

La respuesta inflamatoria del intestino por la acción traumática de la penetración de *Ancylostoma caninum*. Estudio de microscopía de luz y electrónica

Pablo Hernández Jáuregui*
Fernando Rivas Solís**

Resumen

Con el propósito de evaluar los cambios inflamatorios locales tempranos de la mucosa y submucosa intestinal ante los mecanismos de agresión durante la penetración y fijación de *Ancylostoma caninum*, se desarrolló el modelo de marcaje de la permeabilidad vascular, mediante la inyección de tinta china diluida al 50% en rama arterial mesentérica que irriga determinadas zonas del intestino delgado, donde después de 60 minutos, experimentalmente se colocaron los nematodos. Se demostró que la salida del marcador se presentó principalmente en los vasos de pequeño y mediano calibre de la submucosa, en un radio de 5 mm a la fijación de la boca del parásito. Las modificaciones vasculares agudas tempranas consistieron en la dilatación y congestión de los vasos sanguíneos, con salida de plasma de la luz vascular al espacio extravascular, seguido por la diapedesis de eritrocitos y leucocitos polimorfonucleares. Las proteínas plasmáticas, junto con el marcador de partículas de carbón, alcanzan el espacio extravascular, a través de la apertura de espacios en las uniones endoteliales. Las fenestras del endotelio vascular no participan en este mecanismo. En las parasitosis en donde se desconoce el tiempo de fijación del parásito al intestino, también se encontraron alteraciones inflamatorias vasculares de menor intensidad y con la participación de células inflamatorias de tipo crónico. Las hipoproteinemias y anemias consecuentes a la parasitosis por anquilostomas, pueden explicarse por el continuo derrame de proteínas al espacio extravascular y al lumen intestinal o por la ingestión de las mismas por los nematodos.

Introducción

Una de las parasitosis intestinales frecuentes del perro la constituye la anquilostomiasis. Este nematodo es

responsable de cambios inflamatorios en la mucosa y submucosa del intestino, que conducen a estados de anemia, hipoproteinemia y con frecuencia a la muerte, en particular cuando la parasitosis afecta a los cachorros.¹ Evidentemente, el número de parásitos adultos presentes en la luz intestinal estará directamente relacionado con las posibilidades de lesión en la mucosa, ya que los parásitos cambian a menudo de sitio de ubicación. Las lesiones inflamatorias locales ante un número variable de penetraciones comprometen al huésped en su respuesta, generándose sangrado y disfunción de la mucosa en su fisiología.² El presente trabajo tuvo como propósito evaluar los cambios inflamatorios locales tempranos de la mucosa y submucosa intestinal ante la agresión de los mecanismos de penetración de anquilostomas, asimismo, se evaluaron los cambios inflamatorios generados por la ubicación natural de los parásitos.

Material y métodos

Se utilizaron 15 perros de raza indefinida de 20-22 kg de peso, libres de infección por *Ancylostoma caninum*. Todos los animales fueron mantenidos en jaulas individuales durante todo el experimento. Durante el acondicionamiento, se realizaron estudios de coprología seriada y de biometrías hemáticas, además de los procedimientos rutinarios como vacunaciones, desparasitación externa e interna en su caso. Se organizaron dos grupos de experimentación; diez perros recibieron parásitos y cinco perros no los recibieron. Los parásitos adultos se obtuvieron de cinco perros infectados en forma natural, detectados mediante el examen microscópico de las heces.

Marcaje de permeabilidad vascular

Para conocer los posibles cambios en la permeabilidad vascular, se ensayó con un grupo independiente de perros en las mismas condiciones de experimentación, la presencia de partículas de tinta china en las luces vasculares de los vasos de pequeño y mediano calibre. Para tal propósito, se realizaron laparotomías y se expuso una asa intestinal del ileon terminal, 30 cm arriba de la válvula ileocecal. Se inyectaron 10 ml de

Recibido para su publicación el 16 de noviembre de 1992

* Centro de Investigación Biomédica de Oriente, C.M.N. "Manuel Avila Camacho", IMSS, 2 Norte 2004, 72000, Puebla, Pue.

** Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Sierra Mojada 800, Sector Libertad, Col. Independencia 44290, Guadalajara, Jalisco.

tinta china diluida al 50% en solución salina, por la rama arterial mesentérica que irrigaba el asa intestinal seleccionada. Durante la perfusión de la tinta china, misma que visiblemente coloreó en negro el área de irrigación de la arteria perfundida, se abrió el intestino, y con ayuda de una navaja de rasurar se obtuvieron fragmentos de mucosa y submucosa. Los tejidos se fraccionaron y se colocaron en glutaraldehído al 3% para estudios al microscopio de luz y electrónico.

Procedimientos para el estudio al microscopio electrónico

Los tejidos fraccionados y fijados en glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos se posfijaron en tetróxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador. Se deshidrataron en alcoholes ascendentes y se incluyeron en resina araldita. Mediante el corte de secciones de 1 micra de espesor obtenidas en ultramicrotomía y teñidas con azul de toluidina, se estudiaron al microscopio de luz las áreas donde aparecieron partículas de carbón en las luces vasculares. Los tejidos observados al microscopio de luz, se recortaron nuevamente en secciones de 40-60 nanómetros y se contrastaron con uranilo y plomo para evaluarlas al microscopio electrónico.

Infección experimental con nematodos adultos

Los cinco perros portadores de *Ancylostoma caninum* fueron llevados al quirófano, simultáneamente con los grupos experimentales receptores del parásito. Se realizó la laparotomía y se expuso el área de asa intestinal del ileum terminal, protegiéndola con una compresa húmeda. Al perro donador de parásitos, se le fue exponiendo en partes el intestino delgado partiendo de la válvula ileocecal, abriendo el intestino longitudinalmente hasta encontrar los nematodos. Una vez localizados, se obtuvieron mediante el corte de la mucosa en donde estaban incluidos; fueron colocados en una caja de Petri con solución salina a temperatura ambiente. En estas condiciones los nematodos iniciaron movimientos enérgicos para desprenderse de los tejidos, quedando libres en la solución salina. Una vez obtenidos entre 5 a 7 nematodos adultos, se procedió a depositarlos mediante una pequeña apertura del asa intestinal del receptor. Pasados 60 minutos, se abrió el asa intestinal y al ubicar el parásito anclado en la mucosa, se inyectó la solución de tinta china vía la rama arterial de la mesentérica como se describió antes, se obtuvo la mucosa y submucosa donde estaba anclado el parásito. Se siguieron los mismos procedimientos de fijación e inclusión para estudiar esos segmentos intestinales con microscopía de luz y electrónica.

De los perros donadores de parásitos, se tomaron muestras de la mucosa y submucosa que incluían los nematodos anclados, con las mismas condiciones de fijación y perfusión con la tinta china.

Resultados

Marcaje de la permeabilidad vascular

Los mejores resultados en cuanto a la visualización de las partículas de carbón de la tinta china en las luces de capilares y vénulas fue a los 20 segundos de obtención de la muestra de mucosa y submucosa, prácticamente durante la perfusión de los vasos arteriales mesentéricos. Las partículas de tinta china se observaron con mayor facilidad en capilares de mediano calibre de la submucosa así como en vénulas. La ubicación de las partículas fue la misma que la del plasma sanguíneo, dejando el lugar central a las células y plaquetas, como corresponde a un vaso sanguíneo sin fenómeno inflamatorio (Figura 1).

Microscopía electrónica de barrido, de luz y de transmisión de la mucosa experimentalmente infectada con *Ancylostoma caninum*

Ancylostoma caninum penetra la mucosa desplazando las vellosidades intestinales y ubicando la porción cefálica

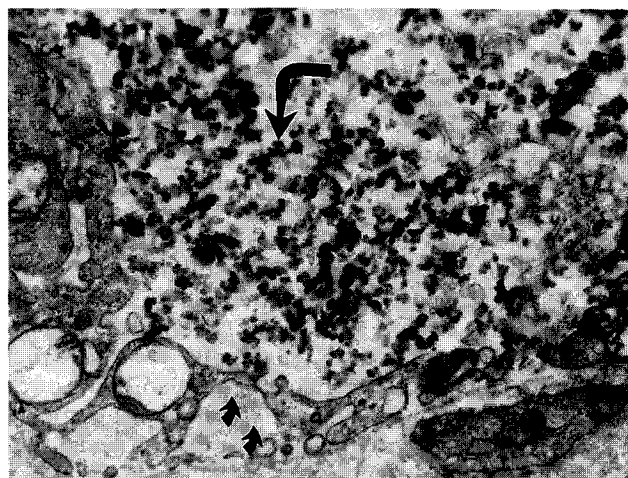


Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión de un capilar y del estroma pericapilar de la submucosa de un perro testigo sin cambios inflamatorios. El marcador de partículas de carbón (flecha) ocupa el lumen vascular. El endotelio vascular fenestrado es normal notándose la membrana basal y colágena asociada (doble flecha). x 60.000

en la muscular *mucosae* o en la submucosa. La reacción inflamatoria local secreta moco alrededor del parásito y hay evidencia de salida de eritrocitos (Figura 2). Las vellosidades intestinales cercanas a la ubicación del parásito son más cortas y revelan cambios inflamatorios y edema interepitelial. Las modificaciones descritas no se observan a una distancia de 4-5 vellosidades alejadas de la ubicación del parásito. Los capilares sanguíneos de la lámina propia de las vellosidades intestinales afectadas se encontraron congestionados principalmente por eritrocitos. En la submucosa las vénulas

denotan también cambios congestivos. Las partículas de carbón perfundidas en las arterias que irrigan las áreas donde se incrustó el parásito, se encontraron tanto en las luces vasculares como fuera de los vasos, infiltrados entre las células inflamatorias o del estroma. En el sitio de anclaje del parásito se demuestra que el tejido próximo a la boca del nematodo se encuentra desplazado en dirección al mismo; esto implica el

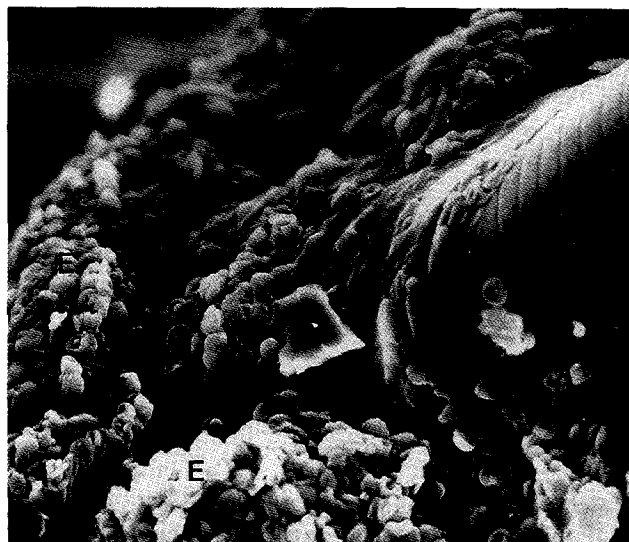


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido que ilustra a la uncinaria (U) en su porción exterior en el lumen intestinal de un perro del grupo experimentalmente infectado. Nótese los eritrocitos (E) alrededor del sitio de penetración del parásito. x 781.000

fenómeno de succión por parte del parásito. También se demuestran proteínas y eritrocitos, así como partículas de carbón, tanto en periferia de las fauces como en el aparato digestivo del nematodo. Participan junto a este material células del estroma y células inflamatorias agudas, principalmente polimorfonucleares eosinófilos (Figura 3).

Microscopía electrónica de transmisión de los capilares de la mucosa y submucosa infectadas experimentalmente con *Ancylostoma caninum*

Este estudio se enfocó principalmente a los capilares sanguíneos de la lámina propia de las vellosidades y a los de la submucosa, donde también se analizaron las vénulas. El área en estudio comprendió entre 3 a 5 mm alrededor del punto de fijación del parásito.

Los capilares sanguíneos de la lámina propia se encontraron congestionados por eritrocitos y con escaso número de partículas de tinta china. No se encontraron alteraciones del endotelio vascular ni evidencia de cambios inflamatorios. Los capilares sanguíneos de la submucosa mostraron modificaciones en el diámetro de las luces vasculares y en el endotelio de revestimiento. Por la dilatación, el endotelio vascular se encontró muy



Figura 3. Micrografía de luz de un corte histológico de 1 µ de espesor que muestra en sección longitudinal parte del nematodo anclado sobre la submucosa. La boca del parásito (E) se ubica en la submucosa en donde los vasos sanguíneos se encuentran congestionados (flechas). Paragón, x 400

adelgazado. Las uniones epiteliales entre las células endoteliales se encontraron en ocasiones desplazados (Figura 4).

Las luces vasculares, pletóricas de células tanto de hematíes como de polimorfonucleares, permiten ver partículas de carbón en el plasma. Las partículas y evidentemente el plasma escapan de las luces vasculares, encontrándose marcaje de esta salida cerca de las uniones endoteliales y en el espacio extravascular inmediato. No se encontraron evidencias de salida de partículas por las fenestras del endotelio.

En las vénulas, la concentración de partículas de carbón fue mayor, con evidencia de escape de partículas al espacio intravascular. Las partículas de carbón se observaron cerca de las uniones endoteliales, en el espacio abierto de las uniones y en el espacio extravascular (Figura 5).

Microscopía electrónica de transmisión de los capilares sanguíneos cercanos a la boca del parásito incrustado en forma natural

Cerca de la boca del parásito, se encontró abundante exudado inflamatorio agudo, caracterizado sobre todo por polimorfonucleares eosinófilos. Participan tam-

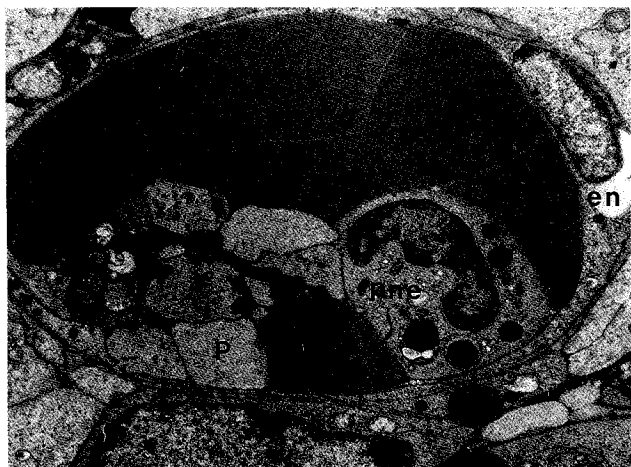


Figura 4. Micrografía electrónica de transmisión de un capilar de la submucosa de un perro del grupo experimentalmente infectado, una hora después de ubicado el parásito en la submucosa. Nótese la dilatación del capilar con la ocupación de eritrocitos (E), plaquetas (P) y un polimorfonuclear eosinófilo (pne), el núcleo de la célula endotelial y el citoplasma adelgazado (en). x 60.000



Figura 5. Micrografía electrónica de transmisión de una vénula de la submucosa de un perro del grupo experimentalmente infectado, una hora después de ubicado el parásito en la submucosa. El marcador de partículas de carbón escapó del lumen vascular (LV) al espacio extravascular (flechas). x 60.000

bién células mononucleares del tipo macrófagos y células plasmáticas. Los depósitos de fibrina fueron hallazgos frecuentes, así como fibras de pre y colágena (Figura 6). Los polimorfonucleares eosinófilos muestran gránulos citoplásmicos característicos para esta espe-

cie. Son redondeados u ovalados con una zona densa y otra finamente granular. No hubo evidencias de degranulación. La celularidad en células plasmáticas predomina en el exudado inflamatorio crónico de esta

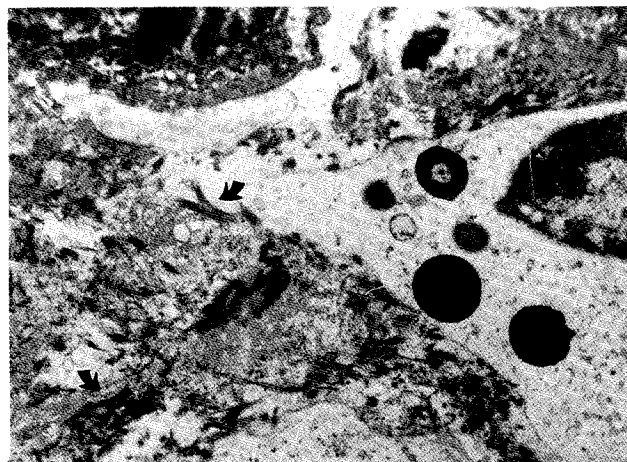


Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión del exudado inflamatorio crónico, ubicado cerca de la boca del parásito. Parasitosis natural. Nótese la fibrina depositada entre el exudado inflamatorio (flechas) x 60.000

reacción. Las células plasmáticas de forma ovoide muestran núcleos con heterocromatina regularmente distribuida, y en el citoplasma las típicas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (Figura 7).

Discusión

Ancylostoma caninum, como nematodo alojado en la luz intestinal, es capaz de inducir diferentes modificaciones en la mucosa y submucosa. Una vez penetradas las vellosidades intestinales, el estoma queda alojado en la submucosa. La reacción inflamatoria local está mediada por modificaciones en el tono y diámetro del sistema vascular, lo que permite la salida de proteínas al espacio extravascular. Las proteínas plasmáticas salen por las aperturas de las unidades endoteliales y comparten junto con las células del exudado inflamatorio el espacio extravascular. El endotelio vascular del intestino es de tipo fenestrado. Estos pequeños diafragmas no parecen estar involucrados en la salida de las proteínas. La evidencia morfológica en este experimento en cuanto a su integridad confirma esta posibilidad. Las partículas de carbón de la tinta china circulando por los vasos sanguíneos alterados por el fenómeno inflamatorio, escapan a través de los espacios que se abren entre la unión epitelial de las células endoteliales, quedando en el espacio extravascular y alcanzando el perímetro de ubicación de la boca de los anquilostomas. El marcador de partículas de carbón fue visualizado en el interior del aparato digestivo de los nematodos. Los focos de microinflamación originados por la presencia de *Ancylostoma caninum* demuestran que tanto la salida de proteínas como de eritrocitos, contribuyen a la



Figura 7. Micrografía electrónica de transmisión del exudado inflamatorio crónico, ubicado cerca de la boca del parásito. Parasitosis natural. Un polimorfonuclear eosinófilo (PNE) exhibe granulos de secreción en diferentes grados de evolución (flechas) cerca del aparato de Golgi. Rodeando al PNE, se encuentran células plasmáticas morfológicamente activas por su desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (rer). x 95.000

pérdida de hemoglobina y albúmina en forma inmediata y probablemente continúa mientras el parásito se ubique en esa determinada zona. La relación del número de parásitos alojados en el intestino de diferentes mamíferos, incluyendo al hombre, pueden explicar los cuadros de anemia e hipoproteinemia de los individuos parasitados.³ La respuesta local inflamatoria vascular ante la presencia de los parásitos, es semejante a la inducida por productos químicos depositados sobre la mucosa intestinal, como la mostaza nitrogenada. Ese fenómeno inflamatorio induce cambios de permeabilidad y salida de proteínas por los espacios endoteliales marcados con partículas de carbón.² El paso de proteínas a través de las fenestras endoteliales, podría contribuir a la pérdida de proteínas, ya que con marcadores más finos como la peroxidasa se ha demostrado su libre permeabilidad; sin embargo, esto parece ser un fenómeno de tipo fisiológico y regulado, como ocurre en el endotelio de los capilares glomerulares renales. En ese sistema las proteínas que componen la membrana basal constituyen la barrera de permeabilidad.

La acción traumática de la penetración genera cambios inflamatorios perimetrales. La sobreproducción de moco evidencia alteraciones inflamatorias secretoras locales, sin olvidar que también hay sangrado. Las vellosidades cercanas y contiguas al parásito se modifican en tamaño y seguramente en su fisiología, por lo que, independientemente de la pérdida de hemoglobina y otras proteínas, los procesos de absorción necesariamente deben estar alterados. Los hábitos alimenticios de los anquilostomas en cuanto a su cambio constante de ubicación en el intestino, ha recibido la explicación del posible rechazo inmune-inflamatorio. En los estudios de la mucosa y submucosa intestinal de las parasitosis naturales, se demuestra la participación activa de polimorfonucleares eosinófilos, células cebadas e infiltrado linfoplasmocitario.

Se ha comunicado que la participación de los eosinófilos en el exudado inflamatorio contribuye a disminuir la hiperdilatación vascular; de esta forma se modera el fenómeno vascular inflamatorio agudo.¹ Asimismo, la liberación de enzimas proteolíticas al medio inflamatorio contribuye a que el parásito se retire de su ubicación. Parece ser que los mecanismos de regulación y defensa de la inflamación logran controlar el foco inflamatorio local, haciendo que el parásito se desprenda. Sin embargo, la agresión del nematodo se realizará de nuevo a pocos centímetros, reanudando el ciclo de cambios inflamatorios y perdiendo la pérdida de proteínas.

Abstract

With the aim to evaluate the early inflammatory changes of the intestinal mucosa and submucosa after the attachment of *Ancylostoma caninum* in the small bowel, a model of a vascular marker was used by means of the injection of India ink at 50% in saline solution in the mesenteric artery. This artery irrigates a territory of the intestine where the adult nematodes were previously placed 60 minutes before. A group of naturally infected dogs and other dogs without parasites were also studied using the same methodology. India ink particles were predominantly found in the small blood vessels of the submucosa with a range of 5 mm next to the parasite attachment. The vascular response was evident with dilatation and congestion of the blood vessels, diapedesis of erythrocytes and polymorphonuclear leucocytes. Plasmatic proteins and carbon particles leaked from the vascular lumen by gaps in the endothelial cells. The fenestra appeared normal and it did not apparently participate in the active leakage. Natural attachment of the parasites was also characterized by acute vascular changes and a chronic inflammatory cell response. Hypoproteinemia and anemic processes, after ancylostomiasis parasitism, may be explained in terms of the continuously fluid of the protein extravasation and protein ingestion by the parasites.

Literatura citada

1. Hubscher, T.: Role of the eosinophil in the allergic reactions. II. Release of prostaglandins from human eosinophilic leukocytes. *J. Immunol.*, 114: 1389-1392 (1975).
2. Hurley, J.V.: Response of the fenestrated vessels of the small intestine of rats after application of mustard oil. In: Acute inflammation. Edited by: Hurley, J.V., 52-55. *Churchill Livingston*, Edinburgh, Scotland, 1972.
3. Martinez-Torres, C., Ojeda, A., Roche, M. and Layrisse, M.: Hookworm infection and intestinal blood loss. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61: 373-383 (1967).
4. Migazena, S., Gilles, H.M. and Maegraith, B.G.: Studies in *Ancylostoma caninum* infection in dogs. II Anatomical changes in the gastrointestinal tract. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 66: 203-207 (1972).