

MORFOMETRIA DEL DUODENO EN EL RATON NMRI

MORFOMETRICAL STUDY OF NMRI MICE DUODENUM

Por Bravo Moral, A.M.*

Key words: morphometry, duodenum, mice, villus, crypt.
Palabras clave: morfometría, duodeno, ratón, vellosidad, cripta.

SUMMARY

We have realized the study of 10 morphological parameters in the duodenum of the NMRI mice. These parameters were: duodenum length, extension of the Brunner's glands, number of villus and number of crypts/mm, villus height, crypt height, *villus size index*, *crypt size index*, mitotic number and *mitotic index*.

We used 24 animals from 18 to 33 weeks of age.

Significative differences in these parameters between males and females are described.

RESUMEN

Hemos realizado el estudio de 10 parámetros morfológicos en el duodeno del ratón NMRI. Estos parámetros fueron: la longitud del duodeno, extensión de las glándulas de Brunner, n.º de vellosidades y de criptas/mm, altura de la vellosidad, altura de la cripta, *tamaño de la vellosidad*, *tamaño de la cripta*, n.º de mitosis e *índice mitótico*.

* Unidad docente de Histología y Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

El nº de animales fue de 24, pertenecientes a ambos sexos, cuya edad oscilaba entre las 18 y 33 semanas.

Se describen las diferencias significativas encontradas entre ambos sexos, para los distintos parámetros señalados.

INTRODUCCION

En principio, la superficie mucosa del intestino delgado podría considerarse como la superficie interna de un largo cilindro; sin embargo, en la mucosa intestinal existen estructuras cuya misión es la de ampliar el área de la superficie para la digestión y absorción de las sustancias nutritivas. En la rata¹² y el ratón, no existen plicas circulares para aumentar la superficie mucosa como ocurre en el hombre¹⁰, por tanto, el área útil para la digestión-absorción en el intestino delgado está determinada por las vellosidades, microvellosidades y criptas¹².

Las vellosidades intestinales son evaginaciones de la mucosa formadas por un eje central conjuntivo perteneciente a la lámina propia y recubiertas por un epitelio cilíndrico simple con células columnares, mucosas y enteroendocrinas^{2, 8}. En el duodeno del ratón, las vellosidades tienen forma de dedo de guante o ligeramente lanceolada.

Un mayor aumento de la superficie mucosa del intestino delgado se debe a la presencia de glándulas tubulares simples entre las vellosidades, denominadas criptas de Lieberkühn, las cuales se extienden a lo largo de la lámina propia, hasta la muscular de la mucosa. A pesar de ser glándulas tubulares simples, en el ratón es frecuente observar criptas con 2, 3 o incluso 4 bases⁷. La mayoría de los autores consideran a las criptas ramificadas o «bífidas», como un mecanismo de formación de nuevas criptas durante el crecimiento y la reparación^{7, 11}. Las criptas de Lieberkühn del intestino delgado están tapizadas por un epitelio simple con células columnares, mucosas, enteroendocrinas y de Paneth^{2, 4, 8, 16}.

El epitelio intestinal es un sistema en constante renovación. En el epitelio del ratón adulto, la mayoría de las células formadas se utilizan en la renovación del mismo, mientras que sólo una pequeña porción de ellas van a intervenir en el crecimiento de este epitelio⁷. Es evidente que las células columnares⁶, mucosas⁵ y enteroendocrinas⁹ emigran desde las criptas hacia las vellosidades. En la base de las criptas, se encuentran las células madre indiferenciadas, que darán origen a los 4 tipos de células epiteliales intestinales^{3, 4, 6, 15}. Las células epiteliales proliferan dentro de las criptas y se mueven hacia la luz intestinal convirtiéndose en células diferenciadas maduras, perdiendo la capacidad de dividirse¹⁴. Por ello, algunos autores⁷ consideran a la población celular de las criptas como el compartimento de producción celular, mientras que la población celular de las vellosidades representa el compartimento funcional.

En nuestro trabajo, hemos determinado los parámetros morfológicos del duodeno, con el fin de obtener los datos necesarios para detectar posibles diferencias entre individuos o entre grupos de población que puedan ser de aplicación para detectar anomalías, en trabajos posteriores.

MATERIAL Y METODOS

Para nuestro trabajo hemos utilizado ratones albinos de la estirpe NMRI, pertenecientes a ambos sexos. Los animales fueron destetados a las 3 semanas de edad y se distribuyeron machos y hembras por separado. Hasta el momento del sacrificio se

mantuvieron con una dieta granulada normal (A04 de PanLab) y agua «ad libitum». A las 17 semanas de edad, el peso de las hembras oscilaba entre 35 y 39 g. y el de los machos entre 43 y 48 g.

Los animales se sacrificaron en grupos de 6 (3 hembras y 3 machos) a las 18, 23, 28 y 33 semanas de edad, por sobredosis de éter etílico. Todos los animales se sacrificaron entre las 10 y las 12 de la mañana para disminuir en lo posible los cambios debidos a variación diurna.

Inmediatamente después de la muerte se recogía el duodeno de cada animal, se medía su longitud y se seccionaba longitudinalmente para enrollarlo en su totalidad, según la técnica de Moolenbeek y Ruitenber¹³, procediendo posteriormente a su inmersión en solución fijadora de Bouin. El material incluido en parafina se cortó en secciones de 4 micras, que fueron teñidas con la técnica de PAS-hematoxilina.

Las medidas se realizaron con un ocular micrométrico calibrado, a 100 x para la extensión de las glándulas de Brunner, número de vellosidades y de criptas/mm, así como la altura de las vellosidades, y a 400 x para medir la altura de las criptas. Para el recuento de células y número de mitosis se utilizaron mayores aumentos (1.000 x).

La extensión de las glándulas de Brunner fue determinada a nivel de la submucosa, desde el inicio de las glándulas a nivel del estrechamiento pilórico del duodeno hasta su finalización.

Consideramos el número de vellosidades/mm como el número medio de vellosidades comprendidas en 1 mm de la escala del ocular micrométrico, incluyendo en el recuento solamente aquellas vellosidades en las que se veía continuidad de su eje conjuntivo con la lámina propia y al menos era visible un tercio de su longitud. Se realizaron 10 recuentos por cada corte histológico.

El número de criptas/mm, representa el número medio de criptas de Lieberkühn comprendidas en un mm de la escala del ocular micrométrico, incluyendo en el recuento solamente aquellas criptas en las que se veía continuidad de su luz con el espacio intervallosidad y era visible al menos un tercio de su longitud (las criptas «bífidas» se contaban como una sola). Se realizaron 10 recuentos por cada sección.

Consideramos a la altura de la vellosidad como la altura media de las vellosidades, desde la unión vellosidad-cripta hasta el ápice de la vellosidad, medida por el punto medio del eje de la misma. Se midieron 10 vellosidades por cada sección, teniendo en cuenta que se escogían las vellosidades más altas y simétricas, cuyo eje conjuntivo presentaba continuidad con la lámina propia.

Para determinar la altura de la cripta, consideramos a la misma como la longitud media de las criptas de Lieberkühn medida desde su base hasta su desembocadura en el espacio intervallosidad. Se midieron 10 criptas por cada sección, teniendo en cuenta que se consideraban solamente aquellas criptas cortadas longitudinalmente, con toda su luz visible, y cuya base alcanzaba la muscular de la mucosa.

Consideramos al *tamaño de la vellosidad* como el número medio de células epiteliales en los cortes longitudinales de vellosidades representativas. El número de células se determinó por el recuento del número de núcleos, ya que en el epitelio del intestino delgado sólo existen células mononucleadas. En el recuento se incluyeron todos los tipos de células epiteliales: columnares, mucosas y enteroendocrinas. Las vellosidades seleccionadas como representativas eran las más altas, cortadas por su eje medio en

toda su longitud y que presentaban una sola capa de núcleos en el epitelio. Se contaron 10 vellosidades representativas por cada sección.

Para la determinación del *tamaño de la cripta* consideramos a éste como el número medio de células epiteliales en los cortes longitudinales de criptas representativas. En el recuento se incluyeron todos los tipos de células epiteliales: columnares, mucosas, enteroendocrinas y de Paneth. Las criptas se tomaban como representativas cuando se extendían desde la base de la vellosidad hasta la muscular de la mucosa y el plano de la sección pasaba a lo largo de su eje. A ambos lados de la sección presentaban sólo una capa de núcleos. Se contaron 10 criptas representativas por cada sección.

Consideramos el número de mitosis como el número medio de figuras de mitosis por cripta, y para su determinación se midieron 20 criptas representativas por cada corte histológico del duodeno.

El *índice mitótico* es el porcentaje de figuras de mitosis de la cripta en un momento dado. Su valor deriva de la siguiente ecuación:

$$M = \frac{\text{n.º de mitosis}}{\text{tamaño de la cripta}} \times 100$$

RESULTADOS

La longitud del duodeno aumentaba con la edad de los animales, exceptuando el grupo de los machos de 33 semanas, en el cual disminuyó ligeramente respecto a los 2 grupos anteriores (tabla 1). A las 23 y 28 semanas de edad, la longitud del duodeno era significativamente mayor en los machos que en las hembras ($P < 0,05$).

La extensión de las glándulas de Brunner era variable respecto a la edad de los animales, pero siempre mayor en los machos que en las hembras, con un grado de significación del 95% ($P < 0,05$) a las 28 semanas, y del 99% ($P < 0,001$) a las 18, 23 y 33 semanas de edad (Tabla I).

Tabla I
Medidas de la longitud del duodeno y extensión de las glándulas de Brunner en ratones macho y hembra y diferencia entre ambos sexos según la edad.

| Edad (semanas) | Longitud del duodeno (cm) | | | Extensión gl. Brunner (mm) | | |
|----------------|---------------------------|------------------------|--------------------|----------------------------|------------------------|-------------------|
| | Machos | Hembras | Diferencia | Machos | Hembras | Diferencia |
| 18 | 5,30±0,15 ^a | 5,56±0,20 ^a | -0,26 ^b | 3,75±0,05 ^a | 2,37±0,10 ^a | 1,38 ^d |
| 23 | 6,23±0,18 | 5,63±0,17 | 0,60 ^c | 3,91±0,18 | 2,08±0,08 | 1,83 ^d |
| 28 | 6,26±0,13 | 5,83±0,12 | 0,43 ^c | 3,29±0,12 | 2,82±0,12 | 0,47 ^c |
| 33 | 6,10±0,05 | 6,03±0,28 | 0,07 ^b | 4,97±0,06 | 3,69±0,07 | 1,28 ^d |

a= $\bar{X} \pm$ error estándar para 3 animales.

b= No significativo. $P > 0,05$.

c= $P < 0,05$.

d= $P < 0,001$.

La Tabla II refleja el número de vellosidades y de criptas/mm. Tanto en el número de vellosidades como en el número de criptas/mm no existían diferencias significativas entre machos y hembras a las 18 y 23 semanas de edad. A las 28 semanas el número de vellosidades/mm era significativamente mayor en las hembras ($P < 0,05$) y a las 33 semanas el número de criptas/mm era significativamente mayor en los machos ($P < 0,05$).

Tabla II
N.º de vellosidades y n.º de criptas/mm en ratones macho y hembra y diferencia entre ambos sexos según la edad.

| Edad (semanas) | Nº vellosidades/mm | | | Nº criptas/mm | | |
|-------------------|------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| | Machos | Hembras | Diferencia | Machos | Hembras | Diferencia |
| 18 | 6,83±0,12 ^a | 6,83±0,17 ^a | 0,00 ^b | 17,03±0,26 ^a | 17,01±0,75 ^a | 0,02 ^b |
| 23 | 6,70±0,17 | 6,66±0,21 | 0,04 ^b | 17,63±0,20 | 17,23±0,59 | 0,40 ^b |
| 28 | 6,56±0,20 | 7,50±0,20 | -0,94 ^c | 17,00±0,25 | 16,60±0,49 | 0,40 ^b |
| 33 | 7,06±0,17 | 6,93±0,18 | 0,13 ^b | 16,33±0,31 | 17,06±0,06 | -0,73 ^c |

a= $\bar{X} \pm$ error estándar para 3 animales.

b= No significativo. $P > 0,05$.

c= $P < 0,05$.

Comprobamos que la altura de las vellosidades era mayor en los machos que en las hembras de 18 semanas, con un grado de significación del 95% ($P < 0,05$) (Tabla III), no existiendo diferencias significativas entre ambos sexos a partir de esa edad.

En cuanto a la altura de las criptas (Tabla III), sólo hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ambos sexos a las 33 semanas siendo mayor en los machos que en las hembras.

Tabla III
Altura de la vellosidad y altura de la cripta en ratones macho y hembra y diferencia entre ambos sexos según la edad.

| Edad (semanas) | Altura de la vellosidad (μ) | | | Altura de la cripta (μ) | | |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------|
| | Machos | Hembras | Diferencia | Machos | Hembras | Diferencia |
| 18 | 470,00±02,64 ^a | 460,00±03,51 ^a | 10,00 ^c | 119,33±2,76 ^a | 108,08±5,19 ^a | 11,25 ^b |
| 23 | 487,00±13,01 | 499,66±11,02 | -12,66 ^b | 104,83±4,08 | 104,25±5,05 | 0,58 ^b |
| 28 | 469,00±01,15 | 465,00±08,32 | 4,00 ^b | 99,66±2,04 | 107,66±4,76 | -8,00 ^b |
| 33 | 438,33±20,40 | 483,00±05,29 | -44,67 ^b | 112,08±4,09 | 98,00±1,37 | 14,08 ^c |

a= $\bar{X} \pm$ error estándar para 3 animales.

b= No significativo. $P > 0,05$.

c= $P < 0,05$.

Las determinaciones del *tamaño de la vellosidad* se reflejan en la tabla IV, existiendo tan sólo diferencias representativas ($P < 0,05$) entre ambos sexos a las 33 semanas de edad, siendo mayor el *tamaño de la vellosidad* en las hembras de esta edad respecto al de los machos.

El *tamaño de la cripta* (Tabla IV) y el número de mitosis (Tabla V) fueron los dos únicos parámetros de nuestro trabajo en los cuales no hubo diferencias significativas entre machos y hembras en ningún grupo de edad.

Tabla IV
Tamaño de la cripta (n.º de células epiteliales/sección) y tamaño de la vellosidad (n.º de células epiteliales/sección) en ratones macho y hembra y diferencia entre ambos sexos según la edad.

| Edad (semanas) | Tamaño de la cripta | | | Tamaño de la vellosidad | | |
|----------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| | Machos | Hembras | Diferencia | Machos | Hembras | Diferencia |
| 18 | 39,53±0,12 ^a | 40,30±1,21 ^a | -0,77 ^b | 173,70±0,36 ^a | 174,10±7,71 ^a | -0,40 ^b |
| 23 | 39,03±0,52 | 39,73±1,41 | -0,70 ^b | 178,70±0,81 | 180,20±3,27 | -1,50 ^b |
| 28 | 39,60±1,10 | 40,96±1,05 | -1,36 ^b | 178,03±1,66 | 181,43±2,21 | -3,40 ^b |
| 33 | 39,10±1,41 | 39,43±0,80 | -0,33 ^b | 167,40±5,47 | 180,20±0,72 | -12,80 ^c |

a= $\bar{X} \pm$ error estándar para 3 animales.

b= No significativo. $P > 0,05$.

c= $P < 0,05$.

El *índice mitótico* (M) fue mayor en los machos que en las hembras de 33 semanas, con un grado de significación del 95% ($P < 0,05$), no existiendo diferencias significativas entre el resto de los grupos (Tabla V).

Tabla V
N.º de mitosis (n.º de figuras de mitosis/sección de la cripta e índice mitótico (% de mitosis/sección de la cripta) en ratones macho y hembra y diferencia entre ambos sexos según la edad.

| Edad (semanas) | Nº mitosis | | | Índice mitótico (%) | | |
|----------------|------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|--------------------|
| | Machos | Hembras | Diferencia | Machos | Hembras | Diferencia |
| 18 | 1,26±0,06 ^a | 1,26±0,04 ^a | 0,00 ^b | 3,19±0,14 ^a | 3,13±0,03 ^a | 0,06 ^b |
| 23 | 1,28±0,03 | 1,21±0,04 | 0,07 ^b | 3,28±0,04 | 3,06±0,13 | 0,22 ^b |
| 28 | 1,05±0,02 | 1,11±0,04 | -0,06 ^b | 2,65±0,04 | 2,72±0,04 | -0,07 ^b |
| 33 | 1,10±0,05 | 1,01±0,01 | 0,09 ^b | 2,80±0,09 | 2,57±0,01 | 0,23 ^c |

a= $\bar{X} \pm$ error estándar para 3 animales.

b= No significativo. $P > 0,05$.

c= $P < 0,05$.

DISCUSION

Algunos autores¹² han estudiado la longitud del duodeno en las ratas hembra de 32 semanas obteniendo un valor medio de 7,1 cm, que difiere del obtenido en nuestro trabajo para las hembras de esa edad (6,03 cm), diferencia que parece lógica entre ambas especies de roedores.

En ratones macho Swiss de 28 semanas⁷, se ha calculado una altura de las criptas de 170 micras y una altura de las vellosidades de 550 micras, a nivel del yeyuno, valores sensiblemente mayores a los obtenidos por nosotros a nivel del duodeno (99,66 y 469 micras respectivamente).

En ratas macho de 32 semanas de edad^{2, 16}, el *tamaño de la vellosidad* a nivel del duodeno oscila entre 270 y 275,6 y el *tamaño de la cripta* entre 117,5 y 124,2, resultados mucho mayores a los obtenidos en nuestro trabajo (Tabla IV).

Nuestros datos se aproximan más a los estudiados en el duodeno de ratas hembra de 18 a 21 semanas¹⁵, con un *tamaño de la cripta* entre 58 y 62.

Coincidimos con otros autores^{1, 2, 14} en que las mitosis a nivel de la cripta son visibles a nivel de los 2/3 inferiores de su longitud. Las mitosis se aprecian claramente, ya que los grupos de cromosomas se localizan más próximos a la luz de la cripta que el resto de los núcleos epiteliales.

Nuestros datos acerca del n.º de mitosis no coinciden con los obtenidos en ratas macho adultas^{2, 16}, que oscilan entre 5,8 y 6,2 a nivel del duodeno.

Ninguno de los trabajos revisados hacía referencia a la extensión de las glándulas de Brunner ni al n.º de vellosidades y de criptas/mm.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALTMANN, G.G. (1983). Morphological observations on mucus-secreting nongoblet cells in the deep crypts of the rat ascending colon. *Am. J. Anat.*, 167: 95-117.
- 2) ALTMANN, G.G. y SNOW, A.D. (1984). Effects of 1,2-Dimethylhydrazine on the number of epithelial cells present in the villi, crypts, and mitotic pool along the rat small intestine. *Cancer Res*, 44: 5.522-5.531.
- 3) BJERKNES, M. y CHENG, H. (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am. J. Anat.*, 160: 51-63.
- 4) BJERKNES, M. Y CHENG, H. (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells, in the adult mouse. *Am. J. Anat.* 160: 77-91.
- 5) BJERKNES, M. y CHENG, H. (1985). Mucous cells and cell migration in the mouse duodenal epithelium. *Anat. Rec.*, 212: 69-73.
- 6) CHENG, H. y LEBLOND, P.C. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.*, 141: 537-562.
- 7) CHENG, H. y BJERKNES, M. (1985). Whole population cell kinetics and postnatal development of the mouse intestinal epithelium. *Anat. Rec.*, 211: 420-426.
- 8) FERREIRA, N.M. (1971). Argentaffin and other «endocrine» cells of the small intestine in the adult mouse. I. Ultrastructure and classification. *Am. J. anat.*, 131: 315-330.
- 9) FERREIRA, N.M. y LEBLOND, P.C. (1971). Argentaffin and other «endocrine» cells of the small intestine in the adult mouse. II. Renewal. *Am. J. Anat.*, 131: 331-352.
- 10) GENESER, F. (1984). *Histología*. Ed. Médica Panamericana S.A., Buenos Aires: 422-423.
- 11) MASKENS, A.P. (1978). Histogénesis of colon glands during postnatal growth. *Acta Anat.*, 100: 17-26.

- 12) MAYHEW, M.T. y MIDDLETON, C. (1985). Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. *J. Anat.* 141: 1-17.
- 13) MOOLENBEEK, C. y RUITENBERG, J.E. (1981). The «Swiss roll»: a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab. Anim.*, 15: 57-59.
- 14) POZHARISSKI, K.M.; LIKHACHEV, A.J.; KLIMASHEVSKI, V.F. y SHAIPOSHNIKOV, J.D. (1979). Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology. *Arch. Cancer Res.*, 30: 165-237.
- 15) SENIOR, V.P.; SUNTER, P.J.; APPLETON, R.D. y WATSON, J.A. (1984). Are there diurnal fluctuations in crypt length and crypt cell birth rate in the intestines of normal and carcinogen rats? *J. Anat.*, 139: 513-523.
- 16) SNOW, A.D. y ALTMANN, G.G. (1983). Morphometric study of the rat duodenal epithelium during the initial six months of 1,2-Dimethylhydrazine carcinogenesis. *Cancer Res.*, 43: 4838-4,849.