATICAS DE GRAN TAMANO QUE EN ALGUNOS CORTES OCUPAN COMPLETAMENTE EL ESPACIO INTRACITOPLASMICO DE LAS CELULAS COLUMNARES (➔), TAMBIEN SE OBSERVA REACCION POSITIVA ALREDEDOR DE ALGUNAS VELLOSIDADES (➤) X 200



FIG. 7

FOTOMICROGRAFIA DEL ILEON DE UN LECHON DEL GRUPO DE 4 DIAS DE EDAD SACRIFICADOS SIN HABER INGERIDO CALOSTRO. (Asa experimental, medio completo) SE DISTINGUEN CELULAS COLUMNARES EN LA PARTE MEDIA Y APICAL DE LA VELLOSIDAD CON VACUOLAS DE DIFERENTE TAMAÑO (←), SE DISTINGUE EL ESPACIO CORRESPONDIENTE A LAS CELULAS MUCOSECRETORAS SIN COLORACION, MARCADOR ALREDEDOR DE LAS VELLOSIDADES (►), Y GRANULOS DE PEROXIDASA INTRACITOPLASMATICA (→) X 189

FIG. 7a

LECHON DE 4 DIAS DE EDAD (Ileon, asa experimental, medio completo). SE MUESTRA A MAYOR AMPLIFICACION LA DIFERENCIA ENTRE UNA CELULA CALICIFORME COLOREADA (►) Y UNA VACUOLA VACIA (←) X 1600

FIG. 8

IMAGEN DE MEDIANA AMPLIACION DEL YEYUNO DE UN CERDO NEONATO DEL GRUPO DE 3 DIAS DE EDAD SACRIFICADO UN DIA DESPUES DE HABER INGERIDO CALOSTRO. (Asa experimental, medio completo). SE OBSERVA VACUOLACION DE LAS CELULAS COLUMNARES (\rightarrow), ASI COMO GRANULOS, (\rightarrow) TAMBIEN SE DISTINGUE MARCA SUPERFICIAL EN LAS VELLOSIDADES (\blacktriangleright) X 176

FIG. 8a

FOTOMICROGRAFIA DEL ILEON DE UN LECHON DEL GRUPO DE 3 DIAS DE EDAD SACRIFICADO 1 DIA DESPUES A LA INGESTION DE CALOSTRO. (Asa experimental, medio completo) SE MUESTRAN EN DETALLE LAS GRANDES VACUOLAS INTRACITOPLASMATICAS QUE DESPLAZAN AL NUCLEO HACIA EL EXTREMO BASAL DE LAS CELULAS COLUMNARES (\rightarrow) Y PEQUEÑOS GRANULOS PRESENTES EN EL GLUCOCALIX DE LA MEMBRANA PLASMATICA SUPERFICIAL (\rightarrow) X 957

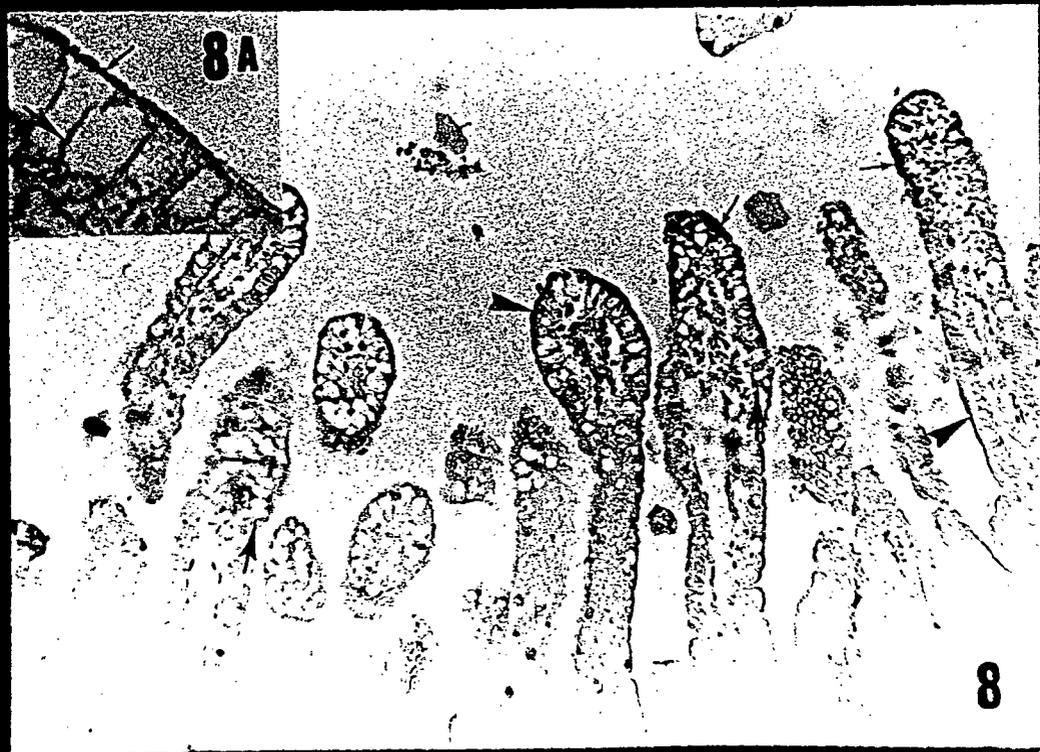
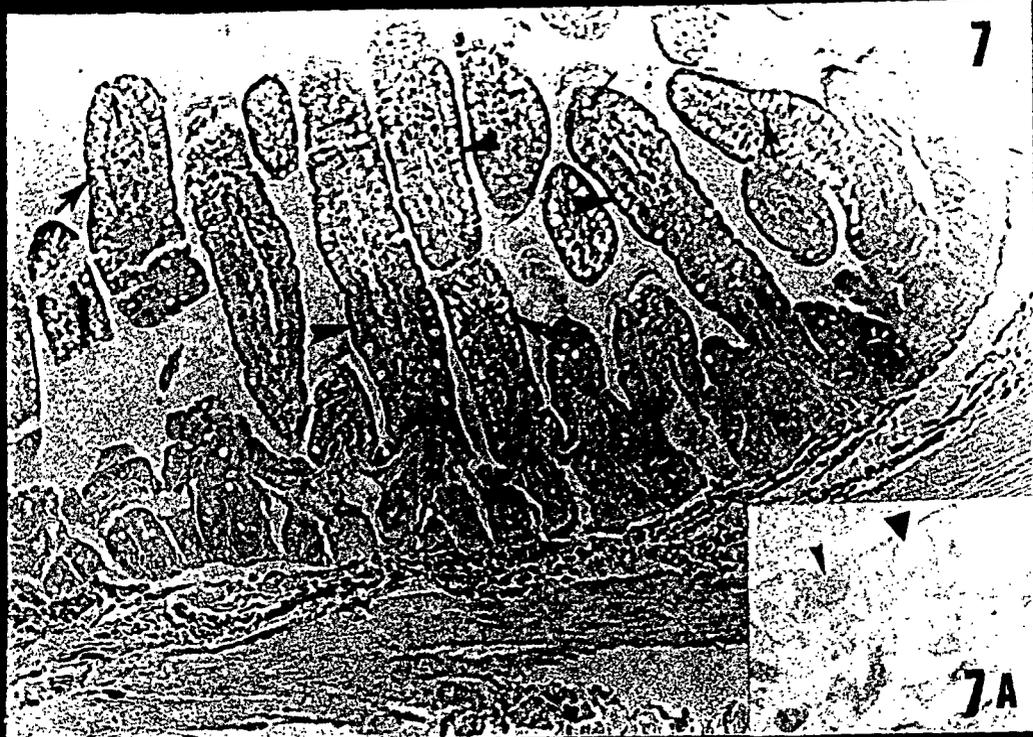
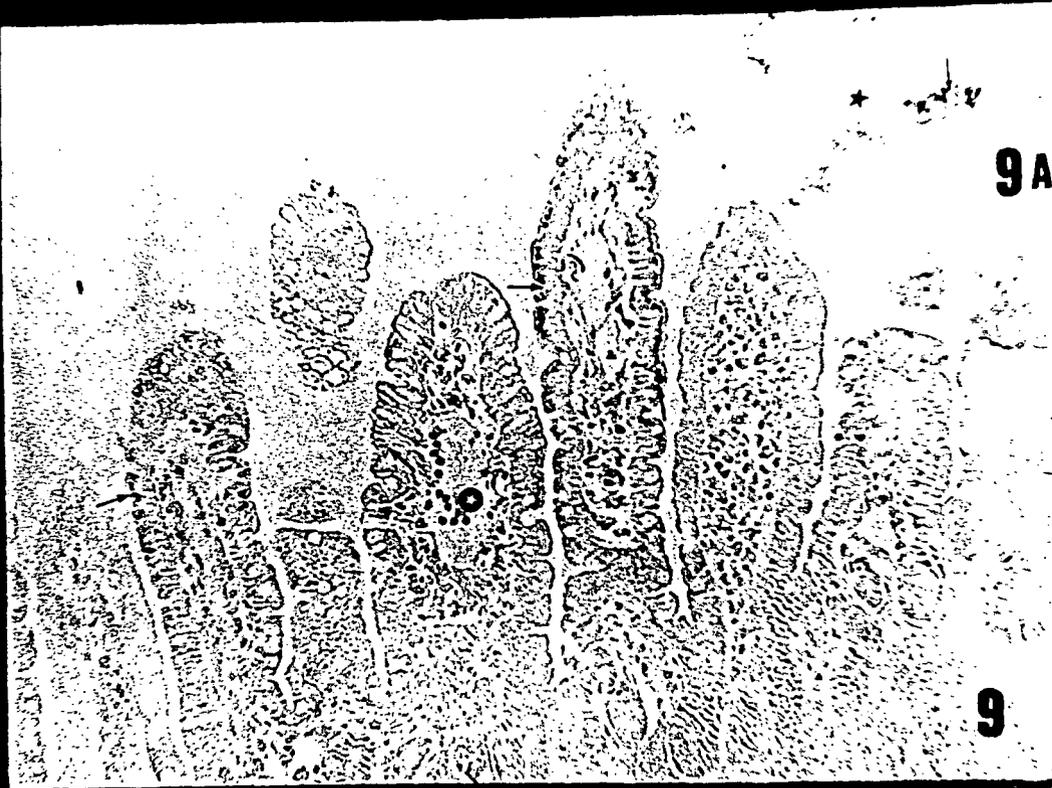


FIG. 9

IMAGEN DE MEDIANA AMPLIFICACION DE UN CORTE DEL ASA EXPERIMENTAL DE ILEON INCUBADA EN MEDIO COMPLETO. LECHON DEL GRUPO DE 6 DIAS DE EDAD (Condiciones normales), SE SEÑALA LA REACCION EN FORMA DE PEQUEÑOS GRANULOS INTRACITOPLASMATICOS (→) Y REACCION POSITIVA EN ALGUNOS ERITROCITOS QUE SE OBSERVAN EN UN VASO SANGUINEO DE LA LAMINA PROPIA DE DOS VELLOSIDADES (⊕) X 250

FIG. 9a

FOTOMICROGRAFIA DEL ILEON (Asa experimental, medio completo). LECHON DEL GRUPO DE 6 DIAS DE EDAD, CONDICIONES NORMALES. CORTE TRANSVERSAL DE VELLOSIDAD QUE MUESTRA LA PEROXIDASA EN FORMA DE PEQUEÑOS GRANULOS INTRACITOPLASMATICOS EN LA ZONA APICAL DE LAS CELULAS COLUMNARES, (→) NO SE OBSERVA MARCADOR EN LA ZONA DE LAS MICROVELLOSIDADES (★) X 480



9A

9

DISCUSION

La selección de las condiciones experimentales establecidas para este estudio tuvieron por objeto evaluar particularmente las modificaciones en la absorción de peroxidasa a través del epitelio intestinal después del suministro desfasado del calostro ó en ausencia de este.

Para el presente trabajo se utilizaron 3 diferentes controles para la interpretación del revelado de la reacción citoquímica; a) medio con inhibidor de la reacción, los tejidos provenientes de ambos tipos de asas no mostraron producto de reacción ni en las células sanguíneas. b) medio incompleto por la ausencia de peróxido, las muestras revelaron ligera reacción positiva exógena y c) asa tratada con solución salina fisiológica e incubada en el medio completo que solo revelaron reacción positiva endógena en eritrocitos y granulocitos, como ha sido previamente reportada.^{17,34}

El análisis de los cortes gruesos (40 μ m) provenientes del asa experimental e incubados en el medio completo no mostró claramente la reacción positiva, posiblemente debido a la falta de resolución para observar gránulos de peroxidasa en el espacio intracelular, extracelular o marca adherida a la superficie epitelial, sin embargo esto se resolvió cuando se examinó el material incluido en parafina de 3-5 μ m de espesor.

En el presente trabajo se encontró que en los lechones recién nacidos.(12-24 h) mantenidos bajo condiciones normales de crianza las tres regiones del intestino delgado tuvieron la capacidad de

internalizar peroxidasa a diferencia de otros reportes, en los que utilizando Ig marcadas se observó que el duodeno fué incapaz de absorberlas después de las primeras 3 h de vida.^{14.34}

La peroxidasa exógena se localizó predominantemente como gránulos presentes en vesículas en la región submembranal apical de las células absortivas, no se encontró marca en ninguna otra estirpe celular del epitelio superficial.

Para los lechones de 4 días de edad mantenidos en condiciones normales de alimentación solo el yeyuno mostró una intensa actividad de absorción, en cambio las regiones duodenal e ileal presentaron una mínima actividad. Resultados semejantes se han reportado por otros autores, quienes proponen que la capacidad de internalizar macromoléculas por las células epiteliales persiste después de las 36 o 48 h de vida postnatal, pero la capacidad de transporte extracelular del material endocitado cesa a las 36 h.^{14.34}

En animales de esta misma edad que no recibieron calostro se identificó un epitelio con vaculas de gran tamaño sin afinidad tintorial específica, éstas se han reportado anteriormente en el epitelio intestinal de lechones con edades entre 0 y 76 h postnatales pero deprivados completamente de agua y alimento. En estos animales también se evidenció una mayor capacidad de internalizar peroxidasa.¹⁰

Algunos reportes mencionan que la ausencia de calostro en el lumen intestinal bajo condiciones de inanición, suministro de agua o solución glucosada, retarda los estímulos que desencadenan el desarrollo de la "barrera intestinal".^{10.35}

En diversos experimentos se ha logrado mantener durante 36, 48 o 72 h postnatales la capacidad de absorción de macromoléculas. Nuestros resultados demuestran que para el grupo de lechones de 4 días que no recibieron calostro en ningún momento del estudio se mantuvo la permeabilidad no selectiva intestinal por 96 h postnatales. 10.14.35

En el grupo de animales de 4 días de edad sometidos a privación de calostro por 3 días, suministro a los 3 días y sacrificio a los 4 días se encontraron los resultados más sobresalientes; las tres regiones intestinales tuvieron una mayor capacidad absorptiva en comparación con el grupo anterior, en estos tejidos también se observó un epitelio vacuolado.

La ingestión de calostro por primera vez después del período normal retardó el estímulo para la restricción al paso de macromoléculas a través de la membrana plasmática de las células absorptivas, lo que provocó el ingreso masivo de la peroxidasa presente en el lumen intestinal. 4.11

La presencia de grandes vacuolas intracelulares se ha reportado como resultado de la acumulación de material endocitado en grandes cantidades, posiblemente lípidos y otros componentes del calostro. 5.17.38

Los animales experimentales de los grupos tercero y cuarto que recibieron solución electrolítica glucosada durante la vida postnatal inmediata sobrevivieron en buen estado de salud hasta realizar los experimentos gracias a ésta, por lo que fué necesario suministrarla constantemente durante el día y la noche.

Algunos lechones presentaron aumento del peristaltismo y otros más sufrieron deshidratación moderada al segundo o tercer día de recibir la solución, con la progresión de estos signos clínicos resultó la muerte de dos animales que fueron reemplazados. Otro animal sufrió una infección entérica al segundo día y también se eliminó debido a que han sido reportados efectos interferentes de Eschericia coli sobre la absorción intestinal.^{17.37}

Finalmente, a pesar de que los lechones del quinto grupo de 6 días de edad con alimentación normal mostraron un epitelio bastante desarrollado con definición completa de las características topográficas de las diferentes regiones de la pared intestinal, todavía se encontró escaso producto de reacción en menor cantidad que en los animales más jóvenes. La marca se localizó en la parte apical de las vellosidades del yeyuno e ileon.

Nuestras observaciones están en desacuerdo con las de otros autores, quienes afirman que a los seis días de edad bajo condiciones normales de alimentación la capacidad de absorción inespecífica de macromoléculas desaparece en las tres regiones del intestino delgado del lechón.^{12.14.32.35}

A diferencia de trabajos anteriores, en los que se utilizaron inmunoglobulinas marcadas éstas se localizaron exclusivamente en la parte apical de las vellosidades del intestino delgado de cerdos neonatos, los resultados del presente trabajo indican que también participa el tercio medio de las vellosidades, ya que a pesar de haber utilizado peroxidasa la manifestación del fenómeno es la misma.^{14.36}

Durante el presente estudio, el producto de reacción no tuvo el mismo patrón de distribución en las vellosidades de las distintas regiones examinadas, sin embargo fué posible establecer una tendencia relacionada con las condiciones particulares de cada grupo experimental. Solo en muy pocas muestras se encontró peroxidasa en todas las vellosidades, la localización varió entre la parte apical y/o media, aunque también se observaron diferentes distribuciones en una misma muestra.

Estas diferencias pueden deberse a que no todas las células epiteliales se encontraban en el mismo momento de absorción, aparte que el contacto del marcador con la superficie luminal no fué homogéneo por el contenido intestinal y las abundantes secreciones mucoides que se producen en los tejidos examinados.

En la mayoría de los cortes analizados el producto de reacción también se localizó en las capas submucosa, muscular longitudinal y serosa; probablemente debido a la difusión del producto de reacción, presencia de eritrocitos extravasados o por contaminación accidental.

Las principales hipótesis que se han propuesto para explicar la forma como se produce el paso inespecífico de macromoléculas propone la posible incorporación de éstas a través del espacio intercelular epitelial hasta el sistema vascular linfático o sanguíneo, o bien el transporte de material intraluminal intestinal mediante la formación de vesículas endocíticas en la membrana plasmática y la subsecuente exocitosis a nivel de lámina propia basal. Esto requiere que el material delimitado por membrana no sea degradado por el sistema lisosomal de las células epiteliales, el

cual normalmente tiene una importante actividad degradativa. Los resultados del presente trabajo apoyan esta segunda hipótesis ya que no se observó producto de reacción en los espacios intercelulares del epitelio intestinal, aunque la ausencia de marca en ésta zona probablemente se deba al escaso límite de resolución del microscópio de luz.^{19.30.39}

En el presente trabajo no se identificaron detalles estructurales particulares relacionados con la organización de las células caliciformes y enterocromafines en las preparaciones estudiadas de los diferentes grupos. Se pudieron identificar las principales estirpes celulares del epitelio superficial, las cuales mostraron una apariencia normal.

Los hallazgos principales que se encontraron por la ausencia transitoria o completa de calostro en los lechones de 4 días de edad podrían explicarse por una modificación del mecanismo de endocitosis y exocitosis de macromoléculas que provocaron la acumulación de material intracelular, sin que sea posible inferir las consecuencias funcionales de esto, sin embargo puede afirmarse sin lugar a dudas que el calostro ejerce una función determinante en el estímulo o inhibición del transporte inespecífico a través del epitelio intestinal.

CONCLUSIONES

- 1.- En el grupo de lechones de 12 a 24 h de edad mantenidos en condiciones normales de crianza las tres regiones del intestino delgado internalizaron grandes cantidades de peroxidasa.
- 2.- El establecimiento del cierre intestinal se inició en duodeno de animales de 4 días de edad alimentados normalmente y a los 6 días el yeyuno e íleon solo mostraron escasas células absortivas con producto de reacción.
- 3.- En los lechones de 4 días de edad deprivados de calostro todo el experimento se encontró marcador en las tres regiones del intestino.
- 4.- El grupo de lechones que ingirieron calostro tardíamente mostró una mayor capacidad de absorción de peroxidasa en todo el intestino delgado particularmente yeyuno e íleon, en comparación con los otros animales de la misma edad.
- 5.- En los lechones de 6 días alimentados normalmente se redujo notablemente la capacidad absortiva en las tres regiones del intestino delgado.
- 6.- El principal hallazgo fué en lechones de 4 días de edad sacrificados sin haber recibido calostro y en los que recibieron tardíamente éste, consistió en la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas de diferente tamaño.

7.- A través del estudio el marcador se encontró generalmente en la parte media-apical de las vellosidades.

8.- La peroxidasa extracelular se encontró adherida al glucocalix y la que fué endocitada generalmente se localizó en el interior de vesículas.

9.- La ausencia de calostro en el lumen intestinal prolongó la capacidad inespecífica de internalización de macromoléculas.

10.- El suministro retardado del calostro indujo un efecto estimulante en la absorción epitelial de macromoléculas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Blood C. D., Henderson A. J. Medicina Veterinaria. Ed. Interamericana. 4a ed. México. 1974 p. 40-42.
- 2.- Ojofeitimi E. O., Elegbe I. A. (1982). The effect of early initiation of colostrum feeding on proliferation of intestinal bacteria in neonates. Clin. Pediat., 21; 39.
- 3.- Teichberg S., Mc Garvey E., Bayne M. A., Lifshitz F. (1983). Altered jejunal macromolecular barrier induced by alfa-dihydroxi deconjugated bile salts. Am. J. Physiol., 245; 122.
- 4.- Gurther H., Ketz H. A., Kolb D., Schoroder L., Seidel H. Fisiologia Veterinaria. Ed. Acribia. 2a ed. Zaragoza, España. 1976 p. 339-818.
- 5.- Sèzky A., Rátz F., Tuboly S., Nagy Gy. (1979). Absorption of colostrum immunoglobulins in suckling piglets. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 26; 99.
- 6.- Burton K. A., Smith M. W. (1977). Endocytosis and immunoglobulin transport across the small intestine of the new-born pig. J. Physiol., 270; 473.
- 7.- Henriques de Jesús C., Smith M. W. (1974). Sodium transport by the small intestine of new-born and suckling pigs. J. Physiol., 243; 211.
- 8.- Murata H., Yaguchi H., Namioka S. (1979). Relationship between the intestinal permeability to macromolecules and invasion of septicemia-inducing Escherichia coli in neonatal piglets. Infec. Immun., 26; 339.

- 9.- Axelsson I., Jakobsson I., Lindberg T., Polberger S., Benediktsson B., Raiha N. (1989). Macromolecular absorption in preterm and term infants. *Acta Paediatr. Scand.*, 78; 532.
- 10.- Payne L. C., Marsh C. L. (1962) Gamma-globulin absorption in the baby pig: The nonselective absorption of heterologous globulins and factors influencing absorption time. *J. Nutrition.*, 76; 151.
- 11.- Undall J. N., Colony P., Fritze K., Pang J. S., Trier J. S., Walker W. A. (1981) Development of gastrointestinal mucosal barrier. II. The effect of natural versus artificial feeding on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr. Res.*, 15; 245.
- 12.- Tagesson C., Andersson P. A., Andersson T., Bolin T., Kallberg M., Sjodahl R. (1983) Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract. Measurement of intestinal permeability to polyethyleneglicols in the 634-1338 daltons range (PEG 1000). *Scand. J. Gastroenterol.*, 18;481.
- 13.- Michanek P. (1989) Intestinal transmission of macromolecules in newborn dairy calves of different ages at first feeding. *Res. Vet. Sci.*, 46; 375.
- 14.- Murata H., Namioka S. (1977). The duration of colostral immunoglobulin uptake by the epithelium or the small intestine or neonatal piglets. *J. Comp. Path.*, 87; 431.
- 15.- Learly H. L., Lecce J. G. (1979). The preferential transport of immunoglobulin G by the small intestine of the neonatal piglet. *J. Nutr.*, 109; 458.
- 16.- Bloom W., Fawcett W. D. *Histology*. Ed. W. B. Saunder Company. 11th ed. Philadelphia, U. S. A. (1986) p. 641-660.

- 17.- Staley T. E. (1977). Absorption of horseradish peroxidase by neonatal pig intestinal epithelium. Effect of *Escherichia coli* (055B5) con absorption. *Am. J. Vet. Res.*, 38; 1037.
- 18.- Figueredo M. A. Algunos aspectos histológicos del TGI del cerdo y su relación con los procesos digestivos. Centro de Investigaciones Porcinas. La Habana. E. I. D. A. (1979) p. 5.
- 19.- Argenzio R. A. Digestion, absorption and metabolism. *Dukes Physiology of Domestic Animal*. Vail-Balow Press. 10th ed. U.S.A. 1984 p. 262.
- 20.- Scholfield G. L. Anatomy of muscular and neural tissues in the alimentary canal. *Handbook of Physiology Society*. Washington, D. C. 4 Sect 6; (1969) p. 1579.
- 21.- Banong W. F. Review of medical physiology. Lange Medical Publication. 12th ed. Los Altos California. 1985 p. 384.
- 22.- Weiss L. Grepp O. R. The digestive tract histology. McGraw Hill Book Company. 4th ed. 1977 p. 643.
- 23.- Creame B. (1974) Intestinal structure in relation to absorption. *Biomembranes*, 4A; 1.
- 24.- Sassier P., Bergeron M. (1978) Cellular changes in the small intestine epithelium in the course of cell proliferation and maturation. *Subcell. Biochem.*, 5; 129.
- 25.- Eastwood G. L. (1977) Gastrointestinal epithelium renewal. *Gastroenterology*, 72; 962.
- 26.- Beck W. S. Fisiología molecular, celular y sistematica. Publicaciones Cultural. 1th ed. México. 1977 p. 570-571.
- 27.- Carlsson L. C. T., Westrom B. K., Karlsson B.R. (1980) Intestinal absorption of proteins by the neonatal piglets fed on

- sow's colostrum with either natural or experimentally eliminated trypsin inhibiting activity. *Biol. Neonate*, 38; 309.
- 28.- West S. E., Tood R. W., Mason S. H., Bruggen B. T. J. *Textbook of biochemistry*. The McMillan Company. 4th ed. New York. 1966. p. 939-940.
- 29.- Streefkerk J. G., Van-Der Ploeg M. (1973) Quantitative aspects of cytochemical peroxidase procedures investigated in a model system. *J. Histochem. Cytochem.*, 21; 715.
- 30.- Worthintogn B. S., Syrotuck J. (1976) Intestinal permeability to large particles in normal and protein-deficient adult rats. *J. Nutr.*, 106; 20.
- 31.- Orlic D., Gray B. A., Carmichael R. D., Baron P. (1981) Lymphocyte infiltration of gut epithelium in fetal and neonatal rabbits. *Biol. Neonate*, 40; 91.
- 32.- Westrom B., Svendsen J., Tagesson C. (1984) Intestinal permeability to polyethyleneglicol 600 in relation to macromolecular 'closure' in the neonatal pig. *Gut*, 25; 520.
- 33.- Karnovsky M. J. (1964) The localization of cholinesterase activity in rat cardiac muscle by electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 23; 217.
- 34.- Keljo D. J., Hamilton J. R. (1983) Quantitative determination of macromolecular transport rate across intestinal Payer's Patches. *Am. J. Physiol.*, 244; G637.
- 35.- Vellenga L., Wensing Th., Breukink H. J. (1988) Effect of feeding 5 per cent glucose solution or milk replacer to newborn piglets on intestinal permeability to macromolecules. *Vet. Record.*, 123;395.

- 36.- Lecce J. G. (1973) Effect of dietary regimen on cessation of uptake of macromolecules by piglet intestinal epithelium (closure) and transport to the blood. J. Nutr., 103; 751.
- 37.- Staley, T. E., Corley L. D., Jones F. W. (1971) Permeabilidad del epitelio intestinal de los cachorros recién nacidos a Escherichia coli. Ciencias Veterinarias, XVI; 107.
- 38.- Clarke R. M., Hardy R. N. (1971) Histological changes in the small intestine of the young pig and their relation to macromolecular uptake. J. Anat., 108; 63.
- 39.- Luciano L., Reale E., Rechkemmer G., Engelhardt W. (1984) Structure of zonules occludentes and the permeability of the epithelium to short-chain fatty acids in the proximal and the distal colon of guinea pig. J. Membrane Biol., 82; 145.