

## Cambios *post mortem* en mucosa intestinal y tejido pulmonar de *Mus musculus*, observados al microscopio electrónico de barrido

por

Francisco Hernández\* y Yoshimichi Kozuka\*\*

(Recibido para su publicación el 25 de mayo de 1981)

**Abstract:** *Post mortem* ultrastructural alterations of surface epithelial tissues were studied by scanning electron microscopy. Ten male albino mice were sacrificed, and the duodenum, ileum and lung excised and fixed immediately, at 20, 40, 60 and 120 minutes *post mortem*. The intestinal villi and microvilli tended to flatten and to lose rigidity of cellular architecture. Alveolar epithelial cells showed the beginning of edema. Ultrastructural changes in epithelial cells were noticed as early as 20 minutes after death.

La licuefacción de los tejidos muertos en ausencia de putrefacción, fue observada desde mediados del siglo pasado y su etiología se atribuyó a procesos enzimáticos. En 1900, Jacoby acuñó el término de "autólisis", para describir el fenómeno (Abraham, 1970), que luego fue observado en órganos tanto de mamíferos como de vertebrados inferiores (Bradley, 1938).

También se observó que los cambios necrolíticos se iniciaban inmediatamente después de la muerte, y que su magnitud era proporcional al tiempo transcurrido después de la defunción (Nicolas *et al.*, 1969; Trump *et al.*, 1962, 1963). Por otro lado, se encontró que órganos como el páncreas, que tienen gran cantidad de enzimas digestivas, mostraban cambios más tempranos y de mayor magnitud que otros tejidos pobres en ese tipo de enzimas (Abraham, 1970); y aún dentro de la misma célula, la susceptibilidad a la autólisis varía entre las distintas organelas (Heinz & Sabine, 1965; David *et al.*, 1971; Nicolas *et al.*, 1969; Nicolas & Bouhour, 1971).

Aparte de tales procesos líticos, se encontraron cambios por deshidratación, como la disminución de la turgencia celular (Nicolas & Bouhour, 1971).

La presencia usual de alteraciones *post mortem*, tanto autolíticas como las debidas a pérdida de líquidos, han hecho necesaria la investigación a nivel ultraestructural para diferenciar esos cambios en los tejidos, de aquéllos producidos por procesos patológicos (Nicolas *et al.*, 1969; Scribeau *et al.*, 1971).

En este informe se evalúan las alteraciones *post mortem* a nivel de superficie de mucosa intestinal y de tejido pulmonar de *Mus musculus* de laboratorio,

---

\* Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica.

\*\* Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica.

empleando microscopía electrónica de barrido. El objetivo fue determinar el período máximo permisible que puede transcurrir entre la muerte del animal y la fijación del tejido cuando se realizan análisis histográficos ultraestructurales.

### MATERIAL Y METODOS

**Animales:** Se sacrificaron por descerebración, quince ratones albinos machos de 20 a 25 gramos de peso. Los cadáveres se dejaron a temperatura ambiente; tres animales se disecaron inmediatamente después de sacrificados (tiempo considerado cero, sin daño *post mortem*). El resto de los cadáveres se disecaron en tripletas a los 20, 40, 60 y 120 minutos después de la muerte.

**Tejidos:** De cada animal se tomaron piezas del duodeno proximal, íleon distal, colon transversal y lóbulo inferior del pulmón derecho. Cada tejido fue cortado en cubos de aproximadamente 5 milímetros de lado y se sumergieron por dos horas a 4 C, en una solución de aldehído glutárico al 2,5% en amortiguador de S-colidina (2,4,6-trimetil piridina), ajustando el pH a 7.2 con HCl 1.0 N. Posteriormente, las piezas se sometieron a un segundo período de fijación en tetraóxido de osmio al 2%, en el mismo amortiguador. Los tejidos pulmonares fueron cortados según la técnica de fractura en frío (Bullivant, 1970), y luego manipulados con el resto de las muestras que fueron deshidratadas en una serie de alcohol etílico de 30 a 100%, para finalmente pasarlos a una solución a partes iguales de alcohol etílico y acetato de amilo. Luego, se sumergieron en acetato de amilo durante dos horas, al cabo de las cuales se sometieron a un secador de punto crítico de CO<sub>2</sub> (Hitachi HCP-1) y se recubrieron de oro en un evaporador de metales (Eiko IB-3). Posteriormente se examinaron al microscopio electrónico de barrido (Hitachi HHS-2R) bajo un voltaje de aceleración de 20Kv.

### RESULTADOS

**Intestino delgado:** En las muestras fijadas en "tiempo cero" se observó, a baja magnificación, la morfología típica de las vellosidades del duodeno e íleon, que en general, son digitiformes y se mantienen erectas (Figs. 1, 5). A mayor magnificación, se observó la superficie de estas vellosidades, compuesta por una especie de mosaico de piezas convexas, que corresponden a los ápices de las células del epitelio cilíndrico; la aspereza que se observa en esa superficie corresponde a las microvellosidades (Fig. 6).

A los 20 minutos *post mortem*, no se observaron cambios significativos en los tejidos con respecto al tiempo cero. Sin embargo, las muestras de duodeno e íleon fijadas a los 40 y 60 minutos presentaron una serie de alteraciones consistentes en una disminución en la altura de las microvellosidades, dándole un aspecto liso a la superficie (Figs. 2,3). En el íleon los cambios fueron semejantes (Fig. 7).

A los 120 minutos, las vellosidades tanto del duodeno como del íleon se presentaron flácidas y delgadas, con apariencia laminar. Además, la superficie epitelial se tornó muy lisa, siendo imposible delimitar las células columnares, tanto del duodeno (Fig. 4) como del íleon (Fig. 8).

**Colon:** En el tejido testigo de colon (tiempo cero) observado a baja magnificación, se apreció una superficie más o menos lisa, en la cual las aperturas de las criptas de Lieberkühn aparecieron como pequeños agujeros, con los bordes contraídos (Fig. 9). A medida que progresó el tiempo *post mortem*, esos agujeros se tornaron más amplios; a los 40 y 60 minutos son redondeados y sus bordes lisos (Figs. 10, 11), alteraciones que progresaron, pues a los 120 minutos *post mortem*, las aberturas de las criptas estaban aun más agrandadas y casi redondeadas (Fig. 12).

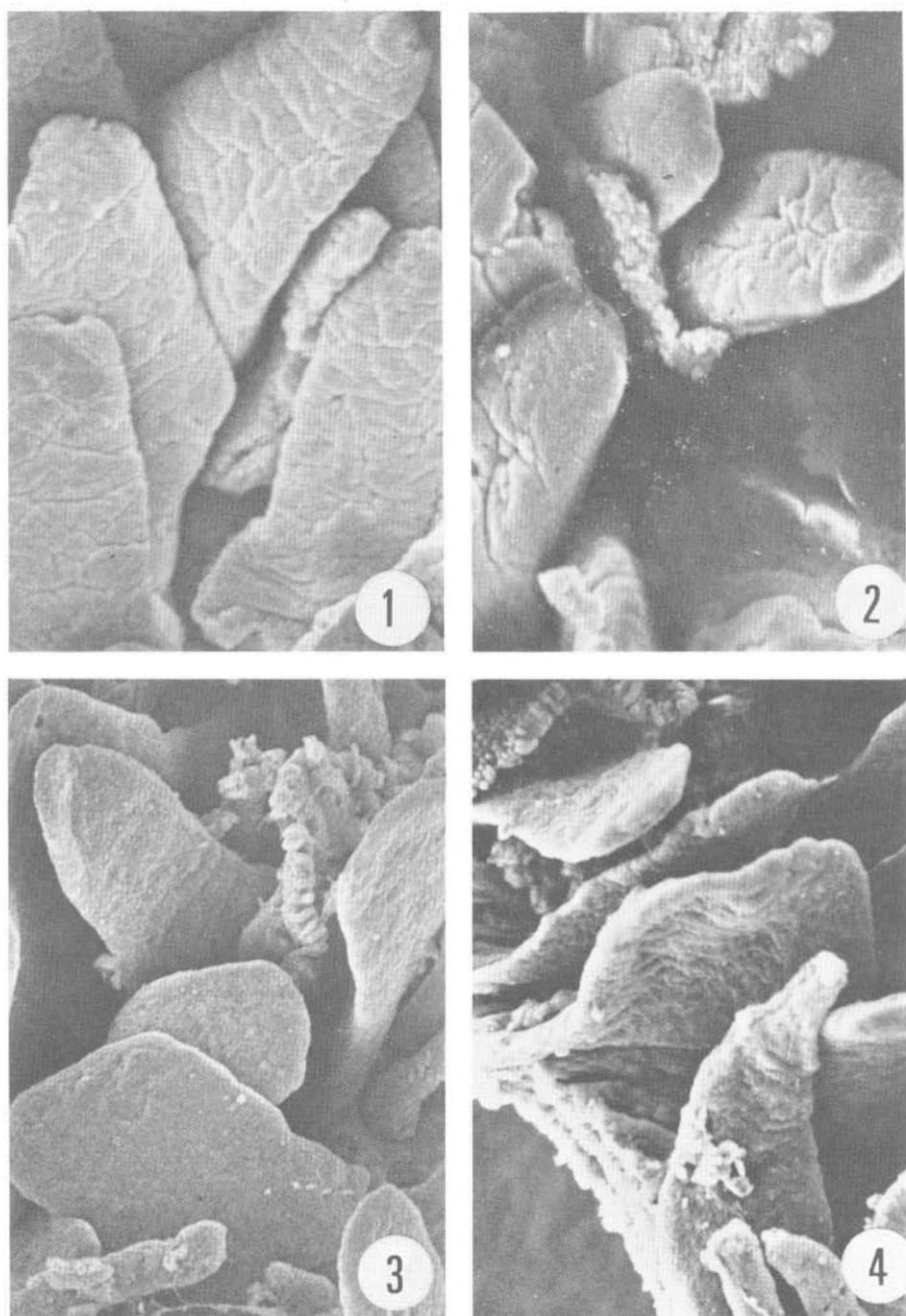


Fig. 1 a 4. Duodeno. En la Figura 1 se observa la estructura normal en especímenes, fijados inmediatamente después de sacrificado el animal. Las Figuras 2 a 4 representan tejidos duodenales fijados a los 40, 60 y 120 minutos *post mortem* respectivamente (ver detalle en el texto). Magnificación de 150x.

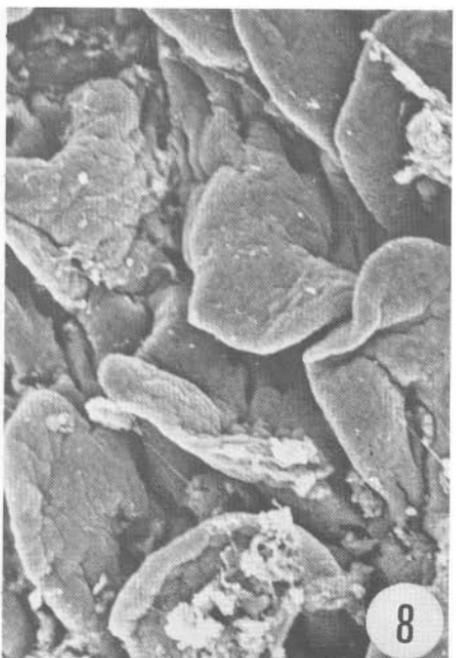
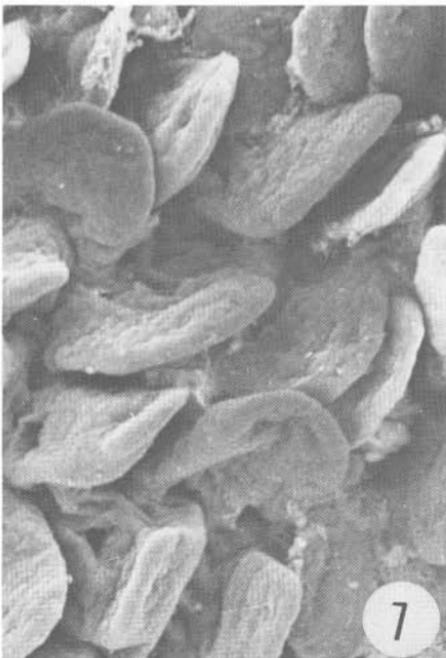
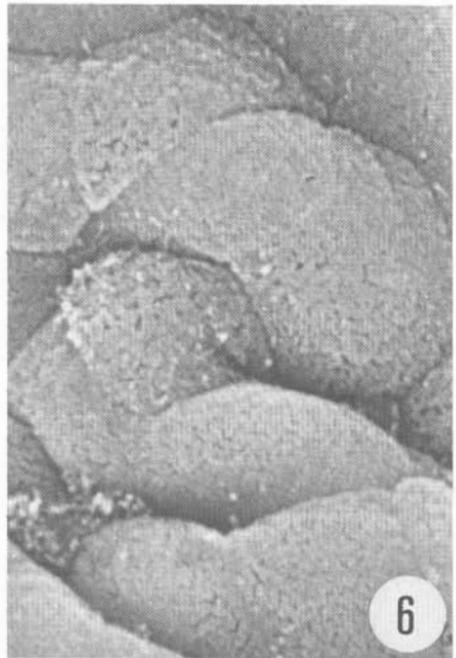
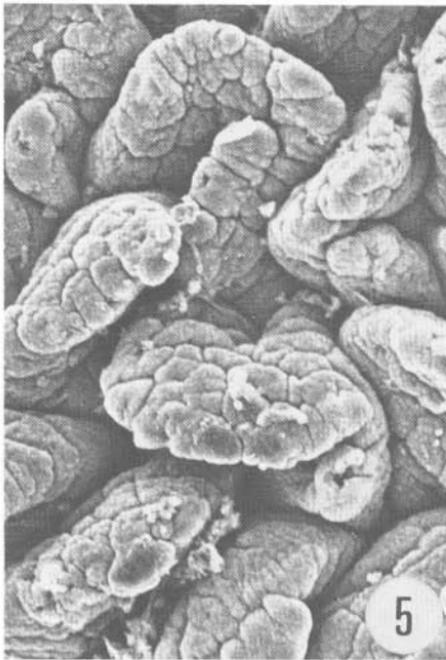


Fig. 5 a 8. Ileon. Las Figuras 5 y 6 corresponden a la mucosa fijada inmediatamente después de la muerte del animal. Las Figuras 7 y 8 corresponden a muestras fijadas a los 60 y 120 minutos *post mortem* respectivamente (ver detalles en el texto). Magnificación de 150x, exceptuando la Figura 6, cuya magnificación es de 4000x.

**Tejido pulmonar:** Los tejidos pulmonares fijados inmediatamente después de sacrificado el animal, mostraron la estructura esponjiforme, característica de ese órgano (Fig. 13). Esta apariencia de la superficie alveolar se modifica muy poco durante las dos horas siguientes a la muerte, como puede observarse en las Figuras 14, 15 y 16, que corresponden a especímenes fijados a los 40, 60 y 120 minutos *post mortem*, respectivamente.

## DISCUSION

A nivel celular, la muerte se puede definir como una interrupción de los procesos energético-dependientes, que lleva a una alteración del sistema homeostático y a la activación de mecanismos autolíticos, que se traducen en cambios ultraestructurales. En esa necrosis intervienen fundamentalmente las células del sistema retículo endotelial, por su gran contenido de enzimas líticas (Brandes, 1965). No obstante, la mayoría de las células tiene cierta cantidad de enzimas proteolíticas, que se activan o quedan libres de efectos inhibitorios con la muerte del organismo. Por otra parte, luego de la muerte se producen alteraciones en el flujo de agua y de electrolitos a nivel celular, produciéndose distensiones y contracciones en algunas estructuras ectoplasmáticas (David *et al.*, 1971).

En este trabajo, los cambios más evidentes observados en el tejido intestinal, aparentemente se debieron a deshidratación, que indujo pérdida de turgencia y rigidez, así como adelgazamiento de las vellosidades del intestino delgado. A nivel del colon los cambios también parecen debidos a deshidratación, ya que a medida que transcurrió el tiempo *post mortem* se hicieron más evidentes las aperturas de las criptas de Lieberkühn, debido a que el tejido adyacente perdió turgencia y por tanto grosor.

En el tejido pulmonar no se apreciaron cambios drásticos a nivel de la superficie alveolar, durante las dos primeras horas después de la muerte.

Aparentemente los cambios detectados en los tejidos analizados fueron debido principalmente a pérdida de líquido celular, lo que se tradujo en un adelgazamiento de las estructuras tisulares. Estas alteraciones fueron detectadas con microscopía electrónica de barrido a baja magnificación (150x), lo que indica que fueron cambios muy groseros y estudiados a nivel de superficie tisular; por lo tanto, también hubiesen sido detectadas con microscopía de luz.

Es probable que los cambios autolíticos debidos a procesos enzimáticos, sean muy leves durante los primeros minutos *post mortem* y afecten la estructura interna de la célula, por lo que serían detectados con microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, las alteraciones descritas fueron muy evidentes, lo que pone de manifiesto la importancia de tomar en cuenta el tiempo transcurrido entre la muerte del organismo y la fijación de los tejidos cuando se realizan estudios histográficos, ya que después de los primeros 20 minutos *post mortem* se presentan modificaciones muy evidentes, al menos en los tejidos intestinales.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos la colaboración de los Doctores Leonardo Mata, del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica y Jorge Piza, del Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños. El estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, el Préstamo AID-515-T-026 y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

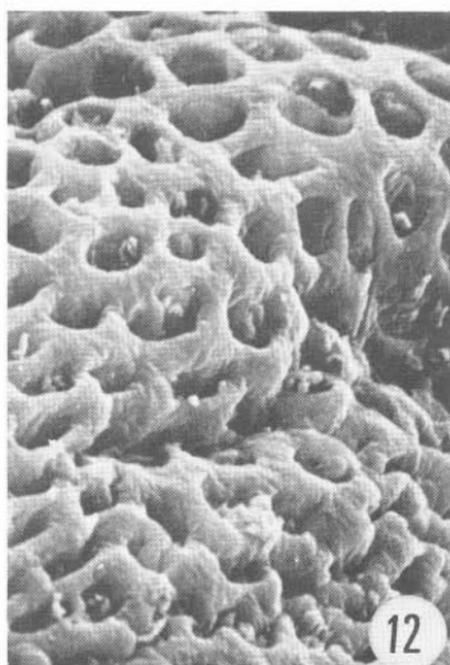
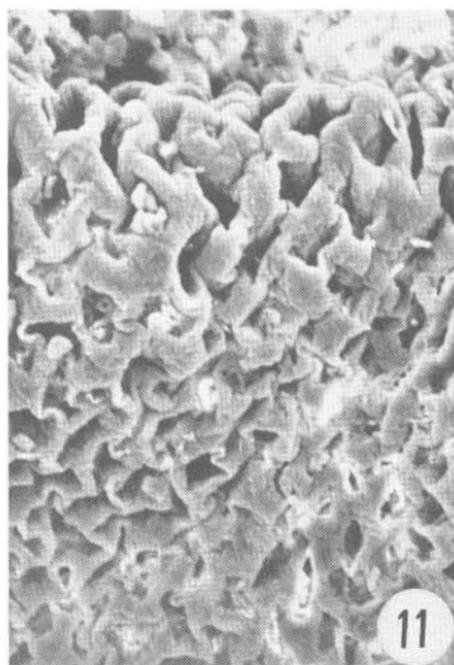
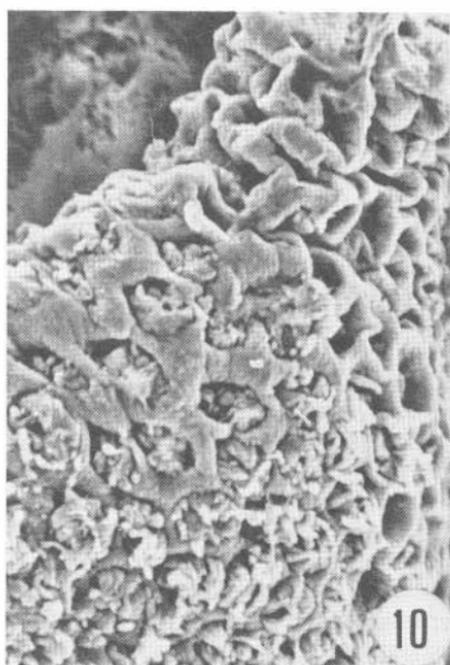
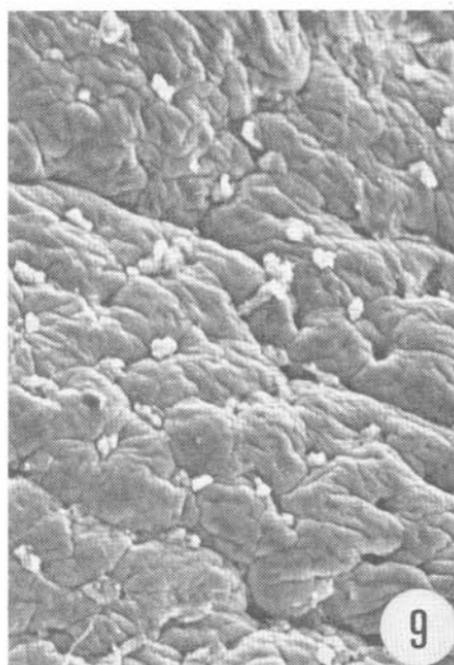


Fig. 9 a 12. Colon. La Figura 9 corresponde a tejidos fijados inmediatamente después del sacrificio. Las Figuras 10, 11 y 12 corresponden a especímenes fijados a los 40, 60 y 120 minutos *post mortem* respectivamente (ver detalles en el texto). Magnificación de 150x.

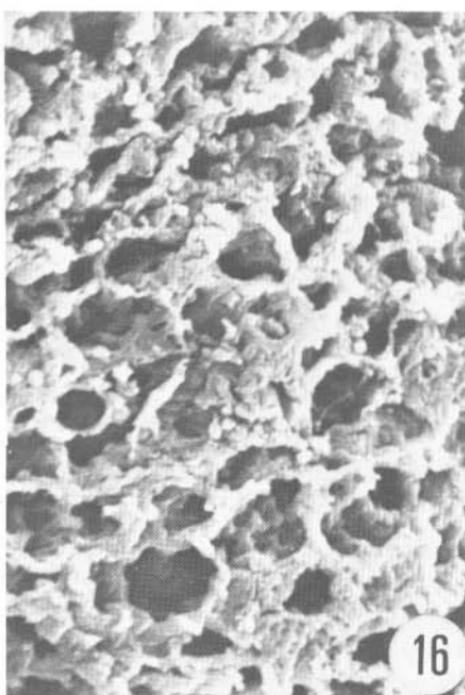
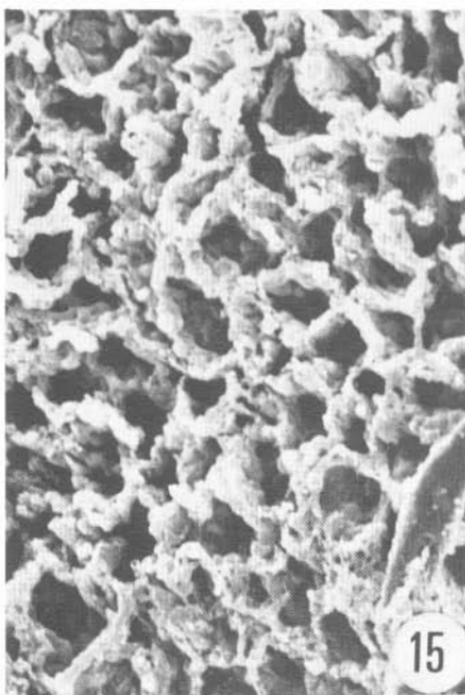
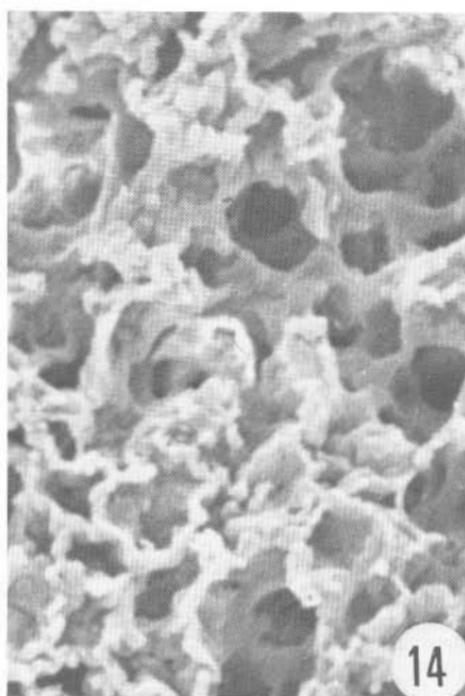
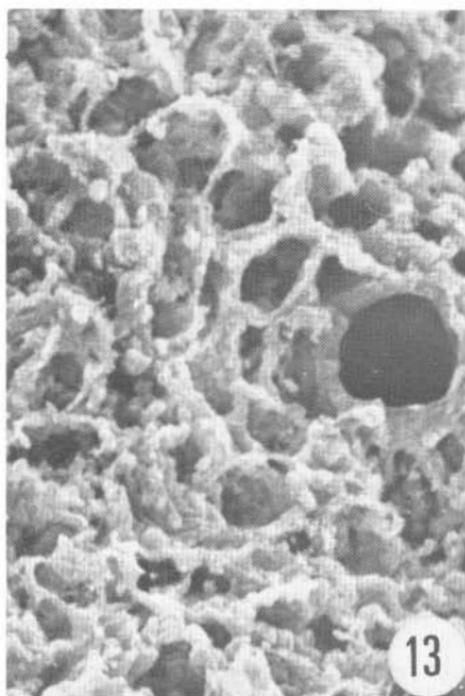


Fig. 13 a 16. Tejido pulmonar. La Figura 13 muestra la estructura normal del pulmón fijado inmediatamente después de la muerte del animal; las Figuras 14 a 16 corresponden a tejido de tres ratones fijados a los 40, 60 y 120 minutos después del sacrificio. Magnificación de 300x.

## RESUMEN

Al microscopio electrónico de barrido se encontró que la mucosa intestinal de ratones sacrificados y disecados a diferentes tiempos (40, 60 y 120 minutos), muestran cambios proporcionales al lapso transcurrido después de la muerte. Posiblemente la principal alteración observada es debida a deshidratación, que lleva a una pérdida de turgencia y rigidez en las vellosidades intestinales. Por otro lado, en el pulmón las alteraciones son poco evidentes. Todos los cambios se inician inmediatamente después de la muerte del animal y son conspicuos después de los primeros 20 minutos *post mortem*.

## REFERENCIAS

- Abraham, E.P.**  
1970. Necrosis, calcification and autolysis, p. 431-450. *In* L. Florey (ed). General Pathology, Hazell Watson and Viney Ltd. England.
- Bradley, H.C.**  
1938. Autolysis and atrophy. *Physiol. Rev.*, 18: 173-196.
- Brandes, D.**  
1965. Observation on the apparent mode of formation of "pure" lysosomas. *O. Ultr. Rev.*, 12: 63-80.
- Bullivant, S.**  
1970. Present status of freezing techniques, p. 101-146. *In* D.F. Parson (ed). Techniques in Electron Microscopy. Academic Press, London.
- David, E., I. Marx, & H. David**  
1971. Das ultrastrukturelle Bild der Nervenzelle in verschiedenen Regionen des Meerschweinchengehirns in Verlauf der postmortalen Autolyse. *Exp. Pathol.* 5: 98-106.
- Heinz, D., & D. Sabine**  
1965. Submikroskopische Strukturveränderungen der Skelettmuskulatur während der postmortalen Autolyse. *Acta Biol. Med. Ger.*, 14: 423-435.
- Nicolas, G., & J.B. Bouhour**  
1971. L'ultrastructure du myocarde de rats au cours de l'autolyse. Etude preliminaire. *Pathol. Biol.*, 18: 1065-1069.
- Nicolas G., M.J. Leroux, & J.B. Bouhour**  
1969. Etude de l'autolyse du myocarde humain. *Med. Leg. Domm. Corpor.*, 2: 120-125.
- Scripearu, G., L. Gavrilita, M. Batescu, & E. Manoilescu.**  
1971. Probleme de diagnostic diferencial intra lesiunile morfalice vitale si modificarile autolitice postmortale. *Morfol. Norm. Patol.*, 16: 343-352.
- Trump B.F., P.J. Goldblatt, & R.E. Stowell**  
1962. An electron microscopical study of early cytoplasmic alterations of hepatic parenchymal cells of mouse liver during necrosis in vitro (autolysis). *Lab. Invest.*, 11: 986-1011.
- Trump, B.F., P.J. Goldblatt, & R.E. Stowell**  
1963. Nuclear and cytoplasmic change during necrosis in vitro (autolysis): An electron microscopy study. *Amer. J. Pathol.*, 43: 220-230.