

GMD

Facultad Cs. Médicas  
Biblioteca



TDM 2322

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

---

**MODIFICACIONES MORFOLÓGICAS EN EL  
EPITELIO ASOCIADO AL FOLÍCULO DEL APÉNDICE  
CECAL E ÍLEON TERMINAL (PLACA DE PEYER) DEL  
CONEJO TRAS LA ADMINISTRACIÓN PARENTERAL  
DE OVOALBÚMINA**

---

***Autora***

Médica anatomo-patóloga Stella Maris Roma

***Director de la Tesis***

Profesor Doctor Alberto Enrique D'Ottavio



**Año 2020**

## **DEDICATORIA**

---

A mi madre Stella, mi hermana María Alejandra y Fernando, mis mayores afectos y pilares fundamentales en el camino de mi vida.

A la memoria de mi padre Héctor y del Dr. José Luis D'Ottavio, mi primer director en investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Mi afectuoso agradecimiento a:

- Dr. Alberto Enrique D'Ottavio, Director de esta tesis doctoral, por su fructífera colaboración, permanente estímulo y amigable acompañamiento.
- Dr. Andreas Gebert (Instituto de Anatomía de la Universidad de Lübeck, Alemania) por su invaluable supervisión de los estudios allí realizados con microscopio Láser Confocal de Barrido.
- Dr. Alfredo Rigalli por su continua comprensión, claridad conceptual y aliento.
- Dr. Ricardo Di Masso por su idóneo, didáctico y amable asesoramiento estadístico.
- Dr. Claudio Barbeito por la realización de las técnicas histoquímicas de lectinas.
- Dr. Miguel Ángel Vinuesa, por colaborar en el diseño del modelo experimental aquí utilizado.

## ÍNDICE

---

<b>Resumen</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	2
1.1. Del ser humano al conejo .....	2
1.1.1. La microbiota comensal .....	5
1.1.2. La díada epitelio-secreciones reforzadoras .....	8
1.1.3. El sistema inmune mucoso .....	12
1.2. El conejo: morfo-fisiología de su tubo digestivo .....	14
1.3. El FAE y las células M cuniculares.....	18
1.3.1. Hitos diacrónicos.....	18
1.3.2. El FAE .....	20
1.3.3. Las células M .....	20
1.4. Otras células a considerar .....	25
1.4.1. Leucocitos polimorfonucleares eosinófilos .....	25
1.4.2. Macrófagos .....	26
1.5. Procesos celulares de interés .....	28
1.5.1. Apoptosis .....	28
1.6. Inflamación en la barrera mucosa intestinal .....	30
<b>2. Hipótesis y objetivos</b> .....	31
2.1. Interrogantes para una hipótesis .....	31
2.2. Hipótesis y objetivos .....	33
<b>3. Material y método</b> .....	35
3.1. Material y Método .....	35
3.1.1. Animales .....	35
3.1.2. Estudio histológico .....	36

3.1.3. Cuantificación de las áreas del FAE y de los bolsillos de las células M .....	37
3.1.4. Cuantificación de los LIEs .....	38
3.1.5. Cuantificación de apoptosis .....	38
3.1.6. Proliferación de células epiteliales en criptas asociadas al folículo y diferenciación de las células M .....	39
3.1.7. Patrones de glicosilación y residuos de sacáridos .....	40
3.1.8. Cambios histopatológicos .....	41
3.2. Análisis estadístico de los resultados .....	42
3.2.1. Análisis estadístico de variables cuantitativas .....	42
3.2.2. Análisis de variables semi-cuantitativas .....	42
3.2.3. Análisis cualitativo de variaciones histológicas .....	42
3.3. Recaudos éticos y de bioseguridad .....	43
<b>4. Resultados</b> .....	<b>44</b>
4.1. Apéndice cecal .....	44
4.1.1. Histología de los animales controles .....	44
4.1.2. Cuantificación de las áreas del FAE y de los bolsillos de las células M .....	45
4.1.3. Cuantificación de los LIEs .....	47
4.1.4. Cuantificación de apoptosis .....	49
4.1.5. Proliferación de células epiteliales en criptas asociadas al folículo y diferenciación de células M .....	49
4.1.6. Patrones de glicosilación y eventuales cambios en los residuos de sacáridos .....	51
4.1.7. Cambios histopatológicos .....	53
4.1.7.1. Leucocitos eosinófilos .....	53
4.1.7.2. Edema y dilataciones vasculares linfáticas y sanguíneas .....	56
4.1.7.3. Macrófagos .....	57
4.2. Placa de Peyer .....	59

4.2.1. Histología de los animales controles .....	59
4.2.2. Cuantificación de las áreas del FAE y de los bolsillos de las células M .....	60
4.2.3. Cuantificación de los LIEs .....	63
4.2.4. Cuantificación de apoptosis .....	65
4.2.5. Proliferación de células epiteliales en criptas asociadas al folículo y diferenciación de células M .....	66
4.2.6. Patrones de glicosilación y eventuales cambios en los residuos de sacáridos .....	66
4.2.7. Cambios histopatológicos .....	68
4.2.7.1. Leucocitos eosinófilos .....	68
4.2.7.2. Edema y dilataciones vasculares linfáticos y sanguíneas .....	69
4.2.7.3. Macrófagos .....	71
4.2.7.4. FAE .....	72
<b>5. Discusión .....</b>	<b>74</b>
5.1. Referencias generales .....	74
5.2. Resultados particulares .....	77
5.2.1. Apéndice cecal .....	77
5.2.2. Placa de Peyer .....	86
5.3. Concordancias, discordancias e interacciones entre apéndice cecal y placa de Peyer .....	90
5.3.1. Concordancias .....	90
5.3.2. Discordancias e interacciones .....	92
5.4. Posible derivación médica .....	93
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>96</b>
6.1. Aportes inéditos u originales .....	96
6.2. Posible derivación médica .....	97

<b>7. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>98</b>
<b>8. Anexo .....</b>	<b>125</b>
8.1. Trabajos socializados sobre el tema .....	125
8.2. Algunas diferencias intersexuales .....	126
8.3. Linfopoyesis en el conejo .....	128
8.4. Otros resultados y relaciones en apéndice cecal y placa de Peyer cuniculares .....	129
8.5. Propuestas conjeturales pasibles de ulterior profundización .....	131

## RESUMEN

---

Esta tesis evalúa morfológicamente (hoy, estándar dorado) modificaciones en el epitelio asociado al folículo del apéndice cecal y placa de Peyer del conejo (dos de los GALTs mayores digestivos) tras administración parenteral de ovoalbúmina, acrecentando bibliográficos desafíos antigénicos orales previos.

Fue realizada en dichos órganos de este apropiado modelo biológico mediante seis grupos de animales (uno, control y cinco experimentales) y método y técnicas compatibles.

De los resultados, reseñados y debatidos, son concluidos: (a) aportes originales (modificaciones en áreas del FAE y bolsillos membranosos de las células M, linfocitos intraepiteliales, apoptosis, lectinas y cambios histopatológicos - eosinófilos, edema, linfangiectasias y macrófagos - en dos etapas sucesivas [inflamatoria y reparadora]; probable merma funcional de la barrera mucosa en epitelio y sistema inmune mucoso; conexión entre los sistemas inmunitarios periférico y mucoso y origen criptal de las células M); (b) concordancias, discordancias e interacciones entre ambos órganos y (c) su posible derivación médica.

Respondidas las preguntas-guía, corroborada la hipótesis alternativa y cumplidos los objetivos, la vía parenteral, prácticamente inexplorada hasta la fecha en dos órganos inmunoadyuvantes claves así como los referidos cambios morfológicos post-desafío antigénico proveen la originalidad exigible a este tipo de trabajo.

Palabras clave: conejo, apéndice cecal, placa de Peyer, GALTs, histopatología, inmunización subcutánea

## 1.1. DEL SER HUMANO AL CONEJO

---

Sabido es que la superficie externa del ser humano se halla revestida por la piel, mientras que las cavidades internas lo están por superficies mucosas, como las digestiva, respiratoria, genital y urinaria (Vancamelbeke et al., 2017).

En relación con ello, resulta menester señalar que en el mundo fallecen anualmente 10.000.000 de niños menores de cinco años (lo que equivale a casi 30.000 óbitos diarios) debido a infecciones cuya puerta de entrada son tales superficies mucosas. De ese total de defunciones, 2.500.000 se deben a infecciones de tracto gastrointestinal, con un promedio de 3 episodios de diarrea/año/niño (Kosek et al., 2003). Si bien, con el uso de antibióticos y otros medicamentos, dicha mortalidad se halla en descenso, la morbilidad continúa siendo elevada y no existen vacunas para aproximadamente 6.000.000 de las mismas (Brandtzaeg, 2009; Clements et al., 2016).

***De allí la relevancia de conocer cómo está constituida una superficie mucosa y cómo actúan sus mecanismos defensivos.***

Haciendo especial foco en la mucosa del tubo digestivo, su superficie alcanza los 400 m<sup>2</sup> en el ser humano; vale decir, el doble de la cutánea. Tan extendida área contacta con una variedad de alimentos, gérmenes, toxinas y carcinógenos, en continua ampliación (Bailey-Bucktrout et al., 2011; Zhang et al., 2017; Kimura et al., 2019; Lamers et al., 2020), por lo que en ella colisionan dos necesidades esenciales: (1) incorporar nutrientes a través de un epitelio delgado, y (2) disponer de mecanismos de defensa reforzados en favor de una adecuada vigilancia inmunológica (Gebert et al., 1997a; MacDonald et al., 2005; Nakamura et al., 2018).

Respecto de la primera, corresponde considerar que por el área antedicha transita anualmente cerca de una tonelada de alimentos, equivalente a 100 kg de proteínas, y que un 10<sup>-5</sup> aproximado de las ingestas es absorbido como proteínas intactas, detectables en el plasma sanguíneo. En lo que concierne a la segunda, resulta pertinente recordar que las bacterias comensales aumentan desde la cavidad oral hasta colon y recto donde constituyen el 50% de la materia fecal. Aquí, su peso seco aloja 10<sup>13</sup> microorganismos/g, número que, aunque para

algunos autores se halla en un orden de magnitud mayor al de las células eucariotas de toda la economía ( $10^{12}$ ) con una relación 10:1 (Tannock, 2007), se halla actualmente cuestionado ya que se postula que dicha relación se aproxima a 1:1 (Sender et al., 2016). En este sentido, fuerza es agregar, además, que en los ganglios linfáticos mesentéricos que drenan el intestino han sido encontrados escasos microorganismos, lo que indica que a pesar de la gran cantidad de gérmenes, éstos no atraviesan la barrera mucosa (MacDonald et al., 2005; Brandtzaeg, 2010).

Por ende, dable es advertir que si para todos estos antígenos (alimentarios y microbiota comensal), se montara una respuesta inmune de rechazo, la mucosa digestiva devendría una verdadera arena romana. De allí que, evolutivamente, hayan surgido durante millones de años, dos mecanismos aliviadores de los fenómenos de hiper-respuesta: *exclusión* e *inmuno-supresión* (Brandtzaeg, 2010; Brandtzaeg, 2011).

La *exclusión* mantiene los antígenos alejados de la superficie epitelial, impidiendo con ello su contacto y adherencia, pasos previos a la invasión de los tejidos internos. Este proceso se subdivide en *no-inmune*, ejercido por el mucus y las enzimas lumbinales, e *inmune*, llevado a cabo por la Inmunoglobulina A (IgA). Mientras el mucus realiza una separación física entre bacterias comensales y epitelio creando, a la par, un espacio de cohabitación, la IgA neutraliza virus y toxinas, aglutina gérmenes e impide la inflamación deletérea, dado que no fija el complemento. Más aún, se fija al mucus y es removida y eliminada al exterior por los movimientos peristálticos (Brandtzaeg, 2011; Goto et al., 2012).

Por su parte, la muy robusta *inmuno-supresión* “educa” al sistema inmune en favor de la producción de una respuesta de tolerancia hacia los antígenos alimentarios y la flora comensal, lo que redundaría en la regulación negativa de la respuesta inmune de rechazo (Brandtzaeg, 2010; Brandtzaeg, 2011; Goto et al., 2012).

*Exclusión* e *inmuno-supresión* son responsables del mantenimiento de la inmuno-homeostasis en el tubo digestivo. Ello demanda una barrera epitelial madura y una red inmuno-regulatoria adecuada, exigiendo no sólo una estimulación exógena sino una fina sintonía entre las células presentadoras de antígenos (inmunidad innata) y los linfocitos (inmunidad adquirida). Todo ello acontece especialmente en el período perinatal tardío y en los primeros meses de vida,

cuando una barrera mucosa muy permeable induce la aparición de ambos fenómenos, que son los que establecen el tono inmuno-supresor predominante en el adulto. Tan importante es esta presión externa (ejercida por la microbiota y algunos alimentos) que, en las modernas sociedades industrializadas, los cambios en los hábitos dietéticos, higiénicos y médicos hacen que los individuos se encuentren expuestos a menor cantidad de gérmenes y que, a la par, se haya incrementado el número de casos con alergia a partir de la inadecuada “estimulación y educación” del sistema inmune (Mayer, 2003; MacDonald et al, 2005; Brandtzaeg, 2011). En suma, la precitada inmuno-homeostasis halla sustento en un **trípode homeostático: microbiota bacteriana comensal, epitelio con secreciones reforzadoras y sistema inmune mucoso (SIM)**, verdadera trama de interacciones que provee la plataforma de un microambiente flexible y dinámico (Goto et al., 2012).

Ahora bien, a fin de que los elementos de este trípode homeostático interactúen y puedan funcionar la *exclusión* y la *inmuno-supresión*, es preciso que pequeñas cantidades de antígenos luminales, atraviesen la barrera mucosa y contacten con las células inmuno-competentes (Mestecky et al., 2015; Sehgal et al., 2017). Como el traslado de estos elementos debe realizarse de manera controlada, desde que su entrada masiva podría ser letal para el huésped, tal tarea se realiza en algunas localizaciones anatómicas humanas muy específicas: placas de Peyer en yeyuno-íleon, apéndice cecal y nódulos linfoides aislados (localizados predominantemente en colon terminal y recto) (Newberry et al., 2005; Kimura 2018). Estos sitios evidencian una estructura histológica compatible con dicha función, por lo que revelan agregados de células inmunes distribuidas en compartimientos. En estas formaciones se identifican: *folículos linfoides* (con predominio de linfocitos B - L<sub>B</sub> - y escasos linfocitos T - L<sub>T</sub> -), *áreas interfoliculares* (con preponderancia de L<sub>T</sub>) y *domo* (área con mixtura de L<sub>B</sub> y L<sub>T</sub>, macrófagos, células dendríticas - presentadoras de antígenos -, ocasionales células plasmáticas y aislados mastocitos). Todo ello se aprecia tapizado por un epitelio cilíndrico simple denominado **FAE** (*follicle associated epithelium* o epitelio asociado al folículo), donde se localizan las **células M** (membranosas, *microfold*), más adelante detalladas (Rescigno, 2001; Wittig et al., 2003; Newberry et al., 2005; Jung et al., 2010; Ohno, 2016).

### 1.1.1. La microbiota bacteriana comensal

Las superficies corporales humanas, como la piel y las mucosas, están colonizadas por microorganismos comensales que conforman una *microflora* o *microbiota* (Hooper et al., 2001; Spasova et al., 2014).

Más allá del hallazgo de Eukarya (del gr. *Eu* = buen, normal y *Carion* = carozo, nuez, núcleo), dominio integrado por organismos celulares nucleados, y de Archaea (del gr. *Archeon* = antiguo), dominio formado por procariotas unicelulares anucleados, la mayoría corresponde al dominio Bacteria (del gr. *Baktería* = báculo, bastón, vara, varilla) al que pertenecen cuatro filas: uno, didérmico Gram (-): **Proteobacteria** (que por la gran diversidad morfológica de sus constituyentes evoca a Proteo, dios griego del mar, quien podía cambiar de forma a determinado fin) y los tres restantes, monodérmicos Gram (+): **Actinobacteria** (del gr. *Actinos* = rayo), **Bacteroidetes** y **Firmicutes** (del Lat. *Firmus* = fuerte y *Cutis* = piel, por su gruesa pared celular) (Caricilli et al., 2014). La cantidad de genes que estos microorganismos alojan sobrepasa 150 veces la del genoma humano (Hapfelmeier et al., 2010; Tlaskalová-Hogenová et al., 2011)<sup>1</sup>.

En el marco del ya aludido mutualismo bacteria-huésped<sup>2</sup>, éste ofrece varios nutrientes mientras, en simultáneo, las bacterias degradan carbohidratos que proveen metabolitos y energía (Hooper et al., 2012). Su carácter predominantemente anaerobio permite conjeturar que provienen de épocas remotas durante las que la Tierra poseía una atmósfera pobre en oxígeno (Macpherson et al., 2005).

Reiterando lo oportunamente reseñado, las bacterias aumentan en el ser humano desde las  $10^{12}$  habidas en la cavidad oral (lengua, dientes y tejidos periodónticos) hasta alcanzar  $10^{13}$  en colon y recto (Tannock, 2007).

Al nacimiento, el tubo digestivo es estéril. No obstante, el paso por el canal del parto, la lactancia, los cuidados maternos y los gérmenes del entorno determinan la flora que, a la postre,

<sup>1</sup> Cabe señalar complementariamente que existe, asimismo, una mínima cantidad de virus, hongos y protozoos (Tannock, 2007; Tlaskalová-Hogenová et al., 2014)

<sup>2</sup> Se calcula que la biomasa simbiote humana pesa entre 1 y 2 kg (Brandtzaeg, 2011)

poblará el colon. Las comunidades de bacterias adquiridas dependen de factores genéticos, ambientales y hábitos del individuo (Bibiloni et al., 2010; Ashida et al., 2011; Caricilli et al., 2014).

Durante los primeros meses, entre el 60 y el 91% de las bacterias pertenece al género *Bifidobacterium* (por su aspecto en Y) del filo *Actinobacteria*. Con posterioridad, tales porcentajes decrecen paulatinamente hasta su drástica reducción en la adultez. Este género bacteriano es importante promotor del desarrollo inmunológico. Luego, la comunidad se vuelve más compleja, completándose su estatus definitivo hacia los 4 años de edad. A partir de entonces resulta harto dificultosa su modificación ya que queda organizado el antes aludido mutualismo con el huésped. En suma, las condiciones ambientales en las que el ser humano nace y es criado influyen en las comunidades bacterianas que éste aloja (Tannock, 2007; Gkouskou et al., 2014).

Los gérmenes referidos integran un ecosistema sumamente necesario, ya que colaboran en la degradación de algunos nutrientes y producen ácidos grasos de cadena corta (ácidos acético, propiónico y butírico), aminas, fenoles, indoles y gases. Más aún, algunos de ellos son utilizados como fuente de carbono y energía por los colonocitos, habiéndoselos reportado igualmente como fuente de vitaminas K, B9 (ácido fólico) y B12, de reconocida relevancia orgánica (Macpherson et al., 2009; Maslowski et al., 2011; Gutzeit et al., 2014).

No es ocioso redundar en que la colonización del tubo digestivo por determinadas bacterias promueve la digestión y la absorción de nutrientes, estimula el almacenamiento de grasas, acelera la renovación epitelial y altera la actividad motora (Cerf-Bensussan et al., 2010; Spasova et al., 2014). En ese sentido, no resulta aventurado argüir que ellas constituyen el mayor órgano fermentador humano (Lyte, 2010).

En contraste, la invasión oportunista de los tejidos del huésped podría acarrear consecuencias nocivas como inflamación o sepsis. Es en este tópico donde interviene el sistema inmune, previniendo la infección y manteniendo las ventajas metabólicas que los mencionados gérmenes aportan (Hooper et al., 2012).

Por consiguiente, podría decirse que la asociación procariotas-eucariotas establece relaciones cooperativas en lo que atañe al intercambio de metabolitos y energía mientras que el sistema inmune mantiene la homeostasis (Cerf-Bensussan et al., 2010).

La flora comensal estimula la síntesis y excreción de sustancias microbicidas por las células epiteliales, de manera que el epitelio actúa como una barrera físico-química inducible. Igualmente, estimula la síntesis de IgA secretoria para lo que es necesario que pequeñas cantidades de estos gérmenes contacten con el sistema inmune (Macpherson et al., 2005; Mantis et al., 2010; Pabst, 2012).

Ha sido comprobado que estas bacterias modulan el SIM ocupando un nicho ecológico que impide la colonización por patógenos del tracto digestivo. En animales libres de gérmenes se ha detectado un pobre desarrollo del SIM, cuya restitución ocurre tras ser expuestos a medios con presencia bacteriana. En ratones inmunocompetentes, las bacterias estimulan la producción de IgA secretoria, la diferenciación de células T efectoras (TH<sub>1</sub>-TH<sub>2</sub>-TH<sub>17</sub>) y el desarrollo de células T regulatorias (Hrncir et al., 2008); vale decir, el desarrollo del GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue – Tejido Linfático Asociado al Digestivo-) en mamíferos es estrictamente dependiente de señales derivadas de las bacterias (Cerf-Bensussan et al., 2010).

Una vez que la microbiota comensal se halla establecida se genera una retroalimentación negativa con el SIM, ineludible para mantener la homeostasis inmune del huésped. Bien podría expresarse que el huésped discierne entre comensales y patógenos aunque ambos posean las mismas moléculas inmuno-estimuladoras. Bajo condiciones normales el sistema inmune es instruido para no responder a la microbiota comensal (Caricilli et al., 2014).

Adicionalmente, los microorganismos intestinales tendrían un importante impacto en el desarrollo del SIP (sistema inmune periférico). Ha sido postulado que la disbiosis (o disbacteriosis) intestinal predispone a enfermedades de órganos no pertenecientes al sistema digestivo o a enfermedades como eczema, artritis reumatoidea, síndrome metabólico y diabetes, entre otras, llegando a favorecer el desarrollo de cáncer en determinados contextos. Se sugiere que factores solubles eventualmente producidos por los microbios podrían ser traslocados desde el intestino a la circulación general y activar las células del sistema inmune innato (Swidsinski et al., 2005; Schnabl et al., 2014).

La compleja relación bacteria-huésped, cuyas ventajas ya se han señalado, precisa de su perdurabilidad en un sitio alejado de los tejidos internos. Según se adelantare, cuando ello se

altera el sistema inmune afronta un exceso de antígenos bacterianos, se genera una respuesta inflamatoria deletérea, acaecen enfermedades intestinales inflamatorias y el intestino resulta más vulnerable a la acción de carcinógenos por disminución de los mecanismos anti-estrés oxidativo e inducción de la respuesta inflamatoria, lo que implica aumento de la proliferación celular y disminución de la apoptosis. La patogenia de estas enfermedades combina factores genéticos, ambientales, inmuno-reguladores y epiteliales (Velcich et al., 2002; Van der Sluis et al., 2006; Gkouskou et al., 2014).

A guisa de proceso preventivo, existe un sistema de control (dentro-fuera/in-out) a cuyo través el organismo censa las bacterias. Como contrapartida, ellas también llevan a cabo un monitoreo equivalente y “educan” al sistema inmune (Hoopert et al., 2012; Spasova et al., 2014).

### **1.1.2. La díada epitelio-secreciones reforzadoras**

---

La inmensa carga antigénica y bacteriana se halla apenas separada de todos los tejidos internos del organismo por un **epitelio de revestimiento** cilíndrico (o prismático) compuesto por una única hilera de células (simple), con medios unitivos de distinta naturaleza, algunos de los cuales (uniones ocluyentes) llegan a sellar el espacio intercelular (Gebert et al., 1991; Marchiando et al., 2011; Montaldo et al., 2014; Mestecky et al., 2015).

El epitelio intestinal posee tres barreras: físico-química, inmune-innata e inmune adaptativa que no sólo configuran una estructura flexible y dinámica, sino que limitan, sin total exclusión, el ingreso antigénico hacia los tejidos (Sansoneetti, 2004; MacDonald et al., 2005; Nakamura et al., 2018).

El epitelio media el “diálogo” entre exterior-interior y, además, traduce la presión ejercida por la microbiota comensal y los nutrientes en señales tolerogénicas transmitidas a las células inmuno-competentes subyacentes, de modo tal que cuando esta homeostasis se altera, sobrevienen enfermedades en las que prevalece la inflamación sin infección (asma, alergia digestiva, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, entre otras), en franco acrecentamiento en los países desarrollados (Kiyono et al., 2001; Wittig et al., 2003; Sansoneetti,

2004; Clayburgh et al., 2004; MacDonald et al., 2005; Brandtzaeg, 2011; Rescigno, 2011; Wittkopf et al., 2014).

Si ello se agrega a lo ya mencionado respecto de la morbi-mortalidad por causas infecciosas, válido es reiterar **la importancia de entender la integración de la barrera mucosa, sus mecanismos defensivos y las situaciones que la refuerzan o debilitan.**

El epitelio intestinal presenta distintas células con funciones diversas: enterocitos, caliciformes, enteroendócrinas y de Paneth. Éstas y las células inmunes son los mayores constituyentes del tubo (Wittkopf et al., 2014). Evidencian una renovación continua de 3 a 4 días, mantenida por la unidad proliferante, compuesta por una cripta o glándula de Lieberkühn única y las vellosidades adyacentes. Las células progenitoras, generatrices, madres, indiferenciadas o *stem cells* se ubican en la parte profunda de las criptas, aumentan y algunas se diferencian y maduran dando lugar a las cuatro líneas celulares mencionadas. A este respecto corresponde señalar que la condición de célula madre no depende de ella en sí sino del nicho que ocupa; esto es, del entorno que crean la membrana basal con sus proteínas constitutivas, varios tipos de células allí localizadas (telocitos, células inmunes) y filetes nerviosos (Díaz-Flores et al., 2014; Díaz-Flores et al., 2015; Leushacke et al., 2016). Cuando las células llegan al ápice de la vellosidad sobrellevan un proceso apoptótico al perder contacto con la matriz extracelular (“*anoikis*”), siendo finalmente eliminadas a la luz intestinal. Su homeostasis fisiológica es mantenida por apoptosis, autofagia y estrés del retículo endoplásmico. De ser esta dinámica biológica perturbada por causas genéticas, ambientales o por ambas, se crea el terreno ideal para la generación de distintas nosologías (Grossmann et al., 2001; Grossmann et al., 2002; Okamoto et al., 2004; Okamoto et al., 2005; Bullen et al., 2006; Goto et al., 2012).

En base a lo antedicho, puede sintetizarse que constituye una muralla físico-químico-inmunológica entre el microambiente luminal y los tejidos internos del huésped, y que establece, además, un nicho de cohabitación con las bacterias comensales y de protección ante la potencial agresión de patógenos (MacDonald et al., 2005; Kurashima et al., 2017; Senda et al., 2018).

Empero, y siendo por sí sola vulnerable a ésta, posee secreciones reforzadoras como el **mucus superficial**, secretado por las células caliciformes y que alcanza su mayor grosor (150

µm) en el colon y **productos secretorios de las células epiteliales** (alfa-defensinas que incluyen a las criptidinas, lisozimas y fosfolipasa A2) (Neutra et al., 2001; Ramiro-Puig et al., 2008).

El mucus protector, físicamente un gel, contiene mucinas que forman parte del sistema inmune innato y se hallan altamente conservadas durante el proceso evolutivo. Las mucinas constituyen una barrera de difusión que, a la par de entramarse y de atrapar la IgA secretoria, evitan la pérdida de las enzimas antibacterianas (Ermund et al., 2013).

En el colon humano, el mucus posee dos capas con propiedades diferentes: (a) una externa, más gruesa, que es fluida y fácilmente removible por peristalsis, y (b) otra, interna, más densa, con arreglo laminar, firmemente adherida al epitelio, difícilmente removible por peristalsis y carente de bacterias. Ambas capas presentan un constituyente dominante: la proteína MUC2, codificada por el gen homónimo, secretada por las células caliciformes, y más concentrada en la capa interna. Dotada de poros de menor diámetro, actúa a modo de barrera física impenetrable a la microflora, experimenta clivaje proteolítico, se transforma en un gel soluble y forma la capa laxa proveedora de un hábitat ideal para la microbiota comensal (Johansson et al., 2008). Por el contrario, en el intestino delgado, el mucus no está anclado de manera alguna al epitelio, siendo, por ende, fácilmente removible (Ermund et al., 2013).

En pacientes con colitis ulcerosa se ha registrado que la actividad de la inflamación mucosa se correlaciona significativamente con una disminución en la síntesis y secreción de la mucina MUC2, lo que implicaría que la barrera mucosa juega un papel central en el curso de la enfermedad. La pérdida de MUC2 establecería brechas en la barrera mucosa, permitiendo que bacterias y otros elementos del contenido luminal tomaran contacto con el epitelio, y, a su través, generaría inflamación, mayor proliferación celular y disminución de la diferenciación de las células epiteliales. Esto contribuiría a la perpetuación de la enfermedad con el consiguiente riesgo de evolución carcinogénica (Van der Sluis et al., 2006).

Las bacterias comensales y patógenas comparten MAMPs (patrones moleculares asociados a microbios) que reaccionan con receptores de membrana tipo Toll y con receptores citoplasmáticos de tipo NOD, promoviendo la secreción de citoquinas. Resulta procedente resaltar que el mantenimiento de un SIM alerta ante posibles infecciones, requiere de niveles leves o

fisiológicamente aceptables de señales estimuladoras. Tal mantenimiento exige que haya una separación física entre las bacterias comensales y el epitelio, y que opere una regulación negativa de las respuestas activas (tolerancia) (Jung et al., 2010). Puede afirmarse que en la mucosa existe una inflamación continua, aunque de bajo grado y en niveles considerados "fisiológicos", cuyo balance fino descansa en la capacidad de rechazar los patógenos y tolerar los antígenos alimentarios y la microbiota comensal (Neutra et al., 1996; Kiyono et al., 2001; MacDonald, 2003; MacDonald et al., 2011; Lelouard et al., 2012).

La tarea de muestrear el contenido luminal es llevada a cabo por el epitelio de revestimiento y las células dendríticas (Mestecky et al., 2015). Empero, en esta etapa son las células M las que cumplen un rol importante, ya que trasladan antígenos particulados predominantemente (Kanaya et al., 2020). Cabe señalar que los mecanismos de pasaje macromolecular utilizados son sensiblemente diferentes a los empleados para la absorción de nutrientes (Nicoletti, 2000; Neutra et al., 2001). Estas células epiteliales se hallan polarizadas y su compartimiento apical promueve la adherencia y captación macromolecular. Se postula que la naturaleza de la membrana luminal de las células M sería determinante en el proceso de transporte, permitiendo algún grado de selección de macromoléculas, las que de adherirse a la membrana son trasladadas 50 veces más eficientemente que las solubles no adherentes, como ferritina o albúmina sérica bovina (Neutra et al., 1987). Si bien la morfología de dichas células luce compatible con el traslado de partículas y microorganismos, en el ratón, al menos, la superficie ocupada por las células membranosas/resto epitelio tiene una relación 1/10.000, lo que, en contraste, indicaría un traspaso antigénico muy pequeño y controlado (Sansonetti et al., 1999).

Los territorios del tracto digestivo humano donde los antígenos son trasladados de manera controlada a fin de asegurar la producción de IgA y la estimulación y proliferación de células regulatorias/inhedoras, aunque ya citados, conviene repetirlos: placas de Peyer, apéndice cecal y folículos linfoides aislados de colon terminal y recto, primordialmente (Newberry et al., 2005; Jung et al., 2010; Spencer et al., 2018).

### 1.1.3. El sistema inmune mucoso

---

El SIM del sistema digestivo, constituye el mayor órgano inmune del ser humano, ya que en él se aloja el 80% de las células inmunes de la economía (Wittkopf et al., 2014).

A diferencia del SIP, se halla altamente compartimentado, las respuestas que genera son predominantemente de tolerancia y con un alto contenido de IgA. Ésta no sólo es muy resistente a la acción degradadora de las enzimas digestivas - en un medio que es muy rico en ellas – sino que no fija complemento, lo que evita la lisis celular. La IgA es producida continuamente por los plasmocitos de la lámina propia y trasladada por el epitelio hasta la luz donde permanece en la capa superficial del mucus. Allí se adhiere a los antígenos lumbinales y, reiterando lo oportunamente señalado, es eliminada por los movimientos peristálticos junto con los epitopes fijados (Mestecky et al., 2015).

El SIM, anatómicamente, se organiza en dos brazos: *los sitios inmuno-inductores* (SII) y *los sitios inmuno-efectores* (SIE).

Los SII son sitios muy restringidos, cuya principal función es alertar rápidamente sobre la presencia de patógenos y distinguirlos de otros agentes no lesivos. Estas áreas efectúan un monitoreo constante del contenido luminal, deviniendo verdaderos sensores inmunes del intestino (Jung et al., 2010; Da Silva et al., 2017) y realizan transporte controlado de antígenos, facilitando su captación, traslado, procesamiento, presentación e iniciación de la ulterior respuesta inmune. El GALT, porción específica del MALT<sup>3</sup> (Mucosal Associated Lymphoid Tissue - Tejido Linfático Asociado a las Mucosas -) se halla vinculado con los demás SIM (Cesta, 2006; Liebler-Tenorio et al., 2006; Brandtzaeg et al., 2008).

Por su parte, los SIE incluyen la lámina propia así como el estroma de las glándulas exócrinas y el epitelio de superficie (Brandtzaeg et al., 2004) y representan el lugar donde las células, tras extravasación, retención y diferenciación, neutralizan y eliminan antígenos o

---

<sup>3</sup> El MALT, que hace referencia a todas las superficies mucosas, constituye el mayor órgano linfático secundario del individuo, superando sus células a las halladas en todos los ganglios linfáticos y el bazo (Kiyono et al., 2001; Brandtzaeg et al., 2004; Brandtzaeg et al., 2008, Hermsen et al., 2009)

contribuyen a la formación de IgA (Mc Ghee et al., 1998; Brandtzaeg et al., 2008; Mestecky et al., 2015).

Ampliando lo antedicho acerca del GALT, puede decirse que es una característica universal de todos los vertebrados (MacDonald, 2003; Newberry, 2008), constituye ontogénicamente el primer órgano linfático secundario y su desarrollo depende de estímulos externos, diferenciándose en este aspecto de los órganos linfáticos primarios (Boehm et al., 2012). No se trata de un accidente de la evolución ni es un intruso en el tubo digestivo, sino parte integral del mismo (Owen et al., 1974). Una hipótesis sostiene que las bacterias desarrollaron un verdadero mutualismo con los vertebrados, que en virtud de tal interacción éstos aumentaron la capacidad metabólica y que paralelamente surgió el GALT como realizador de un manejo eficiente, aunque flexible, de la referida microbiota (Boehm, 2016).

Los SII-GALT evidencian similares caracteres morfológicos que los ganglios linfáticos. Así, se reconocen *folículos linfoides* (mayoritariamente LB, escasos LT), *áreas interfoliculares* (ricas en LT y células dendríticas) y sobre los folículos, el *domo* (con células dendríticas, macrófagos y linfocitos). Algo distintivo de los SII-GALT es la carencia de vasos linfáticos aferentes, pues los antígenos llegan directamente de la luz. Otra diferencia radica en que su cara luminal se halla revestida por un epitelio cilíndrico simple (FAE), con presencia de **células M** (membranosas) especializadas en el traslado de antígenos lumbinales a los linfocitos alojados en los bolsillos membranosos que ellas poseen (linfocitos intraepiteliales - LIEs) (Gebert et al., 1997a; Liebler-Tenorio et al., 2006; Ohno, 2016; Reboldi et al., 2016), asegurando así la íntima relación entre éste y el epitelio (Owen et al., 1974).

Estos sitios son colonizados por numerosas células linfoides, que arriban a través de las vénulas post-capilares. De allí se dirigen a las áreas T, a los folículos linfoides y al epitelio. Los linfocitos intraepiteliales, característica del revestimiento del tubo digestivo, son más abundantes a nivel del FAE que en el vellositario (Rowinsky et al., 1984). Participan de manera activa en las funciones inmunológicas del intestino y exhiben una particularidad, la de estar ubicados en las proximidades o en el interior del epitelio, experimentar transformación blástica y dividirse activamente y, además, abandonar el epitelio y acceder al conducto torácico (Marsh, 1975 a y b).

Una pequeña proporción de estas células es volcada a la luz, hecho antígeno-dependiente, donde colaboran con la defensa intraluminal. Allí se comportan como células viables, efectoras maduras, cumplen con un importante rol inmunológico y se disponen alrededor de bacterias englobadas en el mucus superficial (Owen et al., 1979; Heatley et al., 1982; Regoli et al., 1994).

Los linfocitos intraepiteliales son notoriamente muy frecuentes en los sitios inmunoaductores del tubo digestivo, dos de ellos motivo de esta tesis. En tales lugares, se agrupan (en el conejo, alojan 10 células linfocitarias en promedio) y ocupan todos los niveles del epitelio (Rowinsky et al., 1984). Esta colonización del FAE respondería a la porosidad de la membrana basal que aumenta, de manera centrífuga, desde el ápice a la periferia del FAE (McClugage, et al., 1986). De esta manera, los linfocitos se concentran garantizando, así, su posible contacto con el contenido luminal, previamente trasladado por las células M.

Una vez que las células inmunes contactan con los antígenos lumbinales, se dirigen por vía linfática a los ganglios linfáticos regionales donde experimentan expansión clonal, drenan por los linfáticos eferentes y son volcadas a la circulación general por el conducto torácico. Sin embargo, no se distribuyen difusamente por el organismo, sino que se ciñen a colonizar, predominantemente: la lámina propia del tracto digestivo (SIE), las glándulas salivales y glándula mamaria, fenómeno que se conoce como re-circulación linfocitaria o "*homing*" (Acton et al., 2016; Betterman et al., 2016; Reboldi et al., 2016).

Si bien ningún componente del trípode homeostático adquiere singular prevalencia, el epitelio ocupa, empero, un sitio destacado desde que se ubica en la interface entre las bacterias y alimentos lumbinales y las células del SIM, alojadas en el interior del organismo (Goto et al., 2012). Cuando este sistema intrincado sufre disrupciones sobrevienen patologías, como fuera mencionado anteriormente (Wittkopf et al., 2014; Goll et al., 2015).

### **1.2. EL CONEJO: MORFOFISIOLOGÍA DE SU TUBO DIGESTIVO**

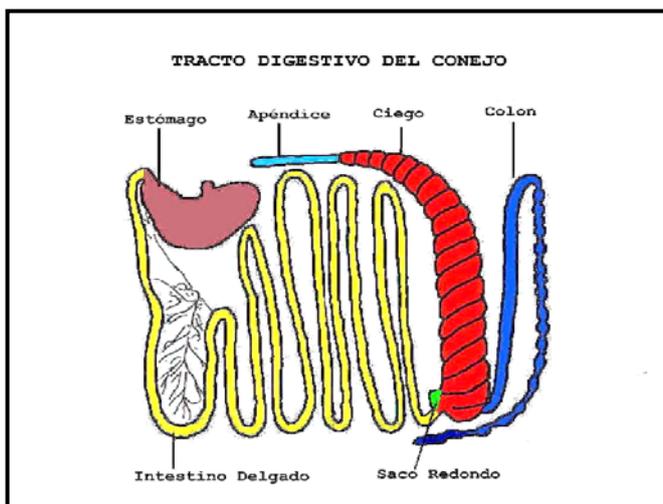
---

---

El conejo es herbívoro estricto, se lo clasifica como fermentador y selector de concentrado y, en tanto animal de presa, mantiene un pequeño tamaño corporal (Kohles, 2014). **Dado que**

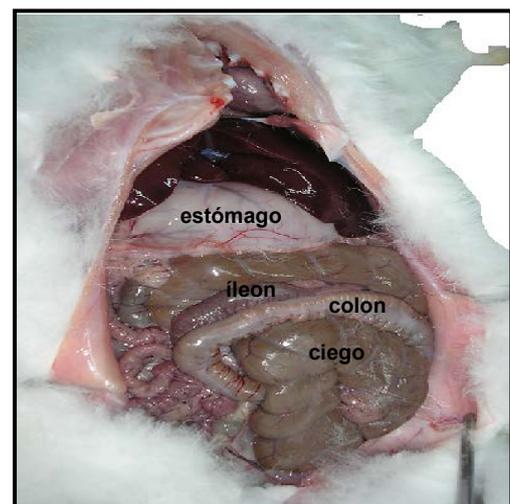
*guarda filogenéticamente mayor relación con primates que los roedores, ofrece ventajas como animal experimental por sus similitudes anatomofisiológicas con el ser humano y resulta modelo útil para determinadas enfermedades que lo afectan* (Schnupf et al., 2012; Haines et al., 2017).

Anatómicamente, su tubo digestivo sigue parecida secuencia: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno – el sector más largo y contorneado - e íleon), ciego con apéndice, colon, recto y ano. Existen, no obstante, dos zonas diferenciales a destacar: *el saco redondo* y la *placa cecal*. Además, corresponde reseñar que, en los lagomorfos, orden al que pertenece el conejo, el ciego es un órgano extenso y de estructura espiral con 18-22 haustras (Figura y Foto 1) (Snipes, 1978; Beyaz et al., 2010).



**Figura 1**

Esquema de tracto digestivo de conejo



**Foto 1**

Cavidad abdominal cunicular abierta

El GALT en el conejo se halla más desarrollado que en otros mamíferos (Cesta, 2006). Asimismo, interesa subrayar que en dicho tubo se identifican cuatro SII mayores: las placas de Peyer, el saco redondo (tonsila o amígdala ileal), la placa cecal y el apéndice (Haley, 2003).

***Esta tesis se focaliza particularmente en dos de ellos: apéndice cecal y placa de Peyer (íleon terminal).***

**Las placas de Peyer**, en número de 5 a 11 y ubicadas en yeyuno e íleon, se distribuyen de manera bastante regular (Azzali, 2000; Beyaz et al., 2010). Exhiben forma elipsoide y hacen

protrusión hacia la vertiente anti-mesentérica. Estas estructuras experimentan un desarrollo notorio luego del nacimiento, especialmente cuando aumentan las bacterias luminales (Makala et al., 2002).

**El saco redondo** es un agrandamiento en forma de bulbo, exclusivo de los conejos. Representa la desembocadura cupuliforme del íleon a nivel del ciego, lo que ocurre a nivel del primer haustra y conforma la vertiente ileal de la válvula íleo-cecal. A su vez, **la placa cecal**, de forma combada, es la vertiente homónima de dicha válvula en el segmento inicial del ciego y se localiza por encima del orificio de desembocadura del íleon (Snipes, 1978; Johnson-Delaney, 2006).

**El apéndice**, ligado al extremo distal del ciego, adopta forma diverticular sin la dilatación característica de este último y aloja gran cantidad de formaciones linfoides, la mayor en el tubo digestivo (Valdivia Anda et al., 2007). Posee una longitud aproximada de 9 cm, similar al apéndice cecal humano, aunque el tamaño corporal de estas especies sea sustancialmente diferente (Dasso et al., 2000).

Histológicamente, **la placa de Peyer** exhibe la disposición en cuatro tunicas, típicas del tracto digestivo. Su mucosa, por pertenecer al intestino delgado, muestra vellosidades altas y delgadas y en la lámina propia pueden visualizarse folículos linfoides con centros germinales conspicuos, rodeados por una corona linfocitaria, y por sobre ellos: el sector del domo. Tanto el domo como el folículo, protruyen hacia la luz y están revestidos por el **FAE**, donde se localizan las **células M**. Las áreas interfoliculares coinciden con las criptas y alojan vénulas de endotelio alto (Cesta, 2006; Beyaz et al., 2010).

Toca aquí hacer mención a la vascularización linfática y sanguínea de las placas.

En la primera, los vasos linfáticos lácteos centrales de la vellosidad desembocan en un plexo linfático subepitelial de la mucosa que circunda el domo. Éste drena en una red perifolicular a través de vasos rectos y cortos, y finalmente, desemboca en senos linfáticos ubicados en la base de los folículos (Azzali, 2000; Ohtani et al., 2008). Los capilares linfáticos, principalmente los del plexo perifolicular, carecen de lámina basal continua y tienen fenestraciones lo que permite la introducción de linfocitos a la circulación linfática vía la formación de canales intraendoteliales.

Esto permitiría que las células inmunes abandonen las placas de Peyer y se dirijan a los ganglios mesentéricos o a la circulación general. Menester es destacar que tanto los centros germinales como el domo carecen de capilares linfáticos. En cuanto a la circulación sanguínea, los vasos acompañan en general a los linfáticos mencionados, aunque existen algunas diferencias. Las arteriolas de la submucosa llegan a la túnica mucosa, envían ramas que se capilarizan y se dirigen a los folículos, región cómica y vellosidades. La sangre es colectada por vénulas que, a nivel del área interfolicular, configuran las precitadas vénulas de endotelio alto, donde los linfocitos abandonan la circulación para colonizar las placas (Azzali, 2000).

**La placa cecal**, revela al microscopio óptico folículos, cuyo FAE se halla en contacto directo con la luz. A los lados de los folículos se reconocen protrusiones cortas y digitiformes de la mucosa. Al microscopio electrónico de barrido, pone de relieve montículos (domos) rodeados de salientes (crestas), adoptando el aspecto de un mosaico ordenado (Snipes, 1978).

**El apéndice**, muestra al microscopio óptico grandes folículos linfoides elongados con domos suprayacentes y que, en conjunto, delimitan una sobreelevación cónica (Dasso et al., 2000, Valdivia Anda et al., 2007). Se hallan revestidos por un FAE, con numerosas células M, el que, a diferencia de lo que ocurre en la placa cecal, se relaciona con el contenido luminal sólo a través de los pequeños poros que dejan entre sí extensiones de la mucosa denominadas vellosidades fungiformes (mushroom villi - VIM) por su similitud con las setas (Snipes, 1978, Pospisil et al., 1998a). Al microscopio electrónico de barrido, los domos lucen como protrusiones coniformes visibles a través de un pequeño espacio o poro que delimitan las precitadas vellosidades (Snipes, 1978).

**El saco redondo** se asemeja mucho al apéndice cecal, con la exclusiva diferencia de tener la túnica muscularis mucosae más desarrollada que la apendicular (Snipes, 1978).

En todos estos órganos han sido reportados macrófagos, linfocitos y eosinófilos en distintas capas contiguas al FAE (Cesta, 2006; Beyaz et al., 2010).

Fisiológicamente, y en general, el tránsito por los órganos digestivos es rápido, lo que mantiene liviano al animal. Este hecho es fundamental si se tiene en cuenta que el conejo es animal de presa; esto es, pasible de ser atrapado por un depredador. El alimento, apenas triturado

en la boca, transita luego por los sucesivos sectores del tracto digestivo. Cabe destacar entre ellos a un muy desarrollado ciego donde, a la manera de una cuba de fermentación (similar al rumen de los rumiantes), gran cantidad de especies bacterianas realizan la digestión enzimática de la ingesta. Desde el ciego, parte del contenido se dirige al apéndice cecal y parte, hacia colon-recto, para ser finalmente eliminado por el ano. Si ello ocurre durante las primeras horas de la mañana, se producen heces blandas (o cecotrofos) que el animal vuelve a ingerir, reiniciando el ciclo digestivo. Si, por el contrario, la eliminación de heces acontece durante la tarde, se forman heces duras, eliminadas como verdaderos desechos (Gecele, 1986).

***De lo reseñado resulta particularmente significativo para el presente trabajo las semejanzas histológicas entre placa de Peyer y placa cecal, así como las habidas entre saco redondo y apéndice cecal, de preeminencia para su selección.***

### **1.3. EL FAE Y LAS CÉLULAS M CUNICULARES**

---

---

#### **1.3.1. Hitos diacrónicos**

---

El carácter de este emprendimiento torna atinente evocar determinados hitos claves diacrónicos referidos al FAE, las células M y los LIEs.

Así, desde que el anatomista suizo, Johann Conrad Peyer, describiera en el intestino humano las placas que hoy llevan su nombre (Peyer, 1677), transcurrieron más de dos siglos hasta que Kenzaburo Kumagai, mientras estudiaba en Osaka (Japón) el traslado de *Mycobacterium tuberculosis* y de glóbulos rojos de carnero a través del epitelio de revestimiento de dichas placas y del apéndice cecal de conejo, observó que tal material particulado era transportado por algunas células epiteliales, actualmente denominadas células M (Kumagai, 1922).

Dos décadas más tarde, Edward Crabb y Margaret Kelsall reportaron migración de linfocitos a través del epitelio en el apéndice de conejo y por ello, lo designaron "linfoepitelio" (Crabb et al., 1940).

Con posterioridad, JB Enticknap describió que en el apéndice cunicular existían células epiteliales modificadas conformando nidos de linfocitos de tamaño mediano y grande. Por debajo de estos nidos, en el subepitelio, halló abundantes macrófagos, con bacterias y restos celulares fagocitados en sus citoplasmas (Enticknap, 1953).

En la década del 60, John Schmedtje describió las características histoquímicas del FAE de apéndice cecal de conejos y concluyó que los linfocitos migraban al epitelio y retornaban al subepitelio. Estos linfocitos se ubicaban en vacuolas con escasa fosfatasa alcalina (Schmedtje, 1965; Schmedtje, 1966). Simultáneamente, fueron detectadas en la misma localización cunicular abundantes bacterias Gram (+) y PAS (+) que habían sido fagocitadas por células epiteliales del FAE y por abundantes macrófagos subepiteliales. Dado que estos gérmenes eran idénticos a los lumbinales, fue hipotetizada su procedencia desde la luz, su paso a través del epitelio y su fagocitosis a cargo de los macrófagos del domo. A medida que estos fagocitos mononucleares se internalizaban en la pared, digerían los gérmenes (indudablemente provenientes del lumen) y perdían sus caracteres morfológicos o tintoriales, indicando la destrucción de dichos elementos. Corresponde agregar a este respecto que la fagocitosis de las bacterias coincidía con la aparición de centros germinales y con la diferenciación plasmocítica de los linfocitos (Friedenstein et al, 1965).

Hacia esos años, fue comunicada la existencia de nidos de 2 a 10 linfocitos grandes (linfoblastos) en el FAE apendicular, que deformaban las células que, a su vez, mostraban bacterias fagocitadas. Los gérmenes fueron hallados, asimismo, en agregados de macrófagos, con citoplasmas acidófilos (Shimizu et al, 1967).

En la década del 70, fue efectuada la descripción ultraestructural de las células M en humanos y postulada su denominación actual en virtud de los múltiples micropliegues de su membrana apical (Owen et al., 1974).

Desde entonces, el interés por estas células no ha cesado, sobre todo en la actualidad cuando se intenta emplearlas como vía de entrada de vacunas y de antígenos en enfermedades autoinmunes.

### 1.3.2. EI FAE

---

El FAE constituye una estructura dinámica y puede caracterizarse como un revestimiento epitelial simple cilíndrico, que tapiza la cara convexa de los domos. Exhibe fundamentalmente enterocitos y células M ya que las células caliciformes (con excepción del ciego) y las enteroendócrinas son inexistentes en la práctica. Sus células se hallan muy próximas, existe un escaso intersticio entre ellas y evidencian una tendencia a crecer más en área que en volumen, cubriendo superficies (Blehschmidt, 2004). Sobre el epitelio, a modo de pátina, se identifica una capa de mucus, más delgada que en otras localizaciones, que facilita el acceso desde el contenido luminal hacia el epitelio (Ermak et al., 1994). Estudiado en varios modelos animales, se ha visto que alrededor de 30 criptas aportan células para revestir una superficie amplia como la del domo (Bhalla et al., 1982; Smith et al., 1992). La renovación de sus células en el intestino delgado de conejos adultos ha sido estimada en 5-6 días (Takeuchi et al., 2004).

Diacrónicamente, ha sido analizado en ratones transferidos desde un medio libre de flora patógena hacia otro convencional (Smith et al., 1987), infectados oralmente luego de haber permanecido en un medio libre de gérmenes (Savidge et al., 1991), trasplantando animales con inmunodeficiencia severa combinada con células madres medulares (Sharma et al., 1998) y empleando ratones knock-out deficientes en el receptor para la citocina 6 (Westphal et al., 2008).

En ratas, se ha inducido ileítis mediante administración endovenosa de indometacina (Kucharzik et al., 2000a; Kucharzik et al., 2000b).

Finalmente, en conejos el FAE sólo ha sido indagado tras la administración parenteral de dexametasona (Roy et al., 1992) o exponiéndolos, durante corto lapso y con la técnica del asa intestinal aislada, a *Streptococcus pneumoniae* (Borghesi et al., 1996; Borghesi et al., 1999).

### 1.3.3 Las células M

---

El mantenimiento de la inmuno-homeostasis en el tracto digestivo requiere monitorear el contenido luminal y permitir el paso de pequeñas cantidades de éste a través de la barrera epitelial a fin de tomar contacto ulterior con el tejido linfoide subyacente. En tal tarea, intervienen

mínimamente tres tipos celulares: (a) las células dendríticas cuyas prolongaciones se proyectan entre las células epiteliales cilíndricas (Rescigno, 2001), (b) las células caliciformes que establecen canales habilitando el pasaje directo de antígenos a las células dendríticas CD103+ (McDole et al., 2012) y (c) las células M, tema central de esta tesis.

***Resulta remarcable respecto de estas últimas que: (a) el conejo posee abundancia de ellas en el FAE (40-50%), a diferencia de los murinos y del ser humano que apenas exhiben allí un 4% (Pappo et al., 1989; Ermak et al., 1994), y (b) no sólo participan actualmente como vía de acceso de vacunas orales sino que se las desea utilizar para la administración de antígenos en enfermedades autoinmunes.***

Puede decirse que, con la barrera mucosa intacta, las células M representan la estructura más destacada para el pasaje de macromoléculas y microorganismos (Kucharzik et al., 2000b).

Lejos de ser presentadoras de antígenos, constituyen agentes neutros que captan y facilitan el traslado macromolecular. Resultan sumamente curiosas pues, aunque epiteliales, cilíndricas y polarizadas, llevan a cabo actividades singulares.

De ese modo, su fenotipo, especializado en tal traslado, las habilita entonces a endocitar y transportar selectivamente antígenos luminales, principalmente particulados. Éstos, rodeados por membrana, soslayan así el ataque lisosomal, mantienen inalterados sus epitotes y son finalmente exocitados en el espacio intercelular donde las células inmunocompetentes inician la pertinente respuesta inmune (Owen et al., 1986; Makala et al., 2002; Newberry et al., 2005; Erickson et al., 2009).

Ultraestructuralmente, revelan pliegues cortos e irregulares en su membrana apical, un glucocáliz delgado y escaso mucus superficial (Shimizu et al., 1967; Bockman et al., 1973; Owen et al., 1974; Smith et al., 1980; Bhalla et al., 1982; Bye et al., 1984; Owen et al., 1986). Presentan disminución de las enzimas digestivas y carecen del receptor poligénico para la IgA (Bye et al., 1984). La porción citoplasmática próxima a la luz, exhibe abundantes vesículas endocíticas y pinocíticas (Bockman et al., 1973). Sus plegadas membranas látero-basales conforman bolsillos que alojan LIEs, de variado tamaño y capaces de proliferar, con los que interactúan (Davis et al., 1997; Owen et al., 1999; Kucharzik et al., 2000a; Miller et al., 2007). Los LIEs, localizados entre

las vesículas y el núcleo celular, son en general de tamaño mediano o grande (linfoblastos y plasmablastos), se ubican en cercanías de los antígenos luminales y se hallan separados del SIP (Enticknap et al., 1953; Shimizu et al., 1967; Bockman et al., 1973; Owen et al., 1974; Bhalla et al., 1982; Bye et al., 1984; Owen et al., 1986; Ramiro-Puig et al., 2008).

Más aún, la prominencia de algunos organoides (RER, aparato de Golgi, mitocondrias), las uniones intercelulares con las células vecinas (uniones ocluyentes y adherentes) y su morfología nuclear hablan de una célula bien diferenciada mientras que la precitada abundancia de vesículas, así como la ausencia de red terminal lucen compatibles con su función transportadora (Owen et al., 1974).

Su conocimiento ultraestructural permite precisar que el contenido transportado, antes de su exocitosis en el espacio intercelular, transcurre por los bolsillos con células inmuno-competentes. Este recorrido acorta notoriamente la transcitosis (Dillon et al., 2019).

Todo este transporte se efectúa de manera controlada puesto que su masiva concreción podría ser deletérea. Quizá resida en ello la presencia de escasas células M y en sitios anatómicos muy específicos (Lelouard, 1999).

Morfológicamente, han sido descritos dos tipos de células M: (a) las inmaduras que carecen de bolsillos con linfocitos y (b) las maduras con grandes pliegues membranosos que albergan grupos de células inmunocompetentes (Bye et al., 1984). No obstante, una publicación reciente identifica tres subtipos de células M. El primero de ellos incluye a las comúnmente descritas, son designadas canónicas, básicas o constitutivas, se hallan asociadas a tejido linfoide organizado y la distribución regular y uniforme del FAE posibilitaría una captura eficiente de micropartículas por parte de ellas. El segundo, caracterizado en animales de experimentación desafiados con toxina colérica, alberga las denominadas M transdiferenciadas, localizadas en los ápices de las vellosidades y dispuestas agrupadamente. Dado que carecen de tejido linfático subyacente, si bien se supone que captan elementos se duda acerca de su capacidad para trasladarlos. El tercer subtipo lo integran las llamadas inducibles, relacionadas con tejido linfoide terciario desorganizado y surgidas luego de la estimulación por citoquinas como TNF- $\alpha$  y linfoxina. No se trata de células

totalmente maduras y se conjetura que podrían trasladar el contenido luminal de manera excesiva incrementando así el estado inflamatorio (Dillon et al., 2019).

Desde un punto de vista enzimático, y a diferencia de los enterocitos absorbentes, revelan menor grado de actividad de ATPasa, peroxidasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina o directamente carecen de la misma (Smith et al., 1980; Sneller et al., 1986; Marchetti et al., 2004).

Asimismo, cabe agregar que la membrana apical de estas células se halla dotada de una variedad de moléculas glucosídicas que le posibilitan interactuar con el contenido luminal y facilitar el traslado antigénico, dado que las partículas adherentes se transportan más eficientemente (Neutra et al., 1999).

Bien podría afirmarse que muestran un diseño de ingeniería sumamente inteligente ya que la carencia de microvellosidades propiamente dichas disminuye los residuos glucosídicos ligados al glucocáliz (ácidos siálico, aspártico y glutámico, entre los salientes) así como los correspondientes grupos aniónicos superficiales (Mutsaers et al., 1996). Ello implica el decremento de fuerzas electrostáticas negativas de repulsión y allana el acercamiento, adhesión y endocitosis de las partículas. En suma, las células M serían una suerte de aspiradora captadora de partículas repelidas por los enterocitos, cargados electronegativamente, lo que podría dar cuenta acerca de su amplia habilidad para atraer antígenos luminales (Bennett et al., 2014).

Los susodichos residuos glucosídicos, con variaciones entre especies y aún entre diferentes localizaciones anatómicas del tracto digestivo dentro de un mismo animal, son detectables mediante el empleo de distintas lectinas (proteínas de origen vegetal) y actúan como receptores de las adhesinas macromoleculares (Clark et al., 1993; Giannasca et al., 1994; Neutra, 1998).

La composición glucosídica del FAE de conejo ha sido estudiada en todos o en algunos de sus mayores GALTs mediante una amplia gama de lectinas vegetales, hallándose diferencias entre la glucosidación de células M y la de los enterocitos. Así, determinados investigadores reportaron expresión de WGA (Wheat germ agglutinin) y de PNA (Peanut agglutinin) en las células M de ciego y expresión de las mismas en enterocitos de las placas de Peyer (Jepson et al., 1993). Por su parte, otros informaron expresión diferencial de UEA-1 (*Ulex europaeus* agglutinin type 1), DBA (*Dolichos Biflorus* agglutinin) y WGA entre células M y enterocitos de apéndice cecal de

conejos, y tinción no uniforme de éstas en placas de Peyer lo que impidió la diferenciación de las poblaciones epiteliales del FAE (Gebert et al., 1993).

Sobre este particular, corresponde agregar que las lectinas no han resultado marcadores fidedignos de células M en conejo como sí lo ha sido la Vimentina (Gebert et al., 1992; Jepson et al., 1992; Gebert et al., 1997b).

En suma, conocer la diferente composición de la membrana apical de las células M podría explicar por qué algunos gérmenes, toxinas y priones se unen a ellas y explotan esta vía para infectar el organismo. Además, según se dijera ya, proveería información para el empleo de vacunas y de antígenos en enfermedades autoinmunes. ***Por consiguiente, dable es indagar los patrones de glicosilación en las variadas poblaciones celulares epiteliales de ambos sitios inmuno-inductores del tracto digestivo cunicular y sus eventuales cambios.***

Puede agregarse que los primeros estudios en conejos sobre células M fueron llevados a cabo en el FAE del apéndice cecal, donde se evidenció incorporación de gran cantidad de bacterias. En este animal, también fueron individualizados numerosos macrófagos en el subepitelio del domo y en muchos casos, presencia predominante de bacilos Gram (+). Cabe hacer notar que las características tintoriales se perdían en el citoplasma de los macrófagos ubicados en la profundidad de la pared, a modo de índice de captación superficial de gérmenes y destrucción de los mismos según se internalizaban en el espesor parietal (Enticknap, 1953; Friedenstein et al., 1965; Shimizu et al., 1967).

***Otra interesante área de investigación sobre estas células reside en su origen y posterior eliminación ya que ambas continúan siendo controvertidas tanto en modelos murinos como en conejo.*** Así como algunos autores sostienen su diferenciación a partir de enterocitos maduros, por contacto con células inmunes o mediadores solubles (Smith et al., 1980; Bhalla et al., 1982; Savidge et al., 1991; Smith et al., 1992; Kernéis et al., 1997), otros postulan su origen en el fondo del domo, a nivel de las criptas (sector de las células inmaduras o proliferativo), y su diferenciación definitiva según ascienden hacia el ápex (Bye et al., 1984; Roy 1987; Gebert, 1992; Jepson et al., 1993; Gebert et al., 1997b; Gebert et al., 1999).

Asimismo, determinados investigadores han comenzado a escrutar los caminos moleculares de su diferenciación (Kanaya et al., 2014; Kimura et al., 2015).

Finalmente, el muestreo antigénico, además de hacerse en las células M, es llevado a cabo por las células dendríticas subepiteliales, cuyas prolongaciones, tras introducirse entre los enterocitos, interactúan con el contenido luminal. De tal modo, los antígenos alcanzarían la lámina propia y serían trasladados hasta los ganglios linfáticos mesentéricos regionales, sin ingresar a la circulación general ni recircular, generando así una compartimentación por la que el SIP ignoraría los antígenos provenientes de la microbiota (Macpherson et al., 2005).

Excediendo la compartimentación del SIM y su aislamiento del SIP, de acuerdo con lo oportunamente referido, a la fecha se especula que ambos no serían totalmente independientes sino que intercambiarían información y que sus células, recirculando entre ellos, harían que lo acontecido en uno termine influenciando al otro. Más aún, se ha reportado recientemente interacción entre la microbiota y el SIP (Shi et al., 2017).

## **1.4. OTRAS CÉLULAS A CONSIDERAR**

---

### **1.4.1. Leucocitos polimorfonucleares eosinófilos**

---

Los eosinófilos, surgidos evolutivamente en los vertebrados antes del desarrollo de la inmunidad adaptativa, constituyen células efectoras maduras, especializadas y originadas en la médula ósea a partir de *stem cells* multipotenciales hemocitopoyéticas (McGarry, 2013; Chu et al., 2014; Travers et al., 2015).

Desde allí y tras una corta estancia en sangre periférica, colonizan otros órganos como tubo digestivo, timo, ganglios linfáticos, bazo, glándula mamaria y útero. Resulta destacable la localización en la mucosa digestiva, el mayor reservorio de eosinófilos del organismo, debido a la expresión constitutiva de la interleuquina 5 y de la citosina CCL11 (ex eotaxina-1) reconocida por el receptor CCR3 eosinofílico (Blanchard et al., 2009; Mowat et al., 2010).

Tradicionalmente asociados con infecciones parasitarias y reacciones alérgicas en general. Particularmente en el sistema digestivo se hallan incrementados no sólo en dichas ocasiones

(reacción alérgica a medicamentos, infecciones helmínticas) sino en síndromes hipereosinofílicos, gastroenteritis y esofagitis eosinofílica, reflujo gastroesofágico y enfermedad inflamatoria intestinal (Rothenberg et al., 2006).

Al margen de lo antedicho, son actualmente valorados como células pleitrópicas multifuncionales, moduladoras de la inmunidad innata y adaptativa con un perfil de citocinas tipo TH<sub>2</sub> (T Helper 2) y que comparten el mismo nicho con macrófagos y plasmocitos en proximidades del epitelio superficial (Rothenberg et al., 2006; Chu et al., 2014; Mestecky et al., 2015). En baja cantidad, colaboran, sin dominar necesariamente, en todas las fases de la respuesta inmune: iniciación/ polarización, fase efectora y reparación/ regeneración; vale decir, que no sólo intervienen en la respuesta inmune sino que, asimismo, contribuyen en la homeostasis tisular y el reforzamiento de la barrera epitelial. Además, participan en la proliferación celular, depuran los cuerpos apoptóticos con los macrófagos, a los que mantienen en estado refractario respecto de su rol en la inflamación. Al culminar este último proceso, inducen angiogénesis y fibrosis (Travers et al., 2015). Finalmente, secretan gran cantidad de mediadores y citocinas preformadas participantes en la inflamación, lo que determina su aumento tisular y su mayor o menor sobrevida (Rosenberg et al., 2013).

Su relevancia en el conejo puede inferirse de trabajos preliminares al respecto realizados en sectores de su tubo digestivo (ciego, íleon y recto) ante inducción de reacciones de hipersensibilidad (Bassan et al., 1998, 1999; Roma et al., 2004).

### **1.4.2. Macrófagos**

---

En los mamíferos en general, los macrófagos son células fagocíticas profesionales pertenecientes a la inmunidad innata del organismo y constituyen la primera línea de defensa contra sus posibles agresores. Nacen de unidades formadoras de colonias mielo-monocíticas las que, localizadas en la médula ósea y tras una serie de precursores, originan los monocitos. Éstos circulan en sangre, aproximadamente durante 72 hs y migran a los tejidos en respuesta a sustancias quimioattractantes, a citoquinas inflamatorias o productos bacterianos (Bain et al.,

2014). Colonizan así diferentes órganos donde maduran; vale decir, aumentan de tamaño, sintetizan mayor cantidad de enzimas líticas e incrementan el número y volumen de las mitocondrias (Mestecky et al, 2015).

La mucosa del tracto digestivo es el mayor reservorio de macrófagos del organismo. En ella, los monocitos recientemente reclutados, se alojan en la lámina propia e inician su proceso madurativo, que consiste en adaptarse a un medio anatómico único, rico tanto en antígenos alimentarios como vinculados a una inmensa flora comensal (Gross et al., 2014).

Estimulados por factores epiteliales y estromales, principalmente mastocitos, adquieren, después de 5 a 7 días aproximadamente, un fenotipo refractario a la inflamación. No obstante, conservan su actividad fagocítica con amplia función citotóxica y sin liberación de factores pro-inflamatorios, los que podrían ser deletéreos en un medio con alta carga antigénica. Esta anergia funcional resulta de la coevolución del sistema inmune local con la microbiota del intestino (Weber et al., 2009; Zigmond et al., 2013).

En concordancia con estas funciones se hallan estratégicamente ubicados por debajo del epitelio o en el domo de los GALTs, fagocitando las bacterias comensales que lo atraviesan y protegiendo la llegada de gérmenes patógenos al interior del organismo del anfitrión (Smythies et al., 2005; Platt et al., 2008; Weber et al, 2009).

Asimismo, intervienen en la homeostasis tisular mediante la fagocitosis de células apoptóticas, senescentes o alteradas y colaboran en la remodelación tisular y la reparación (Schenk et al., 2007; Joeris et al., 2017)<sup>4</sup>.

Además, ha sido comprobado que integran el nicho de las stem cells criptales, actuando como transceptores que coordinan la información de los microbios lumbinales y del epitelio y

---

<sup>4</sup> Los folículos linfoides de apéndice cecal y de placa de Peyer son sitios donde proliferan los linfocitos. Se sabe que la mayoría de ellos, los que no han madurado adecuadamente, mueren por apoptosis. Sabido es que, ante la ausencia de células fagocíticas de estos cuerpos apoptóticos, la placa de Peyer podría doblar su tamaño en 12-14 hs. Más aún, la presencia de estos detritos por tiempo prolongado estimularía la liberación de factores pro-inflamatorios en el espacio extracelular y ello sería perjudicial para las células vecinas. Por último, pero no por eso menos importante, la persistencia de cuerpos apoptóticos pueden exponer epitopes que normalmente están encriptados. Esto rompería la inmuno-tolerancia y desencadenaría enfermedades autoinmunes. De allí que en apéndice cecal y en placas de Peyer, a pesar de ser un microambiente rico en antígenos y bacterias, preñado de macrófagos, haya escasos signos de inflamación (Bhagal et al., 2004).

transmiten señales proliferativas y regenerativas a las células madres. Por lo tanto, puede decirse que colaboran en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial (Pull et al., 2005).

La mayoría de los trabajos precedentes aluden a macrófagos intestinales de la lámina propia de áreas inmuno-efectoras. Pocos han sido focalizados en sitios inmuno-inductores, como las placas de Peyer murinas, donde los fagocitos mononucleares se ubican en el domo y las áreas T (Iwasaki et al., 2000).

De modo pionero en conejos, Enticknap (1953) se refirió a los macrófagos del apéndice cecal como células halladas mayormente en el domo y en el sector basal de los folículos, donde lucían agregados y contenían inclusiones citoplasmáticas y bacterias ingeridas con similitudes tintoriales a las detectadas en la luz. Eso llevó a tal autor a sugerir el origen luminal del material fagocitado.

Muy recientemente, ha sido reportada, con el uso de un marcador específico para conejo, la localización y distribución de macrófagos intestinales en tres de sus GALTs mayores: placas de Peyer, saco redondo y apéndice (Beyaz et al., 2017).

***En consecuencia y entre otros, se intenta aquí sumar aportes histológicos sobre eosinófilos y macrófagos, de singular importancia según lo reseñado, en dos de los GALTs mayores del tracto digestivo de conejos expuestos a inmunización parenteral.***

## 1.5. PROCESOS CELULARES DE INTERÉS

---

### 1.5.1. Apoptosis

---

La apoptosis (del gr apoptosis: caída), palabra introducida por Kerr en 1972, es un proceso que acompaña la atrofia y la involución fisiológica de tejidos, órganos y vestigios embriológicos filogenéticos, falta de estimulación hormonal, tumores y tratamiento de neoplasias, entre otros (Kerr et al., 1972). Pese a que Glücksmann en 1951 hablaba ya de ello en lo atinente al desarrollo ontológico de los mamíferos, resultaba imposible entonces aceptar que un embrión pudiera contener células muertas.

Morfológicamente, este proceso comprende la compactación del núcleo y del citoplasma, con fragmentación de la cromatina y formación de protuberancias o bullas en la superficie celular, que, luego, se separarán formando los cuerpos apoptóticos. Estos últimos son las mayores vesículas extracelulares descubiertas hasta el presente; contienen organoides compactados, no degenerados y con actividad morfológica, aunque en un futuro estarán destinados a la destrucción (Mills et al., 1999; Van Cruchten et al., 2002; Charras, 2007).

Considerada económica en términos de re-utilización de los componentes celulares, permite regular el número de células y generar, al eliminarse éstas, una leve disrupción tisular. A su vez, la fragmentación en pequeños cuerpos apoptóticos favorece la eliminación y fagocitosis, a cargo de varias células, pero con predominancia de los macrófagos (Kerr et al., 1972).

En consecuencia, la apoptosis es un mecanismo que regula la homeostasis fisiológica tisular, posibilita la depuración de restos celulares y media el transporte de biomoléculas facilitadoras de la comunicación intercelular (Atkin-Smith et al., 2017).

Empero, las células epiteliales que revisten cavidades mucosas no son fagocitadas al morir por apoptosis sino extruidas a la luz. La brecha por ellas originadas obliga a cinco o seis células vecinas a cubrir ese espacio transitorio a fin de mantener intacta la monocapa (Potten et al., 1977). En la pyroptosis (apoptosis inflamatoria) en ratones, fue detectado compromiso en la integridad epitelial con la consiguiente mayor permeabilidad a micropartículas y macromoléculas (Liu et al., 2013).

Resulta relevante poner el acento en este proceso celular pues en las enfermedades autoinmunes se halla afectado el aclaramiento de cuerpos apoptóticos, permaneciendo éstos por mucho tiempo sin fagocitar. De esta manera, se desencadenan y perpetúan el proceso inflamatorio y los fenómenos de autoinmunidad (Trahtemberg et al., 2017). Por su parte, en enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa, fue registrada mayor actividad apoptótica con aumento del lapso durante el que las brechas permanecen sin cerrar. Ello podría acarrear incremento de la translocación del contenido luminal y permanencia del estado inflamatorio (Kiesslich et al., 2007; Seidelin et al., 2009).

***La inmunización por vía parenteral aquí realizada genera interés por conocer si existe modificación en la apoptosis de células del FAE, con eventual disfunción en la barrera, y en los linfocitos intraepiteliales, que integran la inmunidad mucosa.***

## **1.6. INFLAMACIÓN EN LA BARRERA MUCOSA INTESTINAL**

---

La inflamación es una respuesta protectora capaz de liberar al organismo de agentes agresores, restos celulares necróticos o tejidos lesionados. Se trata de una reacción tisular compleja que implica a los vasos, los leucocitos circulantes y los fagocitos tisulares, todos ellos activados por factores solubles y mediadores plasmáticos (Kumar et al., 2018).

Tal respuesta se interrelaciona estrechamente con el proceso de reparación pues éste, si bien comienza con la inflamación, se completa cuando el estímulo lesivo ha sido neutralizado con la regeneración a partir de células nativas, mediante tejido conectivo fibroso (cicatriz) o combinando unas y otro (Mohan, 2012).

En lo concerniente al aparato digestivo, la inflamación, aun mínima, tiene claros efectos morfo-funcionales. Procede, entonces, focalizar la atención en los procesos que afectan especialmente la mucosa, ya que ella es la barrera que separa los tejidos internos del contenido luminal. Cualquier situación que altere la ya abordada homeostasis, podría afectar la absorción de nutrientes, el estatus metabólico del individuo, la motilidad intestinal y el funcionamiento del sistema inmune tanto mucoso como periférico, causando infecciones (Peuhkuri et al., 2010; Rescigno, 2011; Sánchez de Medina et al., 2014).

## 2.1. INTERROGANTES PARA UNA HIPÓTESIS

---

---

Si bien el arribo de antígenos por vía luminal produce cambios morfológicos y fisiológicos en las células M (aumento de su número o de su capacidad transportadora de partículas), en los LIEs (incremento del número) y en los folículos linfoides (aumento de tamaño y cambio de estadio) (Smith et al., 1987; Savidge et al., 1991; Roy et al., 1992; Borghesi et al., 1996; Kernéis et al., 1997; Sharma et al., 1998; Borghesi et al., 1999; Sundaram et al., 1999; Jeong et al., 2000; Kucharzik et al., 2000b; Yamanaka et al., 2003; Lügering et al., 2004), la bibliografía revela que, a diferencia de la muy abordada vía enteral, **la vía parenteral se halla prácticamente inexplorada hasta la fecha en lo que hace a los sitios anatómicos inmuno-inductores**, al margen de que hace varios años se la utilizó para evaluar la absorción enterocítica de proteínas (ferritina, peroxidasa del rabanito y albúmina bovina) en animales (hámsteres y ratas) previamente sensibilizados por vía parenteral o intraperitoneal (Bockman et al., 1966; Walker et al., 1973; Walker et al., 1975). Brandtzaeg y Tölö utilizaron conejos sensibilizados por vía subcutánea, con albúmina humana emulsificada en adyuvante completo de Freund. Estos autores hallaron que la sensibilización parenteral inducía un aumento de anticuerpos tipo IgG, que llegaban a la mucosa de intestino delgado y que, a pesar de que retardaban la penetración del antígeno correspondiente, su capacidad de fijar complemento y la inducción de quimiotaxis a leucocitos neutrófilos, podrían alterar la permeabilidad de barrera mucosa, facilitando así el ingreso de antígenos no deseados (Brandtzaeg et al. 1977).

Cabe reiterar aquí que si bien Brandtzaeg et al. (1977) emplearon conejos y se valieron de la vía subcutánea, siendo por ello quienes más se han acercado al modelo aquí planteado, no llegaron a abordar, en línea con lo arriba adelantado, sitios inmuno-inductores. **De allí que en ellos se pretenda centrar primordialmente la originalidad del presente trabajo.**

Por consiguiente, restan resolver incógnitas ligadas a posibles modificaciones morfológicas en el FAE y en sus folículos vinculados cuando se cambia la vía de administración antigénica, y dudas relacionadas con el origen y posterior eliminación de las células M, al margen de cuáles hayan sido las vías de administración empleadas.

***Dentro de ese marco referencial, esta tesis, de característica y proyección morfológicas, explora cuantitativa y cualitativamente<sup>1</sup> dos sitios inmuno-inductores del aparato digestivo antigénicamente desafiados en un modelo adecuado, en ambos sexos, a una edad apropiada, en tiempos variados y mediante una vía alternativa prácticamente inexplorada hasta la fecha en ellos (parenteral en general y subcutánea en particular, usada para ciertas vacunas con adyuvante – v.g.: antitetánica con hidróxido de aluminio – en el ser humano). Más aún, a sabiendas de que superada la injuria opera la reparación, la que restaurando la homeostasis orgánica, regenera los tejidos o los reemplaza por conectivo fibroso (cicatriz).***

Reportes previos en seres humanos vacunados contra sarampión, tracoma, virus sincitial respiratorio y *Mycoplasma pneumoniae*, revelan que los gérmenes inactivados podrían sensibilizar al receptor, el que, con posterioridad y frente a una exposición natural o experimental, bien podría acentuar el patrón de la enfermedad (Craighead, 1975).

Conocer qué podría acontecer en los sitios inmuno-inductores del aparato digestivo ante el uso de la vía parenteral (como en el apuntado de caso de estas y otras vacunas) excedería, entonces, la mera curiosidad científica y proveería mayor respaldo a lo que se detalla en los capítulos que siguen.

Partiendo de las condiciones experimentales antes mencionadas, los interrogantes abajo listados dan pie a una hipótesis, cuya validez se intenta demostrar, y de la que han sido derivados los correspondientes objetivos generales y operativos:

- ¿la precitada vía de administración antigénica con adyuvante puede producir modificaciones morfológicas en el FAE de zonas digestivas cuniculares equiparables a sectores digestivos humanos?
- de existir las mismas ¿remedarían lo acontecido en enfermedades sistémicas lo que exigiría el empleo de animales de experimentación lo más semejantes posible al ser humano?

---

<sup>1</sup> De empleo frecuente en Histología e Histopatología

- de ser así ¿podrían aquéllas, soslayando improcedentes extrapolaciones entre especies, alertar complementariamente a quienes ensayan el efecto tolerogénico de antígenos (o inmunógenos) por vía oral acerca de su viabilidad y/o momento adecuado de administración? <sup>2</sup>
- en tal caso ¿podrían marcar, asimismo, lapsos prudentes de separación entre preparaciones biológicas administradas siguiendo una secuencia parenteral - enteral?
- ¿podría efectuarse algún aporte en favor del controvertido origen (desde enterocitos o desde células madres criptales) y ulterior diferenciación de las células M?

## 2.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

---

De dichos interrogantes fueron derivados la hipótesis así como los objetivos generales y específicos de esta tesis, a cuyo través se intenta dar respuesta tanto a aquéllos como a otros, de ellos eventualmente provenientes.

### Hipótesis

---

- La existencia de modificaciones morfológicas en las células del FAE de placa de Peyer de íleon terminal y del apéndice cecal del conejo y otros modelos biológicos tras inmunización enteral habilita a conjeturar cambios en tales estructuras y en capas vecinas de dichos órganos cuniculares tras inmunización parenteral subcutánea
- Las células M se originarían en el fondo de las criptas y su diferenciación podría ser detectada durante el ascenso a lo largo de las mismas

---

<sup>2</sup> A modo de ejemplo, se investiga actualmente en casos de alergia el efecto tolerogénico de antígenos (o inmunógenos) administrados oralmente. Los mejores resultados se han obtenido con barrera mucosa integral y no, con mucosa alterada como ocurre en enfermedades intestinales inflamatorias (Colitis ulcerosa, Enfermedad de Crohn) (Brandtzaeg, 2010). De allí la posibilidad de recurrir previamente a un método incruento como la fibroscopía confocal (o en su defecto a otro cruento – biopsia -) a fin de evaluar el estado mucoso y pronosticar a su través viabilidad y momento de administración antigénica oral.

### **Objetivo general**

---

Analizar el FAE en apéndice cecal y placas de Peyer (íleon terminal) cuniculares, post interacción antigénica con ovoalbúmina en adyuvante administrada por vía parenteral subcutánea, evaluando posibles cambios morfológicos en los enterocitos, en las células M con linfocitos y blastos en sus bolsillos baso-laterales (linfocitos intraepiteliales) y en las capas adyacentes.

Indagar complementariamente el probable origen y diferenciación de las células M.

### **Objetivos específicos**

---

En el FAE del apéndice cecal y de las placas de Peyer (íleon terminal) de seis grupos de conejos: (a) controles, (b) tratados sólo con adyuvante, (c) inyectados subcutáneamente con una única dosis de ovoalbúmina en adyuvante y eutanasiados a las 24 horas, y con dos dosis de ovoalbúmina en adyuvante (con un intervalo de 15 días entre ellas) y eutanasia a las 24 horas, 7 y 14 días (d, e y f, respectivamente):

1. Describir su histología normal
2. Cuantificar:
  - El área del FAE y el área de los bolsillos de las células M
  - Las poblaciones inmunocompetentes (linfocitos intraepiteliales) en los bolsillos baso-laterales de las células M
  - Las apoptosis
3. Detectar proliferación celular en criptas intestinales así como posible origen y posterior diferenciación de las células M
4. Indagar los patrones de glicosilación y los eventuales cambios en los residuos de sacáridos
5. Identificar y/o cuantificar cambios histopatológicos en el FAE y capas contiguas (leucocitos eosinófilos, macrófagos, edema y dilataciones vasculares linfáticas y sanguíneas)

### 3.1. MATERIAL Y MÉTODO

---

---

Esta tesis, básica y centrada en lo morfológico (descriptivo-explicativo), siguió un diseño experimental y sus resultados fueron cuantitativa, semicuantitativa y cualitativamente analizados.

#### 3.1.1. Animales

---

Fueron utilizados 30 conejos Neozelandeses adultos (entre 2.5 y 3 Kg de peso), de ambos sexos, alojados en número de dos (2) animales por cada jaula de alambre de 50 cm de altura, 80 cm de largo y 60 cm de ancho, bajo tinglado de chapa de zinc aluminizada. Los animales estuvieron expuestos a ventilación adecuada, temperatura entre 18 y 22° C, humedad relativa ambiente entre 50 y 70 % y 15 horas promedio de luz diurna (Friedenstein et al., 1965; Roy, 1987; Jepson et al., 1993; Gebert et al., 1993, 1997a).

Su alimentación consistió en dieta balanceada especial para conejos marca Vitaligan (17% de proteínas como máximo, 12% de fibra como mínimo y libre de albúmina) y recibieron agua potable *ad libitum*.

Procedimentalmente, los conejos fueron divididos en seis (6) grupos de cinco (5) animales cada uno.

Grupo A: Animales sin tratamiento (controles).

Grupo B: Animales que recibieron sólo adyuvantes de Freund completo e incompleto, con un intervalo de dos semanas entre ambos<sup>1</sup>, y que fueron eutanasiados 24 hs. más tarde de la segunda inyección.

Grupo C: Animales a los que se administró una primera dosis del inmunógeno ovoalbúmina emulsificada en adyuvante completo de Freund y eutanasiados 24 hs. después.

Grupo D: Animales inyectados con dos dosis de ovoalbúmina (La primera emulsificada en adyuvante completo de Freund y la segunda, a los 15 días, con adyuvante incompleto de Freund) y eutanasiados al día siguiente de la segunda administración.

---

<sup>1</sup> El adyuvante de Freund, así designado en conmemoración del inmunólogo húngaro Jules T. Freund quien lo desarrolló en 1940, es una solución de antígeno emulsionado en aceite mineral, empleado como potenciador inmunológico. La forma completa contiene Mycobacterium bovis inactivado y deshidratado, y se emplea habitualmente para inyecciones iniciales

Grupo E: Animales tratados de manera idéntica al grupo D, y eutanasiados 7 días más tarde de la última inyección.

Grupo F: Animales a los que les fue inyectada dos dosis de ovoalbúmina en adyuvantes completo e incompleto de Freund, con un intervalo de dos semanas entre ambas, y eutanasiados 14 días después de la segunda dosis.

La primera dosis, inyectada por vía subcutánea a nivel del lomo, consistió en 2 ml de una solución compuesta por 100 µg de ovoalbúmina (Grado V- Sigma) en 910 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma) y 1,09 ml de solución fisiológica.

La segunda, administrada por idéntica vía, consistió en 2 ml de una solución compuesta por 100 µg de ovoalbúmina (Grado V- Sigma) en 910 µl de adyuvante incompleto de Freund (Sigma) y 1,09 ml de solución fisiológica.

La eutanasia fue llevada a cabo mediante pentobarbital sódico inyectado en la vena marginal de la oreja, procediéndose a ulterior exsanguinación por punción cardíaca (Bolant et al., 1990).

Determinados especímenes de placas de Peyer (íleon terminal) y de apéndice cecal, extraídos de cada uno de los seis grupos experimentales, fueron fijados inmediatamente en formol al 10% en buffer fosfato e incluidos en parafina mediante procedimiento convencional. Otros, en cambio, fueron sumergidos de inmediato en crioprotector (OCT), congelándose los instantáneamente (snap-frozen) en nitrógeno líquido para su ulterior preservación en freezer a -70°C. De ambos fueron realizados cortes a 5 µm, posteriormente coloreados con Hematoxilina-Eosina (H&E), Giemsa o inmunomarcados.

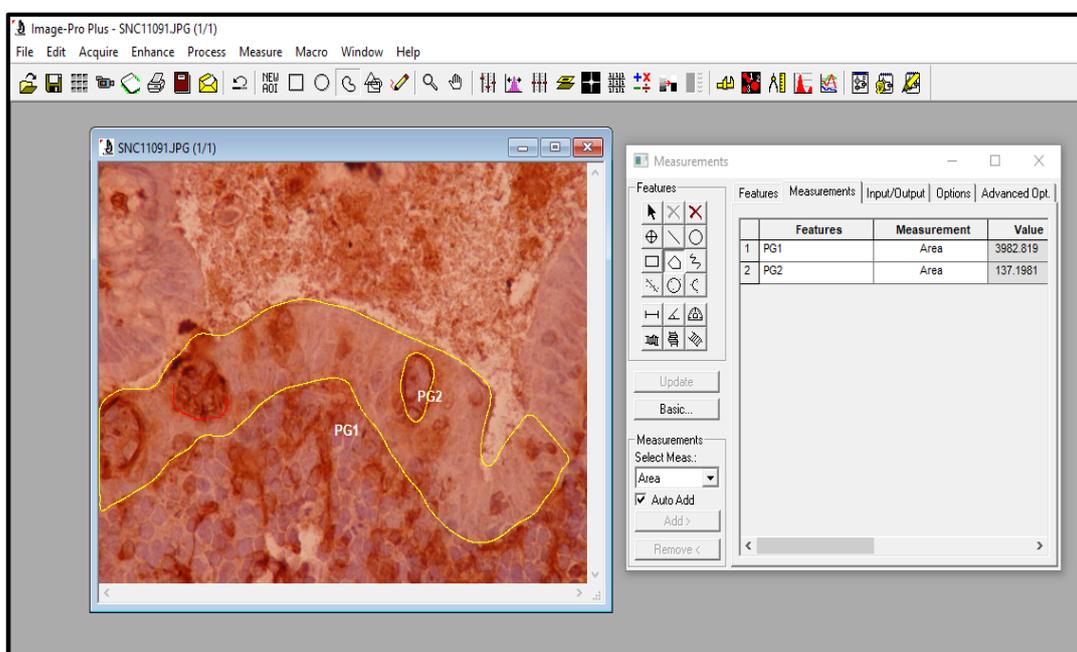
### **3.1.2. Estudio histológico**

---

Cortes desparafinados e hidratados de ambos órganos, provenientes de todos los animales de cada grupo de experimentación, fueron coloreados con H&E y visualizados a distintos aumentos en un microscopio óptico Olympus CX31, acoplado a una cámara fotográfica Samsung.

### 3.1.3. Cuantificación de las áreas del FAE y de los bolsillos de las células M

Cortes de apéndice e íleon terminal, incluidos en parafina y procedentes de los diferentes grupos experimentales, fueron inmunomarcados mediante el empleo del anticuerpo monoclonal anti-Vimentina (clon V9-DAKO), diluido 1/400, tras pertinente desenmascaramiento antigénico mediante microondas y buffer citrato. El revelado requirió uso de peroxidasa y diaminobenzidina como sustrato enzimático (Vector). Dicha inmunotinción detectó las células M del FAE y habilitó la delimitación de las áreas ocupadas por los bolsillos látero-basales de las células Vimentina (+). Diez FAE/ corte de órgano/ animal de cada grupo fueron observados en el precitado microscopio óptico. Cada FAE fue subdividido en distintas porciones de las que se tomaron fotografías digitalizadas a alto aumento microscópico (600X), hasta completar la totalidad de esta estructura (aproximadamente 15). Dichas microfotografías fueron posteriormente procesadas en el software analizador de imágenes IPWIN 32 Image-Pro Plus 4®, a fin de cuantificar áreas del FAE y de los bolsillos de las células M. El uso del software analizador de imágenes se grafica a continuación:

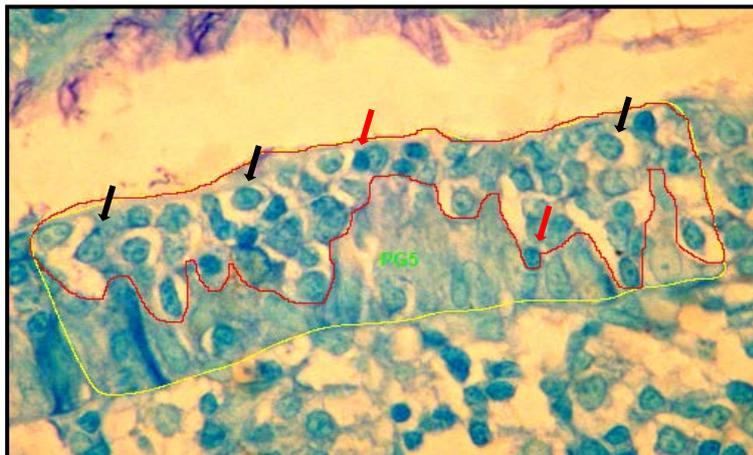


**Foto 2:** A la izquierda, se observa la fotografía microscópica del FAE a mayor aumento tras inmunomarcación con el anticuerpo anti-Vimentina, revelador de células M (marrón). La línea amarilla delimita el área total del FAE en tanto que la línea roja, incompleta, deslinda uno de los bolsillos, cuya área comienza a ser cuantificada. A la derecha, son visualizados los valores de las mediciones realizadas por el software.

### 3.1.4. Cuantificación de los LIEs

---

A este respecto, muestras de ambos órganos incluidas en parafina, posteriormente rehidratadas, fueron coloreadas con la tinción de Giemsa. Al igual que en el apartado anterior se examinaron diez FAE/ corte de órgano/ animal de cada grupo y se tomaron fotografías digitalizadas que se analizaron con idéntico software, ahora para cuantificar, las células inmunocompetentes intraepiteliales del FAE. A este último respecto, los linfocitos fueron diferenciados y ponderados como linfocitos pequeños (menores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) y linfoblastos (tamaño mayor a 10  $\mu\text{m}$ ). La cantidad total de linfocitos, así como la de linfocitos pequeños y blastos, fue relacionada con la unidad de área del FAE según se aprecia en la foto que sigue:



**Foto 3:** Fotografía microscópica del FAE en la que se demarcan los bolsillos de las células M (línea roja). Éstos alojan abundantes células inmunocompetentes, agrupadas, según su tamaño, en: blastos (flechas negras) y en citos, menos numerosas y pequeñas (flechas rojas). Tinción de Giemsa. 600X.

### 3.1.5. Cuantificación de apoptosis

---

Cortes desparafinados e hidratados de los órganos en estudio, provenientes de los diferentes grupos experimentales, fueron expuestos al Kit de apoptosis ApopTag<sup>®</sup>, detector de células apoptóticas *in situ* por marcaje y fragmentación internucleosomal del ADN mediante

método TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) y visualizados en el microscopio óptico de Olympus CX31.

### 3.1.6. Proliferación de células epiteliales en criptas asociadas al folículo y diferenciación de las células M

---

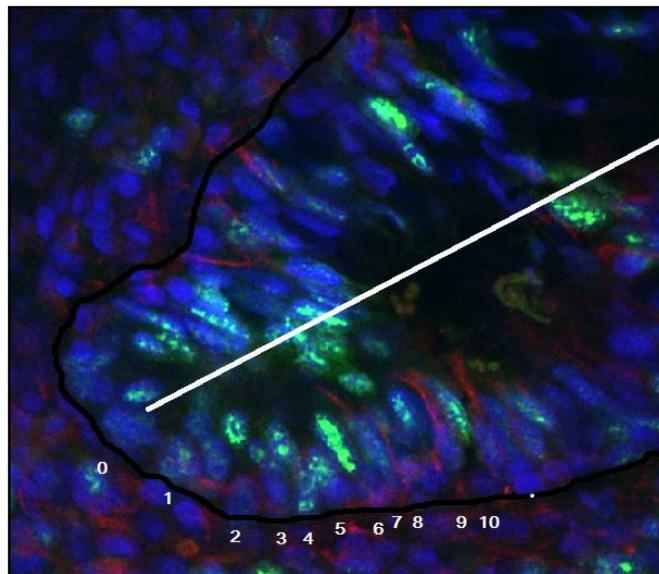
Estos estudios fueron realizados en el microscopio Láser Confocal de Barrido (LSCM-Laser Scanning Confocal Microscopy - o CSLM - Confocal Scanning Laser Microscopy -) del Instituto de Anatomía de la Universidad de Lübeck (Alemania)<sup>2</sup>.

Cortes de 40 µm de apéndice e íleon terminal, obtenidos en crióstomo, fueron inmunomarcados en simultáneo: (1) con anticuerpos monoclonales Ki-67 (clon MIB-1. DAKO) a los que se ligó uno secundario conjugado con fluoresceína (Alexa fluor 488 - BD Biosciences) a fin de determinar el ciclo de **proliferación de células epiteliales en criptas asociadas al folículo** mediante conteo de células Ki-67 (+), y (2) con anticuerpos monoclonales anti-Vimentina (clon V9 - conjugado con fluorocromo 555 - SIGMA) para **diferenciación de las células M** a través de la reactividad (+) de sus filamentos intermedios intracitoplasmáticos. Los núcleos fueron puestos de relieve con colorante fluorescente para ADN (HOESCHT).

Siendo los cortes de apreciable grosor, las criptas pudieron ser analizadas en su totalidad, seleccionándose aquéllas que incluyeron la base, la luz y su unión con el domo. Considerando los requisitos antedichos, en cada grupo fueron analizadas 5 criptas/órgano/animal, mediante LSCM dotado con el software correspondiente provisto por el fabricante (NIKON).

---

<sup>2</sup> El LSCM emplea elementos ópticos, un rayo láser y nuevos conocimientos y avances en computación. Gases nobles como el argón y el xenón constituyen la fuente de tal rayo, el que, merced a un sistema de espejos dicróicos es focalizado, en el espécimen tras su paso por lentes-objetivos. Su incidencia en éste, inmunomarcado con fluorocromos, produce luz fluorescente, la que debe atravesar nuevamente un pequeño orificio (pinhole), eliminador de los rayos fuera de foco. Las ventajas del LSCM se basan en: (a) su **confocalidad** o ubicación en puntos ópticamente conjugados (imagen confocal) del foco dentro del espécimen y el pinhole. Esto determina que sólo pasen los rayos de interés hacia el detector, obteniéndose así imágenes con mayor agudeza de definición y alto contraste; (b) el pequeño tamaño de los orificios (pinholes) y la baja longitud de onda del rayo láser determinan su **alta resolución**, (c) su **colocalización** o viabilidad de observación simultánea de la fluorescencia producida por varios canales; (d) la obtención de **imágenes tridimensionales**, y (e) la posibilidad de **examen de especímenes de considerable grosor** debido al barrido que efectúa punto por punto. Esto ahorra tiempo de procesado y evita la necesidad de cortes seriados.



**Foto 4:** Cripta asociada al GALT. La línea negra separa la cripta del estroma vecino y la bisectriz en color blanco indica el centro de la misma. Los números arábigos señalan, de modo creciente, consecutivo y ascendente, la posición de los núcleos desde la base (extremo inferior de la bisectriz, posición 0) hasta la desembocadura en el FAE. LSCM. En azul, núcleos en reposo (Hoechstfarbstoffung). En verde, núcleos en proliferación (Ki-67), y en rojo, filamentos de Vimentina (Clon V9).

A tal efecto, fue trazada una línea imaginaria en el eje de la luz, otorgándose el número 0 al núcleo ubicado en el extremo basal de ésta. Desde allí hasta la unión con el FAE, los núcleos celulares fueron numerados en orden creciente, consecutivo y ascendente (Cairnie et al., 1965; Chen et al., 1974; Potten, 1998; Bjerknes et al., 1999; Marshman et al., 2002; Potten et al., 2003) (Foto 4).

En ese marco, fueron consideradas para **proliferación celular**, la posición del primer y del último núcleo positivo en sentido ascendente (Foto 4, color verde); (b) para **células M**, la ubicación de la primera célula Vimentina (+) (Foto 4, color rojo), y (c) la posición de las células donde existía **solapamiento entre proliferación y diferenciación**.

### 3.1.7. Patrones de glicosilación y residuos de sacáridos

A estos efectos, fueron seleccionadas muestras en el FAE de ambos órganos, las que fueron fijadas en parafina, cortadas a 5  $\mu\text{m}$  de espesor e incubadas con las lectinas, listadas a continuación:

Lectina (de <i>legere</i> = seleccionar)	Origen	Azúcares detectados (Especificidad)
Ulex Europaeus-1 (UE-1)	Semilla de Ulex europaeus (Retamo espinoso)	$\alpha$ -L-fucosa
Dolichos Biflorus (DBA)	Semillas de Dolichos Biflorus (Chícharo salvaje)	$\alpha$ -N-Acetil-D-galactosamina
Peanut agglutinin (PNA)	Semillas de Arachis hypogaea (Cacahuete o maní)	$\beta$ -D-galactosa
Wheat germ agglutinin (WGA)	Semillas de Triticum Vulgaris (Trigo)	N-Acetil-D-glucosamina

Todas las lectinas fueron previamente conjugadas por el fabricante con peroxidasa (SIGMA), revelándose las con Diaminobenzidina (DAB) y obteniéndose, en caso de positividad, una reacción coloreada de tonalidad amarronada.

Las muestras, visualizadas en el microscopio óptico de investigación Olympus, fueron categorizadas como positivas o negativas, determinándose en qué áreas del FAE (base, lados, ápice), se observó reactividad o negatividad a la lectina empleada. Las variaciones tintoriales entre células M y enterocitos del FAE fueron consignadas tras su detección.

### **3.1.8. Cambios histopatológicos (eosinófilos, edema, dilataciones vasculares linfáticas y sanguíneas y macrófagos)**

Cortes de ambos órganos y de todos los grupos experimentales fueron coloreados con H-E y con Tinción de Giemsa y examinados con microscopio óptico Olympus CX31.

En el caso de leucocitos eosinófilos, edema y dilataciones vasculares, la unidad experimental fue la vellosidad interdómica y en cada grupo fueron analizados 10 de ellas por animal.

En lo atinente a los macrófagos la unidad experimental fue el folículo linfoide y fueron observados 20 folículos por conejo.

## **3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

---

### **3.2.1. Análisis estadístico de variables cuantitativas**

---

Los resultados cuantitativos fueron procesados con el programa estadístico GraphPad Prism® versión 7.00 para Windows (La Jolla, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), realizándose el test de normalidad de D'Agostino-Pearson y el test de homogeneidad de variancias de Bartlett.

En caso de distribución normal y variancias homogéneas se aplicaron las pruebas paramétricas t de Student y ANOVA, a un criterio de clasificación con el test de comparaciones múltiples de Tukey, siendo los resultados expresados como media aritmética  $\pm$  SEM.

Ante una distribución alejada de la normalidad se recurrió a las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis con el post-test Dunn, siendo los resultados enunciados como mediana y rango.

Finalmente, al analizarse distribución de frecuencias absolutas, los resultados fueron procesados estadísticamente mediante el test de  $X^2$  (ji o chi cuadrado) o el Test exacto de Fisher, según correspondiera.

En todo el estudio, las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $p \leq 0,05$ .

### **3.2.2 Análisis de variables semicuantitativas**

---

Los resultados semicuantitativos, focalizados en intensidades tintoriales y cambios histopatológicos, fueron expresados como leves (+), moderados (++) e intensos (+++).

### **3.2.3 Análisis cualitativo de variaciones histológicas**

---

Los resultados cualitativos relacionados con variaciones histológicas, ópticamente detectables pero no cuantificables, fueron detallados según se lo hace habitualmente a este respecto.

### **3.3. RECAUDOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD**

---

---

Esta tesis doctoral fue evaluada y aprobada por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas (Resolución 1883/96) y satisfizo, además, los criterios de bioseguridad establecidos y controlados por nuestra institución.

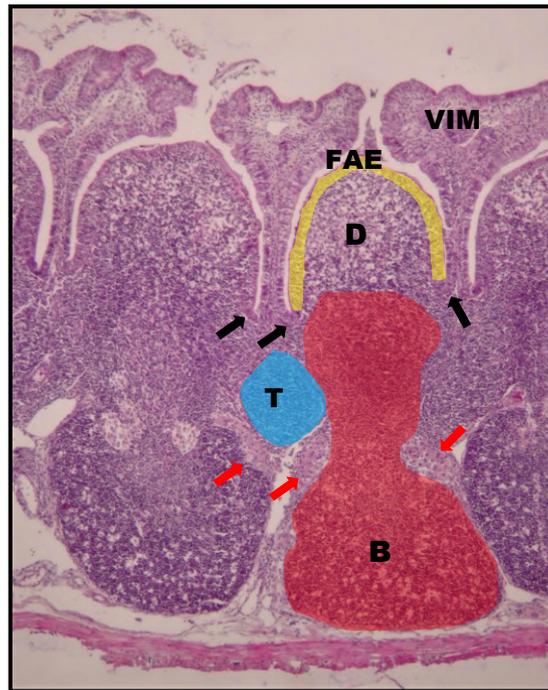
## 4.1. APÉNDICE CECAL

---

### 4.1.1. Histología de los animales controles

---

- La histología de los animales controles reveló las mismas capas que el tubo digestivo humano (mucosa con muscularis mucosae, submucosa, muscular propia y serosa).
- En la mucosa, pliegues de ésta y de aspecto fungiforme, denominadas “vellosidades interdómicas” o VIMs, se hallaban revestidas por epitelio simple columnar integrado por enterocitos y numerosas células caliciformes. A su vez, los domos, lo estaban por un epitelio cilíndrico simple (el FAE), dotado de enterocitos y células M. En el fondo criptal, ubicado entre los epitelios de las vellosidades y del domo, se alojaron las células madres, generatrices, indiferenciadas o *stem cells* (Foto 5).
- En el corion de las VIMs fueron observados restos musculares lisos, dependientes de la muscularis mucosae. Por su parte, a nivel de la base criptal, y entre folículos adyacentes, existían cúmulos de linfocitos T y a la altura del nacimiento vellositario pudieron observarse eosinófilos (son analizados en un ítem aparte más adelante) (Foto 5).
- Subyacentes al FAE resultaron visibles macrófagos cuyo abundante citoplasma revelaba una leve acidofilia y, en determinadas ocasiones, aparecía vacuolado, (son detallados en un ítem aparte más adelante). Debajo de ellos, se extendían cúmulos linfáticos hasta la vecindad de la muscularis mucosae, adoptando forma de botellón y poniendo de relieve una corona linfocitaria superficial, rica en linfocitos B, y un centro más claro con linfoblastos, linfocitos T y B, plasmocitos y macrófagos de citoplasma claro y con restos apoptóticos incluidos, entre otros (Foto 5).
- El área T, rica en tales linfocitos, fue perceptible en posición subcriptal y entre dos cúmulos linfáticos vecinos (Foto 5).



**Foto 5. Histología del apéndice cecal de conejo**

Vellosidades interdómicas fungiformes (VIM) que cubren casi enteramente los domos (D), tapizados por el FAE (cuya superficie se halla marcada en color amarillo) y que culmina en las criptas (flechas negras). Por debajo, las áreas T (en azul) y las amplias zonas B (rojo). Los cúmulos macrofágicos se encuentran señalizados con flechas rojas. H&E 40x.

Los aspectos cuantitativos son reseñados en los ítems que siguen.

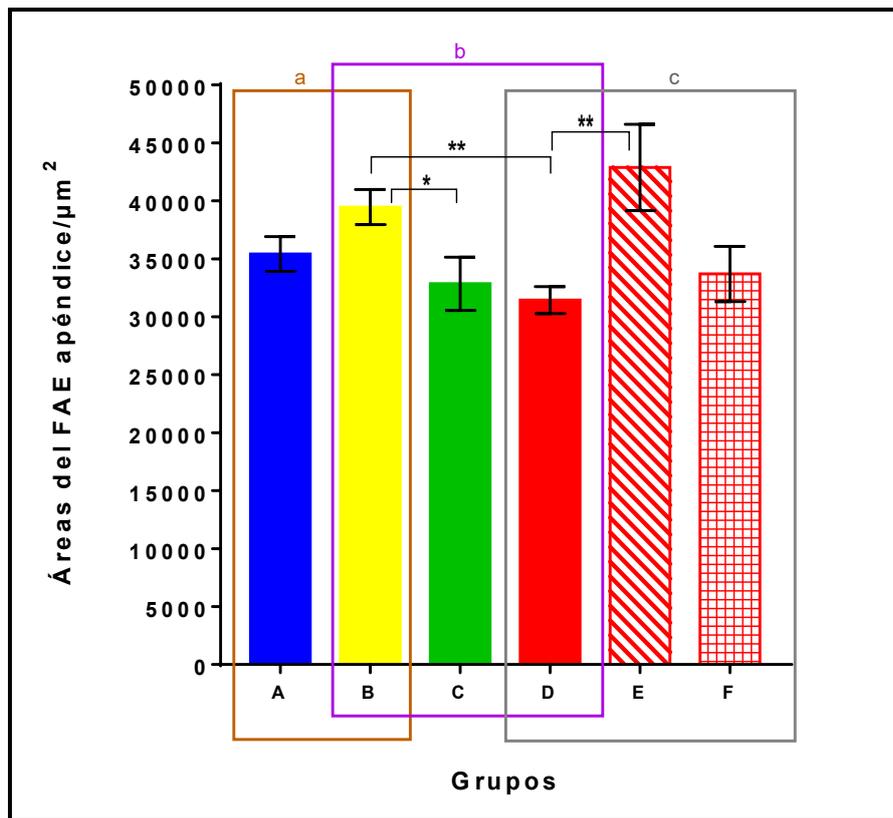
#### 4.1.2. Cuantificación de las áreas del FAE y de los bolsillos de las células M

El **área del FAE** (media aritmética  $\pm$  error estándar) en GA fue  $35417 \pm 1499 \mu\text{m}^2$ ; en GB:  $39459 \pm 1513 \mu\text{m}^2$ ; en GC:  $32853 \pm 2299 \mu\text{m}^2$ ; en GD:  $31436 \pm 1158 \mu\text{m}^2$ ; en GE:  $42883 \pm 3713 \mu\text{m}^2$  y en GF:  $33694 \pm 2389 \mu\text{m}^2$ .

En primer lugar, la contrastación entre los grupos A y B, realizada mediante la prueba t de Student para datos independientes a fin de evaluar el posible efecto del adyuvante de Freund, resultó no significativa ( $p = 0,088$ ) (Gráfico 1; recuadro a, color dorado).

Con posterioridad, la comparación entre los grupos B (tomado ahora como control), C y D (ambos inmunizados), vía test ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey, reveló una disminución significativa del área del FAE con un mayor decremento cuando las dosis administradas fueron dos ( $p = 0,039$ ) (Gráfico 1; recuadro b, color violáceo).

Finalmente, el cotejo entre los grupos D (dos dosis inmunizantes) con los grupos E y F (etapa de reparación), ANOVA y post-test de Tukey mediante, evidenció un incremento significativo en el área en estudio sólo en los animales del grupo E ( $p = 0,0029$ ), según se destaca en el Gráfico 1 (recuadro c, color grisáceo).



**Gráfico 1. Áreas del FAE de apéndice cecal**

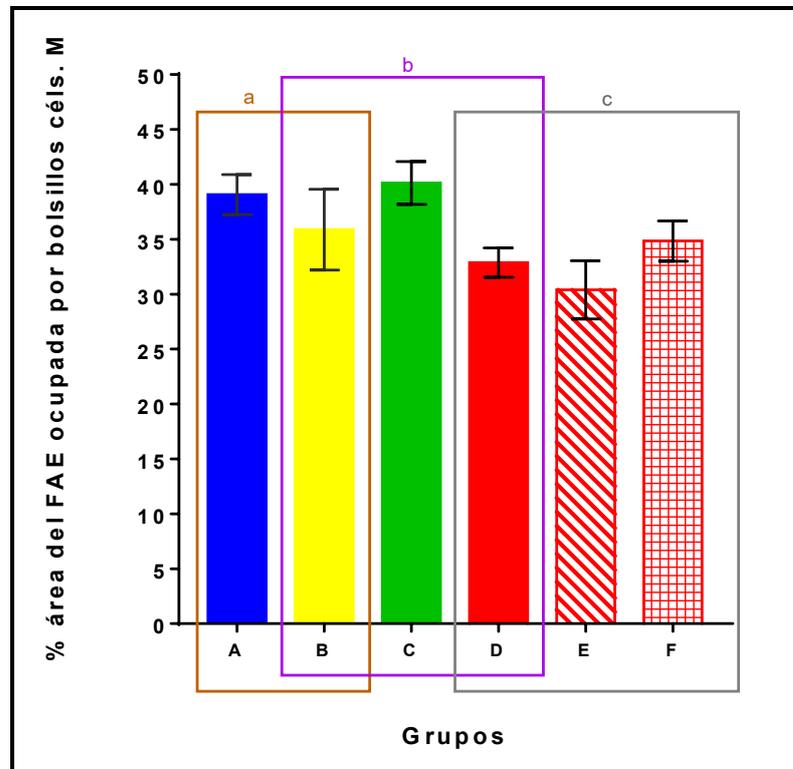
Los valores son expresados como media aritmética  $\pm$  SEM. Recuadro a) prueba t de Student,  $p=0,088$ . Recuadro b) Test ANOVA, post-test de Tukey,  $p=0,039$ . Recuadro c) Test ANOVA, post-test de Tukey,  $p=0,0029$ .

A su vez, el **área de los bolsillos de las células M**, estimada según lo anticipado en material y método y considerando el porcentaje del FAE ocupado por estos bolsillos, fue (mediana  $\pm$  rango) en GA  $38,95 \pm 30,21$  %; en GB:  $36,31 \pm 36,24$  %; en GC:  $37,21 \pm 27,18$  %; en GD:  $32,45 \pm 19,41$  %; en GE:  $30,07 \pm 30,07$  % y en GF:  $34,08 \pm 13,46$  % del FAE.

La contrastación entre los grupos A y B, realizada mediante la prueba U de Mann Whitney, resultó no significativa ( $p = 0,442$ ) (Gráfico 2; recuadro a, color dorado).

Por su parte, la comparación entre los grupos B, C y D, vía test de Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn, reveló un valor de  $p = 0,0326$  (Gráfico 2; recuadro b,

color violáceo). Mientras que el cotejo entre los grupos D, E y F utilizando las mismas pruebas, fue no significativo ( $p= 0,362$ ) (Gráfico 2; recuadro c en color grisáceo).



**Gráfico 2. Porcentaje de las áreas del FAE de apéndice cecal, ocupada por los bolsillos de las células M**

Los valores son expresados como mediana  $\pm$  rango. Recuadro a) prueba U de Mann-Whitney  $p=0,442$ . Recuadro b) Test Kruskal-Wallis, post-test de Dunn,  $p=0,033$ . Recuadro c) Test Kruskal-Wallis, post-test de Dunn,  $p=0,362$ .

#### 4.1.3. Cuantificación de los LIEs

Las células inmunocompetentes (LIEs) alojadas en los bolsillos de las células M son de interés pues desempeñan un rol importante en el mantenimiento de la barrera mucosa de este órgano. La mayoría de ellas pertenece a la estirpe linfoide y coexiste con muy pequeña cantidad de macrófagos y células dendríticas. Dichos linfocitos intraepiteliales (LIEs), discernidos morfológicamente como linfoblastos ( $>10 \mu\text{m}$ ), linfocitos ( $< 10 \mu\text{m}$ ) y células totales (suma de ambos), fueron cuantificados cada  $10.000 \mu\text{m}^2$  de superficie del FAE, según lo anticipado en Materiales y Métodos, siendo los resultados obtenidos expresados como media aritmética  $\pm$  SEM en la Tabla 1.

**Tabla 1**  
**Linfocitos intraepiteliales (LIEs) en los bolsillos de las células M de apéndice cecal de conejo, cada 10.000  $\mu\text{m}^2$  de superficie del FAE**

Grupos	Cél. Totales (media $\pm$ SEM)	Linfoblastos (media $\pm$ SEM)	Linfocitos (media $\pm$ SEM)
<b>A</b>	45,4 $\pm$ 2,14	35,5 $\pm$ 1,48	9,95 $\pm$ 1,94
<b>B</b>	49,2 $\pm$ 4,06	39,3 $\pm$ 2,91	11,9 $\pm$ 1,32
<b>C</b>	47,4 $\pm$ 2,8	37,4 $\pm$ 1,62	10,2 $\pm$ 2,36
<b>D</b>	42,4 $\pm$ 2,25	30,9 $\pm$ 2,23	10,6 $\pm$ 1,70
<b>E</b>	38,1 $\pm$ 2,92	34,7 $\pm$ 2,09	5,31 $\pm$ 1,99
<b>F</b>	33,6 $\pm$ 2,3	29,5 $\pm$ 1,95	4,01 $\pm$ 0,60

A su vez, la Tabla 2 presenta el pertinente análisis estadístico, cuya contrastación de grupos siguió idéntico procedimiento que en 4.1.2 (áreas del FAE y de los bolsillos de las células M).

**Tabla 2**  
**Análisis estadístico empleado para los LIEs de los bolsillos de las células M de apéndice cecal de conejo**

	Céls totales	Linfoblastos	Linfocitos
<b>Grupo A vs. B</b>	t de Student p = 0,374 ns	t de Student p = 0,198 ns	t de Student p = 0,483 ns
<b>Grupo B vs. C y D</b>	ANOVA p = 0,228 ns	ANOVA p = 0,025 (*)	ANOVA p = 0,844 ns
<b>Grupo D vs. E y F</b>	ANOVA p = 0,053 ns	ANOVA p = 0,341 ns	ANOVA p = 0,019 (*)

4.1.4. Cuantificación de apoptosis

**Tabla 3**  
**Células apoptóticas en el FAE de apéndice cecal de conejo, cada 10.000  $\mu\text{m}^2$  de superficie del FAE**

Grupos	A	B	C	D	E	F
(mediana $\pm$ rango)	1,24 $\pm$ 0,127	1,85 $\pm$ 0,394	1,66 $\pm$ 0,321	0,82 $\pm$ 0,105	1,84 $\pm$ 0,811	0,183 $\pm$ 0,64

**Tabla 4**  
**Análisis estadístico empleado para el estudio de las células apoptóticas en el FAE de apéndice cecal de conejo**

Grupos A vs. B	U de Mann-Whitney p = 0, 208 ns
Grupos B vs. C y D	Test de Kluskal-Wallis p = 0, 0241 (*)
Grupos D vs. E y F	Test de Kluskal-Wallis p = 0, 001 (**)

4.1.5. Proliferación de células epiteliales en criptas asociadas al folículo y diferenciación de las células M

Dada la inexistencia de diferencias entre grupos puede decirse que lo que sigue es atribuible a la habitualidad histológica a este respecto.

Según se refiriera en material y método, le fue conferido el número 0 al núcleo posicionado en la base de las criptas analizadas con el CLSM, siendo las células numeradas de manera creciente, a partir de allí y en sentido ascendente. En la Tabla 3 se aprecia que las criptas evidenciaron una mediana de 16 células, con un rango extendido entre 12 y 20 en lo que hace a su longitud. De esta totalidad celular, aquéllas ubicadas en los tercios inferior y medio y en una acotada parte del tercio superior resultaron Ki-67(+).

**Tabla 5**  
**Longitud de las criptas, proliferación, diferenciación y solapamiento en apéndice cecal de conejo, a través del uso de LCSM**

<b>Longitud de criptas</b> (Número de núcleos)	<b>Proliferación</b> (Ki67- clon MIB1)	<b>Diferenciación</b> (Vimentina)	<b>Solapamiento</b> (Overlapping)
Mediana/Rango	Mediana/Rango	Mediana/Rango	Mediana/Rango
<b>16</b> 12 - 20	<b>14</b> 11 – 18	<b>7</b> 4 – 9	<b>8,5</b> 4 – 13

Tanta fue la actividad mitótica en el sector medio que los núcleos lucieron agolpados y protruyendo hacia la luz (Foto 6a). **La última posición celular en exhibir proliferación fue la de mediana 14** con rango entre 11 y 18 (Tabla 5).

Por su parte, **a partir de la posición 7** (rango entre 4 y 9) (Tabla 5), **las células presentaron Vimentina citoplasmática, a modo de un delgado filamento vertical yuxtannuclear** (Foto 6b).

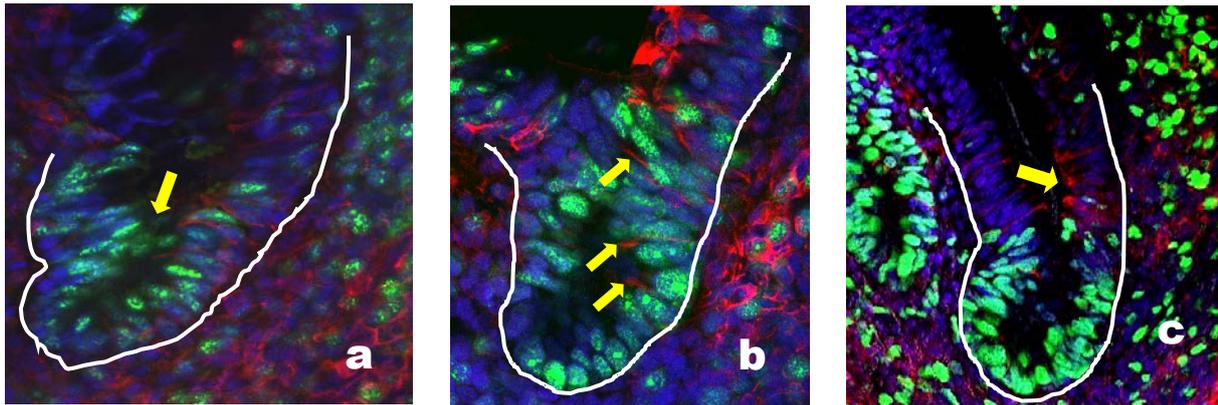
Además, **las células criptales localizadas en la vertiente próxima al domo mostraron mayor expresión de vimentina** que aquéllas ubicadas en la cara opuesta; vale decir, **aproximadamente 8 células en división revelaron, a la par, los primeros indicios de diferenciación citoesquelética (overlapping o solapamiento entre proliferación y diferenciación celulares)**.

Según se dijera, algunas de las células indiferenciadas o madres de la cripta intestinal proliferan y tras varios ciclos mitóticos evidencian diferenciación hacia la línea M, de manera tal que al alejarse de la citada cripta, algunas se encuentran predeterminadas ya hacia dicho linaje.

En todos los animales, fue dable observar en la base del domo e inmediatamente por encima del orificio criptal, células Vimentina (+) de forma columnar y sin pliegues en sus membranas; esto es, sin bolsillos con células inmunocompetentes alojadas en su interior. A estas células inmaduras sólo puede detectárselas en el apéndice cecal empleando el CLSM (Foto 6c). Yendo en sentido ascendente, las células M alojaban numerosos linfocitos, distribuidos de manera difusa, en las porciones inferiores del domo donde la luz intestinal se dispone en hendidura. En el

sector inmediato superior, cuya luz luce infundibular, las células M presentaron bolsillos más definidos, bien delimitados y más superficiales, y alojaron menor cantidad de células inmunocompetentes, en su mayoría blastos.

Finalmente, en el ápice, donde la luz alcanza mayores dimensiones, fue detectada ausencia de células M.



**Foto 6. Criptas de apéndice cecal a través del empleo de microscopio láser de barrido confocal (LCSM)**

Fluorescencia roja: Vimentina. Verde: Ki67, proliferación. Azul: núcleos. En blanco se indican los bordes de las criptas, en el sitio donde se encontraría la membrana basal. **(a)** En la zona de mayor proliferación, en la parte media de las criptas, los núcleos tienden a ubicarse hacia la luz (flecha). **(b)** Se detecta que antes de abandonar la cripta y proliferando todavía, algunas células expresan Vimentina en sus citoplasmas a manera de delgados filamentos, más notorio sobre la vertiente cómica. **(c)** Células M inmaduras, columnares con abundante Vimentina en sus citoplasmas y sin linfocitos.

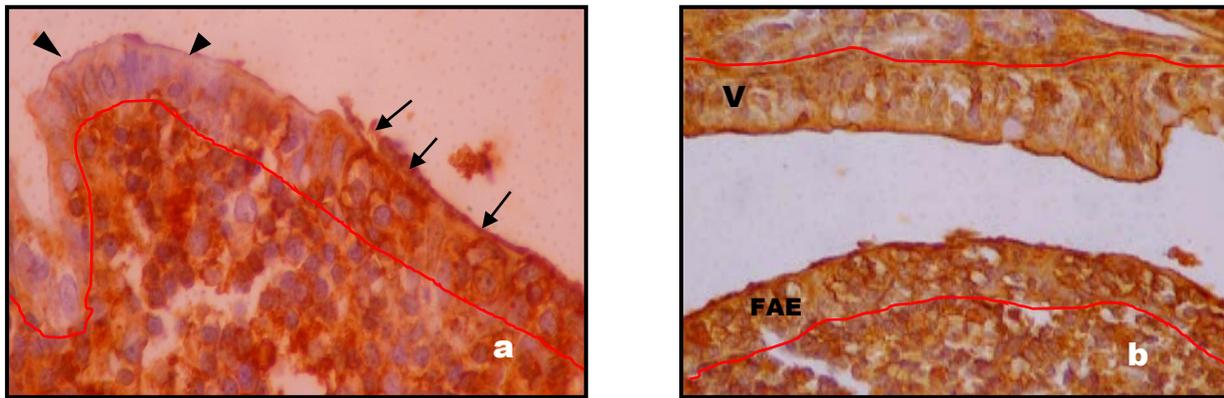
#### **4.1.6. Patrones de glicosilación y eventuales cambios en los residuos**

En el apéndice cecal, aún con mayor expresión tingible, no fueron registradas diferencias intergrupales con las cuatro lectinas empleadas.

**Ulex Europaeus** mostró intensa tinción a nivel de las células M, reforzamiento de la membrana basolateral y destacable marcación en la superficie. Los enterocitos del domo y de las vellosidades adyacentes resultaron negativos (Foto 7a).

Por su parte, **Dolichos Biflorus** exhibió similar patrón tintorial que UE-1, más allá de una mayor acentuación en el mucus superficial.

Por último, Peanut Agglutinin no evidenció positividad alguna, mientras WGA exteriorizó positividad intensa pero inespecífica (Foto 7b).



**Foto 7. Lectinas en apéndice cecal**

**(a)** UE-1. A nivel del FAE se observa positividad en las células M y mucus superficial (flechas) y negatividad en los enterocitos (puntas de flechas). En rojo membrana basal del FAE. 250x **(b)** WGA. Tinción positiva y no específica en células epiteliales y mucus superficial del FAE y vellosidades (V). La membrana basal se halla señalizada en color rojo. 250x.

A continuación es registrada la Intensidad de la positividad a lectinas en el FAE (Tabla 6)

**Tabla 6**  
**Intensidad de la positividad a lectinas en el FAE**

Lectinas Empleadas	FAE de Apéndice cecal		
	Células M	Enterocitos	Mucus
UE-1	+++	-	+
DBA	++	+	++
PNA	-	-	-
WGA	+++	+++	+++

#### 4.1.7. Cambios histopatológicos

---

##### 4.1.7.1. Leucocitos eosinófilos

Cualitativamente, fueron detectados en el grupo control A y en los grupos experimentales B y C pequeños cúmulos de eosinófilos (entre 15 y 20 células con citoplasma rosado intenso con la tinción Giemsa y de similar morfología a la hallada en otros vertebrados en la base de las vellosidades interdómicas (VIMs), próximos a las criptas y sobre las áreas T, donde se situaban, a su vez, las vénulas post-capilares de endotelio alto (Foto 8a).

En cambio, su presencia no resultó notoria en los domos, otros sectores de la lámina propia, los folículos linfoides, la muscular propia y la capa serosa.

Cuantitativamente, se consideró como leve a la densidad eosinofílica en las VIMs de los grupos antedichos y como densidad nula cuando no se hallaron eosinófilos o los cúmulos fueron menores a los citados (Tabla 7).

**En los grupos D, E y F tal densidad fue significativamente mayor respecto de las precedentes rotulándose las, por lo tanto, como moderadas e intensas (Tabla 7).**

Al ser esta asociación estadísticamente significativa y demostrar que la densidad de eosinófilos aumenta en los grupos D, E y F en comparación con los restantes, fueron configurados dos nuevos grupos; uno, incluyendo a los animales de los grupos A, B y C y otro, con los conejos de los grupos D, E y F. En esta oportunidad, la cantidad de eosinófilos fue desdoblada en nula/leve y moderada/intensa (Tabla 8).

**Tabla 7**

**Frecuencias absolutas observadas de eosinófilos en vellosidades interdómicas (VIMs) en apéndice cecal de conejos sometidos a diferentes tratamientos**

	Densidad de Eosinófilos				Total
	Nula	Leve	Moderada	Intensa	
Grupo A	20	20	10	0	50
Grupo B	20	25	5	0	50
Grupo C	20	5	25	0	50
Grupo D	0	20	10	20	50
Grupo E	0	20	10	20	50
Grupo F	0	10	0	40	50
<b>Total</b>	60	100	60	80	300

Test  $\chi^2 = 220,3$        $p = 0,0001$

**Tabla 8**

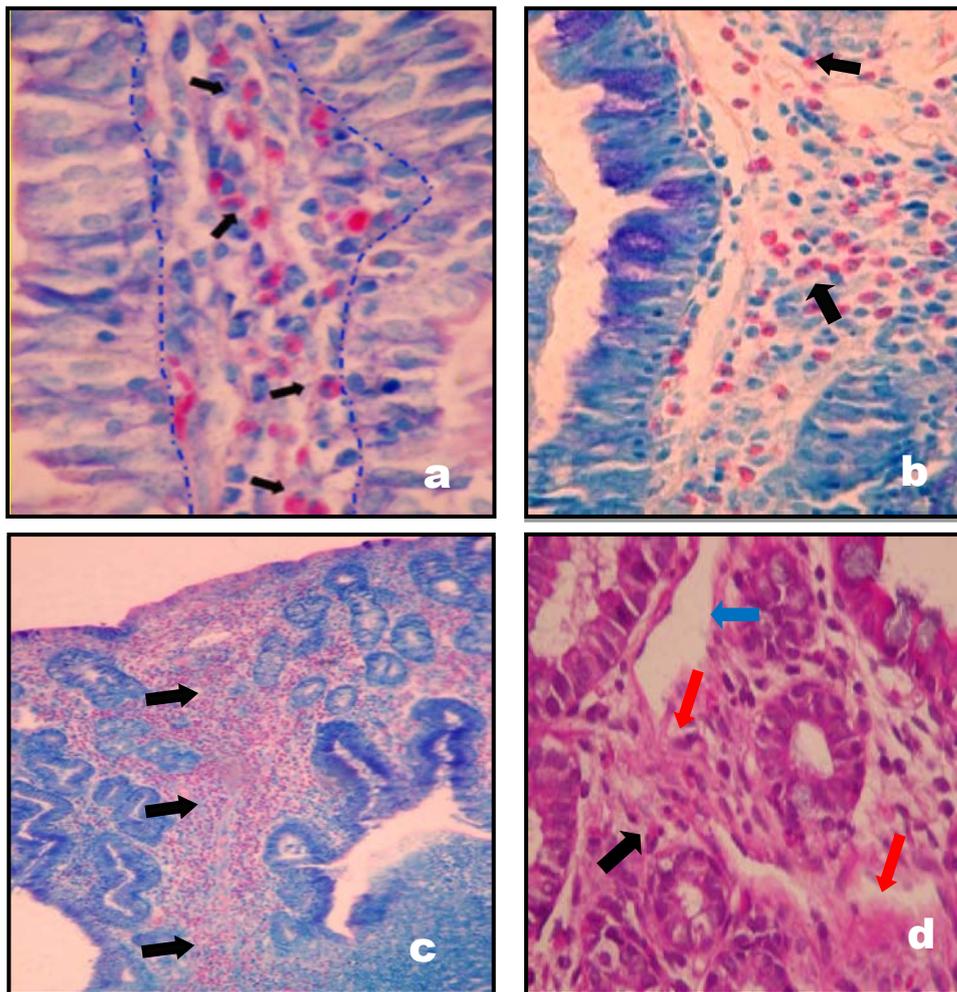
**Frecuencias absolutas observadas de eosinófilos en vellosidades interdómicas (VIMs) en apéndice cecal de conejos sometidos a diferentes tratamientos**

	Densidad de eosinófilos		Total
	Nula/Leve	Moderada/Intensa	
Grupos A, B y C	110	40	150
Grupos D, E y F	50	100	150
<b>Total</b>	160	140	300

Test  $\chi^2$ ;  $p = 0,001$

Cualitativamente, los infiltrados eosinofílicos moderados fueron visualizados como cúmulos celulares mayores ubicados no sólo en las bases de los VIMs sino, que se extendían, además, hasta los tercios medios de los tallos vellositarios (Foto 8b). Por su parte, los clasificados como intensos se ubicaban apicalmente y próximos a la luz (Foto 8c). Además, estos últimos **se localizaban cercanos a los plasmocitos y se asociaban a hipertrofia e hiperplasia de las células caliciformes y a bandas de fibrosis** (Foto 8d).

Por último, cabe destacar que en ninguno de los grupos experimentales fueron hallados eosinófilos en los domos ni en el FAE.



**Foto 8. Cambios histopatológicos en apéndice cecal**

**(a)** Base de la vellosidad interdómica que evidencia escasa cantidad de eosinófilos (flechas). Con línea discontinua azul se indica la membrana basal. Tinción de Giemsa 400x. **(b)** Vellosidad interdómica en su tercio basal y medio. Numerosos eosinófilos (flechas) que ocupan la base de la vellosidad y se extienden hacia la parte media del tallo. Tinción de Giemsa 200x. **(c)** Abundante cantidad de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos que localizan en toda la vellosidad, llegando incluso hasta los sectores subepiteliales apicales. Tinción de Giemsa 100x. **(d)** Eosinófilos (flecha negra) entremezclados con bandas de fibrosis (flechas rojas). Se reconoce un capilar linfático dilatado (flecha azul). H&E 400x.

**4.1.7.2. Edema y dilataciones vasculares linfáticas y sanguíneas**

La acumulación anómala de líquido en el espacio intersticial (edema) fue observada en conjunción con linfangiectasias mientras que las ectasias vasculares sanguíneas resultaron poco notorias.

**El edema, detectado sólo en los ápices de las VIMs, exhibió grado leve en los conejos del grupo D y grado moderado en los grupos E y F.**

A su vez, las linfangiectasias fueron visualizadas en todas las capas del órgano en los grupos D, E y F (Tabla 9).

Ambos cambios histopatológicos no mostraron una graduación intensa.

**Tabla 9**  
**Frecuencias absolutas observadas de edema y linfangiectasias en vellosidades interdómicas en apéndice cecal de conejos sometidos a diferentes tratamientos**

	Edema y linfangiectasias			Total
	Nulo	Leve	Moderado	
<b>Grupo A</b>	45	5	0	50
<b>Grupo B</b>	35	15	0	50
<b>Grupo C</b>	35	15	0	50
<b>Grupo D</b>	10	35	5	50
<b>Grupo E</b>	5	20	25	50
<b>Grupo F</b>	5	15	30	50
<b>Total</b>	135	105	60	300

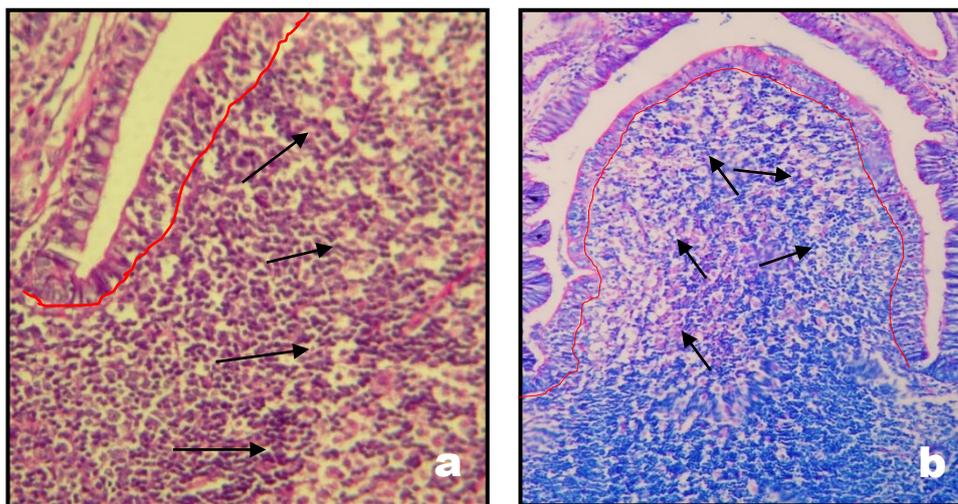
$\chi^2 = 150,9$      $p = 0,0001$

#### 4.1.7.3. Macrófagos

Cualitativamente, fueron detectados diferentes tipos de macrófagos.

La mayoría de ellos se ubicaron **en el domo, a nivel subepitelial y cercanos a las células M**, aparentando proyectarse hacia los folículos subyacentes o viceversa. Estos macrófagos, dispuestos individualmente o en cúmulos, fueron visualizados como células de tamaño mediano, citoplasma claro o levemente acidófilo y con algo de material granular fagocitado. Sus núcleos, excéntricos y con una pequeña escotadura, exhibían cromatina laxa (Foto 9a).

Se reconoció un aumento leve de estos macrófagos en el grupo E, que se acentuó aún más en el domo de los animales del grupo F, en coincidencia con menor cantidad de células linfoides (Foto 9b).

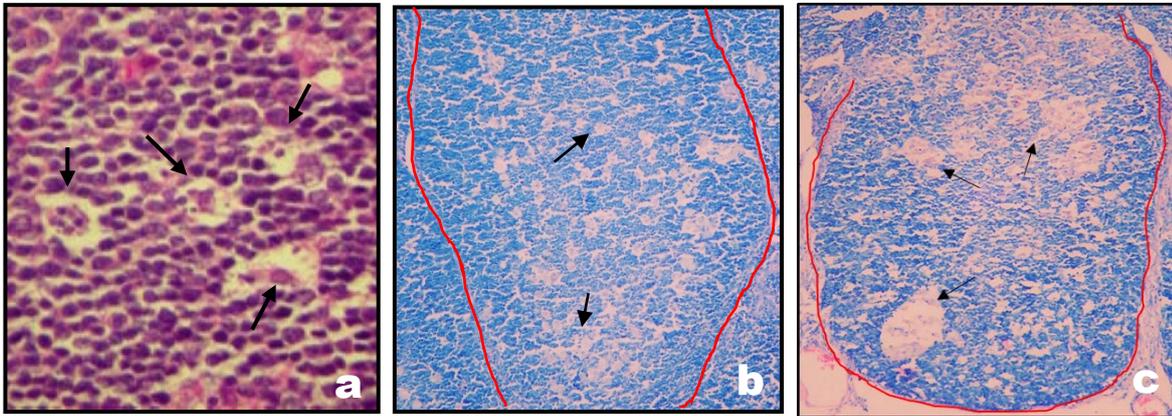


**Foto 9. Macrófagos en domo de apéndice cecal de conejo**

**(a)** Sector dómico subepitelial en animales de los grupos control. Los macrófagos a este nivel exhiben citoplasmas levemente acidófilos y están dispuestos de manera aislada o en cúmulos pequeños (flechas) que conectan los centros germinales con el área lateral rica en células M. H&E 200x. **(b)** Domo de conejos del grupo F, con grupos de macrófagos de mayor tamaño que se disponen en la periferia (flechas), próximos al epitelio, y se asocian a disminución de los elementos linfoides. Giemsa 100x. Membrana basal del FAE en color rojo.

**Otra variedad se localizaba en los centros germinativos foliculares** junto a grandes linfocitos (designados centroblastos en el ser humano y el ratón). Éstos, mostraban citoplasmas amplios, claros y albergaban numerosos cuerpos apoptóticos en su interior. Similares a los descritos en otros folículos linfoides, **son los macrófagos de cuerpo tingible** (Foto 10a y 10b).

De manera similar a lo descrito anteriormente a nivel del domo, estos macrófagos aumentaron en los conejos a la semana luego de ambas inmunizaciones (grupo E) y de manera notable a los 14 días (grupo F) (Foto 10c).

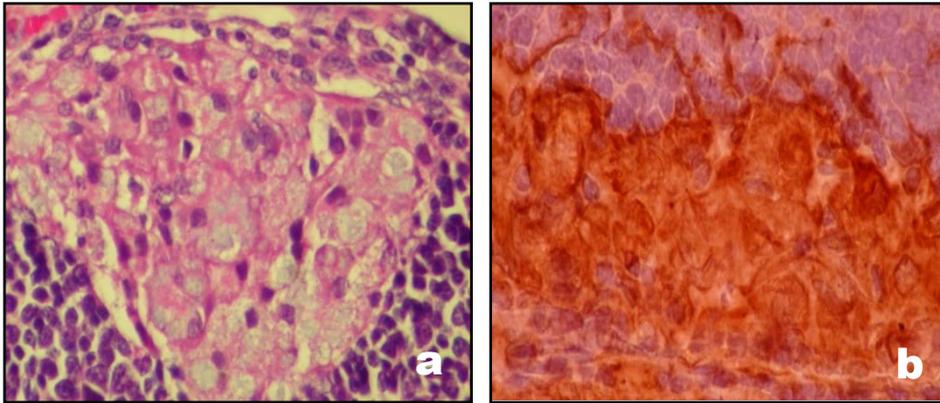


**Foto 10. Macrófagos en folículos linfoides de apéndice cecal**

(a) Detalle de macrófagos en los centros germinales. Células aisladas (flechas), con abundantes citoplasmas y cuerpos apoptóticos en su interior. H&E 400x. (b) Centros germinales de folículos linfoides de conejos controles, con macrófagos (flechas) dispuestos en solitario o en pequeños grupos. (c) Folículo linfoide de animales del grupo F con macrófagos organizados en cúmulos de mayor tamaño. (b y c) Giemsa 100x. Borde externo del folículo linfoide en color rojo.

**Finalmente, existía un tercer grupo dispuesto en grandes agregados**, con citoplasma abundante e intensamente acidófilo, material granular fagocitado y sin cuerpos apoptóticos en su interior. Estaban situados en los sectores laterales de los folículos, lindantes con las áreas T y muy cercanos a las vénulas post-capilares de endotelio alto. Eran vimentina (+), hallándose este filamento intermedio reforzado alrededor del núcleo y por debajo de la zona correspondiente a la membrana plasmática (Fotos 11a y 11b).

Estos agregados de macrófagos Vimentina (+) se disponían a modo de cinturón en torno al folículo y resultaron patognomónicos en hembras (Ver Anexo-Capítulo 8).



**Foto 11. Macrófagos en grupos periféricos al folículo linfoide en apéndice cecal**

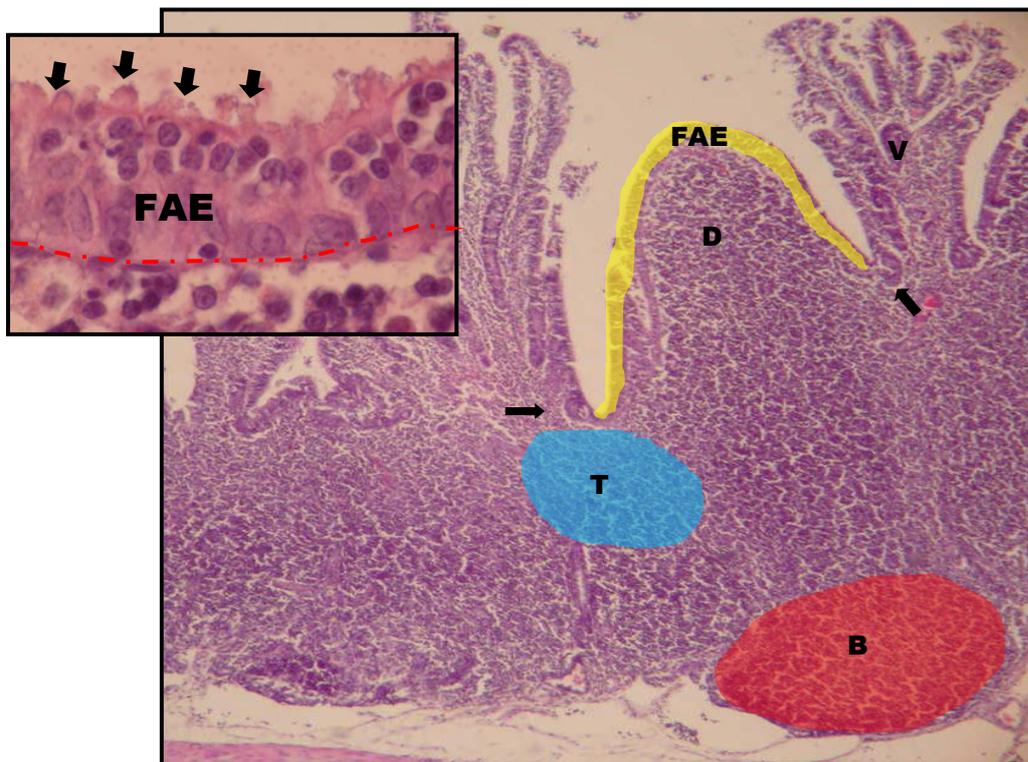
(a) Grandes agregados de macrófagos, con citoplasma amplio y acidófilo, en sectores laterales de folículos linfoides. H&E 400x. (b) Los macrófagos en cúmulos con citoplasma difusamente positivo a la anti-Vimentina. Técnica de Inmunohistoquímica 400x.

## 4.2. PLACA DE PEYER (ÍLEON TERMINAL)

### 4.2.1. Histología de los animales controles

- La histología de los controles reveló las mismas capas que las del apéndice cecal cunicular y las del tubo digestivo humano; esto es, mucosa con muscularis mucosae, submucosa, muscular propia y serosa (Foto 12).
- En la mucosa, las vellosidades de la mucosa se presentaron alargadas y con cierta incurvación hacia la placa (diferencia con apéndice cecal) aunque revestidas por un epitelio similar al de este órgano. Los domos intervallosarios poseían mayor contacto con el contenido luminal y exhibían células M y enterocitos del FAE (Foto 12).
- Resultó llamativo, a nivel del FAE, la existencia de pequeñas protrusiones similares a bullas (blebs) en la porción apical del epitelio, que coincidió con el sector donde los bolsillos basolaterales se atenuaban y se acentuó en la zona de extrusión (Foto 12, figura de menor tamaño).
- Subyacentes al FAE, los folículos linfáticos fueron más esféricos, mostrando una corona periférica y una zona clara central. En esta última, se alojaban macrófagos de cuerpo tingible. A su vez, el área T, en posición subcriptal y entre dos cúmulos linfáticos vecinos, se reveló más extensa (Foto 12).

- Próximos a las criptas y a las vénulas post-capilares de endotelio alto, fueron localizados polimorfonucleares eosinófilos, de manera similar a lo observado en apéndice cecal.
- Además, fueron reconocidos macrófagos a nivel del domo subepitelial y otros, con numerosos cuerpos apoptóticos citoplasmáticos, en el centro germinativo folicular. En este órgano, no se detectaron cúmulos macrofágicos en los bordes laterales de los folículos.



**Foto 12: Histología de placa de Peyer de conejo**

Vellosidades alargadas y digitiformes (V). El domo (D), tapizado por el FAE (marcado en color amarillo) culmina en las criptas (flechas negras). Debajo de éstas se visualizan las áreas T (en azul) y B (rojo). H&E 100x. En la figura de menor tamaño, se observa el epitelio cilíndrico. A este nivel, las células superficiales evidencian bullas superficiales (flechas negras): otras, forman bolsillos que alojan linfocitos. Membrana basal señalada en línea roja discontinua. H&E 100x

Los aspectos cuantitativos son reseñados en los ítems que siguen.

**4.2.2. Cuantificación de las áreas del FAE y de los bolsillos de las células M**

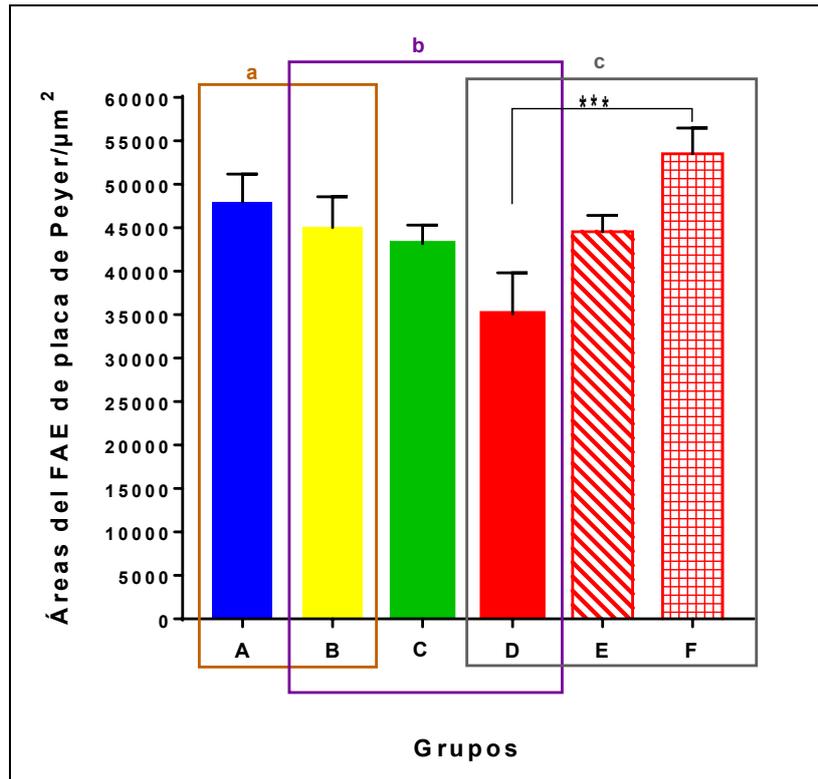
Los valores obtenidos sobre áreas del FAE y de los bolsillos laterales de las células M en los diferentes grupos son presentados conjuntamente en la Tabla 10.

Respecto del **área del FAE**, y a semejanza de lo efectuado en apéndice cecal, la contrastación estadística entre los grupos A y B mediante la prueba t de Student para datos independientes resultó no significativa ( $p=0,689$ ) y descartó el efecto del adyuvante (Gráfico 3; recuadro a, línea dorada). Posteriormente, los grupos B, C y D resultaron estadísticamente no significativos ( $p=0,156$ ) cuando se los cotejó vía la prueba ANOVA. A pesar de ello, fue apreciada una disminución del área del FAE tras ambas inmunizaciones (Gráfico 3; recuadro b, línea violácea). Por último, con los animales del grupo D como control y utilizando el test de ANOVA, se observó un aumento significativo del área, muy acentuado a los 15 días luego de la última dosis subcutánea en el grupo F (etapa de reparación) ( $p=0,001$ ) (Gráfico 3; recuadro c, línea grisácea).

**Tabla 10**  
**Placa de Peyer de conejos ante diferentes tratamientos: área total del FAE, superficie ocupada por los bolsillos de las células M y porcentaje correspondiente.**

Grupos	Área del FAE	Área de bolsillos de células M	% del FAE ocupado por bolsillos
<b>A</b>	47976,26 ± 3215,72	17221,29 ± 1376,08	37,86 ± 1,24
<b>B</b>	45022,67 ± 3557,31	17155,02 ± 387,29	34,76 ± 0,97
<b>C</b>	43154,27 ± 2156,28	13763,48 ± 1004,21	31,06 ± 1,32
<b>D</b>	35084,83 ± 4744,05	10652,16 ± 1986,98	30,38 ± 2,62
<b>E</b>	44565,56 ± 1858,85	16737,11 ± 1017,39	37,34 ± 1,02
<b>F</b>	53510,12 ± 2969,82	17775,70 ± 950,42	38,02 ± 0,97

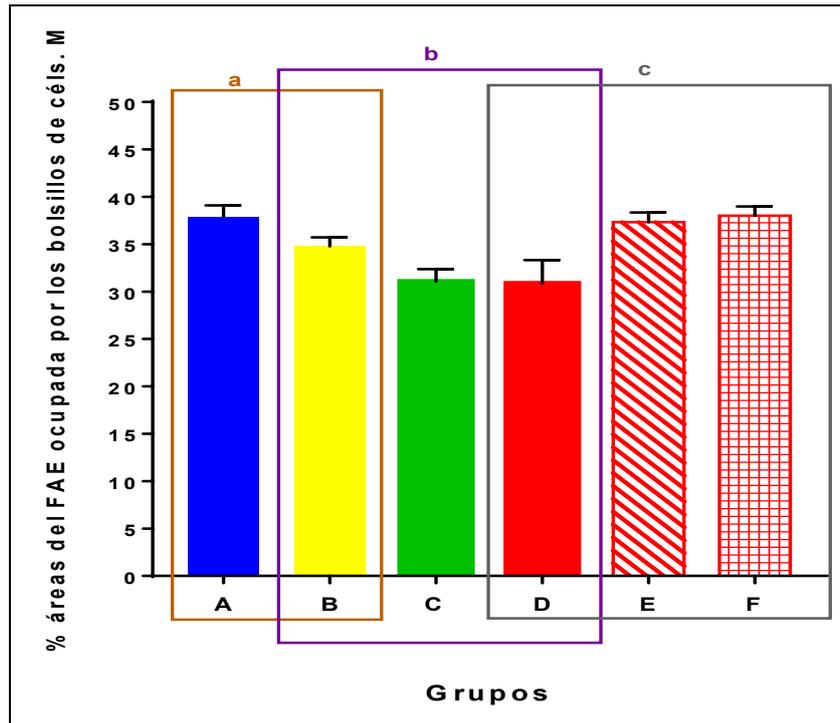
Valores expresados como media aritmética ± SEM.



**Gráfico 3. Áreas del FAE de placa de Peyer de conejo**

Los valores son expresados como media aritmética  $\pm$  SEM. Recuadro a) prueba t de Student,  $p=0,689$ . Recuadro b) Test ANOVA,  $p=0,156$ . Recuadro c) Test ANOVA, post-test de Tukey,  $p=0,001$ .

En lo referido a los **bolsillos de las células M**, al analizar el porcentaje del FAE ocupado por ellos no hubo diferencias significativas al contrastar los grupos A y B ( $p=0,231$ ) con la prueba U-Mann Whitney ni cuando fueron comparados. los grupos B, C y D ( $p=0,202$ ) y los grupos D, E y F ( $p=0,051$ ) con el test de Kruskal-Wallis (Gráfico 4).



**Gráfico 4. Porcentaje de las áreas del FAE de placa de Peyer de conejo, ocupada por los bolsillos de las células M**

Los valores son expresados como mediana  $\pm$  rango. Recuadro a) prueba U de Mann-Whitney  $p=0,231$ . Recuadro b) Test Kruskal-Wallis,  $p=0,202$ . Recuadro c) Test Kruskal-Wallis,  $p=0,051$ .

#### 4.2.3. Cuantificación de los LIEs

Las células inmunocompetentes (LIEs) alojadas en los bolsillos de las células M, fueron divididas, según su tamaño, en linfoblastos ( $>10 \mu\text{m}$ ) y en linfocitos ( $< 10 \mu\text{m}$ ), catalogándose como células totales la suma de ambas.

Todas ellas fueron cuantificadas cada  $10.000 \mu\text{m}^2$  de superficie del FAEy los resultados, expresados como media aritmética  $\pm$  SEM, registrados en la Tabla 11.

**Tabla 11**  
**Linfocitos intraepiteliales (LIEs) en los bolsillos de las células M de placa de Peyer de conejo, cada 10.000  $\mu\text{m}^2$  de superficie del FAE**

Grupos	Cél. Totales (media $\pm$ SEM)	Linfoblastos (media $\pm$ SEM)	Linfocitos (media $\pm$ SEM)
<b>A</b>	50,2 $\pm$ 2,03	40,9 $\pm$ 2,16	9,58 $\pm$ 0,80
<b>B</b>	49,2 $\pm$ 4,06	41,8 $\pm$ 1,03	9,38 $\pm$ 0,74
<b>C</b>	46,2 $\pm$ 2,41	44,7 $\pm$ 1,88	3,06 $\pm$ 0,34
<b>D</b>	53,6 $\pm$ 2,62	52,6 $\pm$ 2,03	3,35 $\pm$ 0,88
<b>E</b>	54,3 $\pm$ 3,09	47,5 $\pm$ 2,03	5,48 $\pm$ 0,66
<b>F</b>	56,8 $\pm$ 5,32	46,6 $\pm$ 2,92	6,52 $\pm$ 1,08

A su vez, la Tabla 12 presenta el pertinente análisis estadístico, cuya contrastación de grupos siguió idéntico procedimiento que en las áreas del FAE y en la de los bolsillos de las células M.

**Tabla 12**  
**Análisis estadístico empleado para los LIEs de los bolsillos de las células M de placa de Peyer de conejo**

	Céls totales	Linfoblastos	Linfocitos
<b>Grupo A vs. B</b>	t de Student p = 0,818 ns	t de Student p = 0,800 ns	t de Student p = 0,869 ns
<b>Grupo B vs. C y D</b>	ANOVA p = 0,170 ns	ANOVA p = 0,004 (**)	ANOVA p < 0,0001 (****)
<b>Grupo D vs. E y F</b>	ANOVA p = 0,837 ns	ANOVA p = 0,199 ns	ANOVA p = 0,055 ns

**4.2.4. Cuantificación de apoptosis**

Como ocurriera en apéndice cecal, fueron analizadas/os las células en apoptosis o los fragmentos de elementos celulares (cuerpos apoptóticos) del FAE. Sus resultados se presentan en las Tablas 13 y 14

**Tabla 13**  
**Células apoptóticas en el FAE de placa de Peyer de conejo, cada 10.000  $\mu\text{m}^2$  de superficie**

Grupos	A	B	C	D	E	F
(mediana $\pm$ rango)	2,92 $\pm$ 2,30	1,70 $\pm$ 0,40	1,28 $\pm$ 4,06	1,23 $\pm$ 2,39	1,18 $\pm$ 2,70	1,84 $\pm$ 2,35

**Tabla 14**  
**Análisis estadístico empleado para el estudio de las células apoptóticas en el FAE de placa de Peyer de conejo**

Grupos A vs. B	U de Mann-Whitney p = 0, 054 ns
Grupos B vs. C y D	Test de Kluskal-Wallis p = 0, 038 (*)
Grupos D vs. E y F	Test de Kluskal-Wallis p = 0, 168 ns

Aunque no estadísticamente significativo, existe una disminución en las figuras de apoptosis en los tres primeros grupos experimentales (B, C y D), con un máximo a los 7 días luego de la última dosis (grupo E) y un aumento, a los 15 días tras la inmunización.

**4.2.5. Proliferación de células epiteliales en criptas asociadas al folículo y diferenciación de las células M**

Los correspondientes resultados pueden visualizarse en la Tabla 15. A su vez, las imágenes obtenidas con el empleo del microscopio de barrido láser confocal son similares a las criptas de apéndice cecal (Foto 6)

**Tabla 15**  
**Longitud de las criptas, proliferación, diferenciación y solapamiento en placa de Peyer de conejo, a través del uso de LCSM**

<b>Longitud de criptas</b> (Número de núcleos)	<b>Proliferación</b> (Ki67- clon MIB1)	<b>Diferenciación</b> (Vimentina)	<b>Solapamiento</b> (Overlapping)
Mediana/Rango	Mediana/Rango	Mediana/Rango	Mediana/Rango
<b>14</b> 11 – 26	<b>14</b> 9 – 18	<b>5</b> 4 – 9	<b>9</b> 4 – 12

**4.2.6. Patrones de glicosilación y eventuales cambios en los residuos de sacáridos**

En placa de Peyer, aun con menor expresión tingible, no fueron registradas diferencias intergrupales con las cuatro lectinas utilizadas, cuyas intensidades tintoriales son expuestas en la Tabla 16.

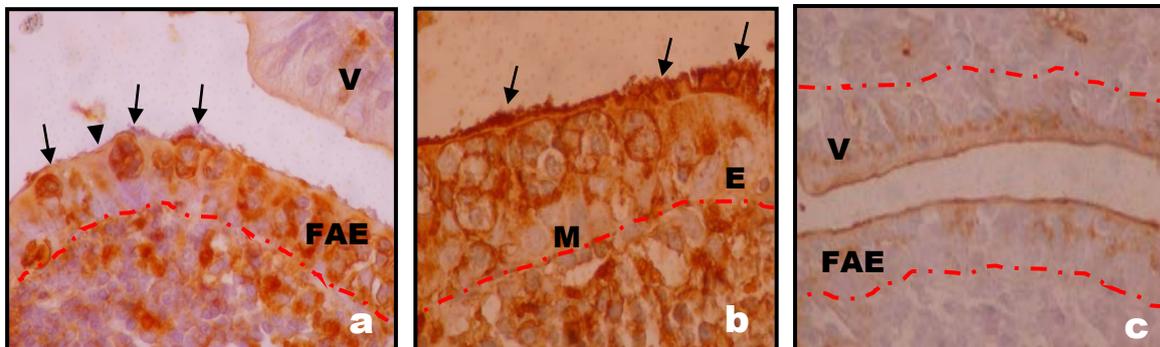
**Ulex Europaeus** mostró intensa tinción a nivel de las células M, más marcada en la **superficie**. Los enterocitos del domo y de las vellosidades adyacentes resultaron negativos (Foto 13a).

Por su parte, **Dolichos Biflorus** exhibió similar patrón tintorial que UE-1, más allá de que la tinción del mucus superficial fue fuertemente positiva (Foto 13b).

Peanut Agglutinin fue evaluada como negativa, mientras WGA reveló tinción difusa en el mucus superficial del FAE y de las vellosidades así como en todas las células epiteliales a nivel apical (Foto 13c).

**Tabla 16**  
**Intensidad de la expresión de lectinas en el FAE de placa de Peyer**  
**cunicular**

Lectinas empleadas	FAE de Placas de Peyer		
	Cél. M	Enterocitos	Mucus
UE-1	+++	-	+++ (Cél. M)
DBA	++	+	+++
PNA	-	-	-
WGA	+	+	+



**Foto 13. Lectinas en FAE de placa de Peyer**

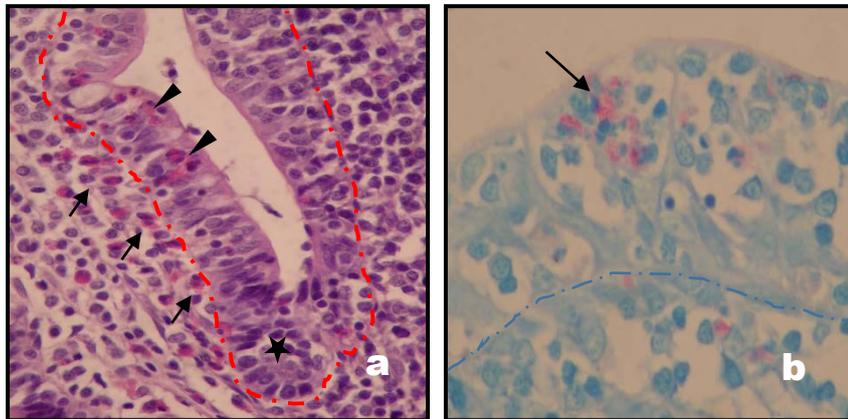
**(a)** UE-1. Positividad en las células M y refuerzo en porción superficial de ellas (flechas) y negatividad en los enterocitos (puntas de flechas). Las células epiteliales de la vellosidad (V) no resultaron reactivas. En rojo, membrana basal del FAE. 250x. **(b)** DBA. En la parte izquierda de la imagen son detectadas células M con positividad a la lectina, mientras que los enterocitos aparecen poco reactivos. El mucus superficial muestra tinción intensa (flechas). 400x. **(c)** WGA. Tinción positiva y no específica en mucus superficial y porción apical de células epiteliales del FAE y vellosidades (V). 250x. La membrana basal se halla señalizada en color rojo

#### 4.2.7. Cambios histopatológicos

##### 4.2.7.1. Leucocitos eosinófilos

Cualitativamente, al igual que en apéndice cecal, fueron reconocidos en el grupo control A y en los grupos experimentales B y C, cúmulos de 15-20 eosinófilos en las bases de las vellosidades interdómicas, próximos a las criptas, áreas T y vénulas post-capilares de endotelio alto. Resultó notoria la existencia de eosinófilos aislados o dispuestos en grupos poco numerosos, entre las células epiteliales columnares que tapizan las bases de las vellosidades. La ubicación en las bases de las vellosidades y en el epitelio fue considerada una característica habitual (Foto 14a).

Cuantitativamente, en los grupos experimentales D, E y F, fue detectado aumento de eosinófilos tanto en los sitios especificados (Tabla 17), como en la lámina propia dómica y en el FAE, entremezclados con las células inmunocompetentes (Foto 14b).



**Foto 14. Eosinófilos en el FAE y criptas de placa de Peyer**

**(a)** Base de la vellosidad que evidencia escasa cantidad de eosinófilos (flechas negras). Algunos de ellos se hallan en el epitelio columnar (cabezas de flechas). Con línea roja discontinua se indica la membrana basal y con asterisco negro, la cripta. H&E 250x. **(b)** Cúmulos de eosinófilos (flechas) en el FAE, entremezclados con células linfoides. En línea discontinua azul se señala la membrana basal. Tinción de Giemsa 600x.

**Tabla 17**  
**Frecuencias absolutas observadas de eosinófilos, localizados en áreas interfoliculares y crípticas de placa de Peyer de conejos sometidos a diferentes tratamientos, a nivel interfolicular**

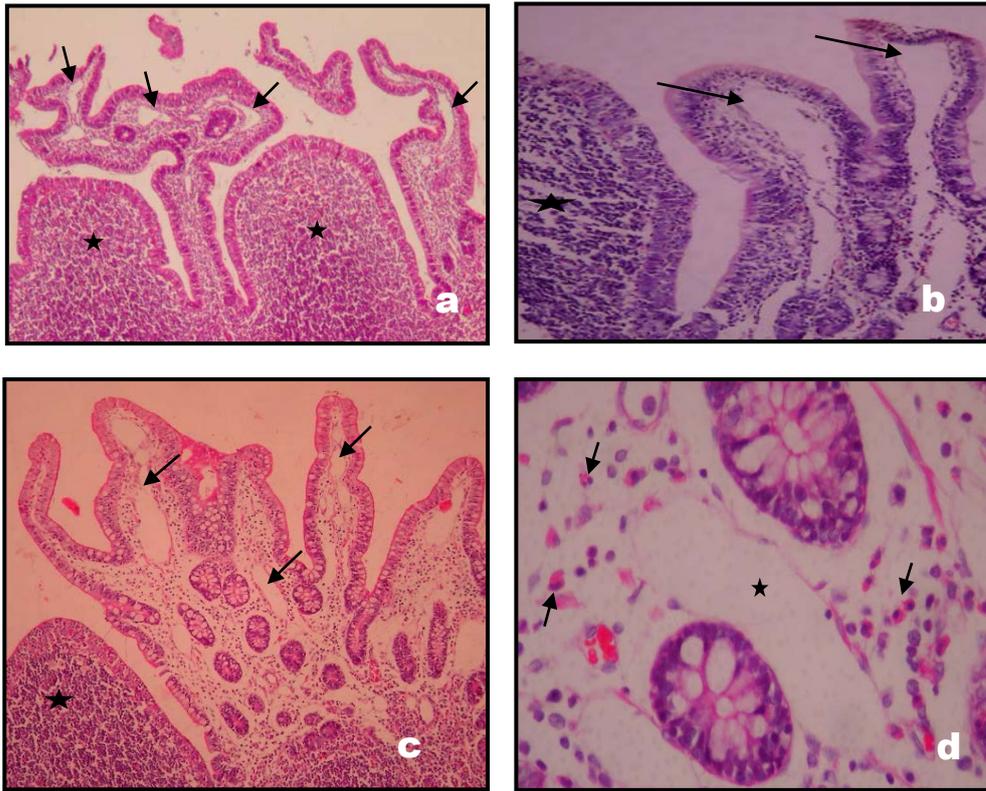
	Densidad de Eosinófilos			Total
	Habitual	Leve	Moderada	
<b>Grupo A</b>	50	0	0	50
<b>Grupo B</b>	40	10	0	50
<b>Grupo C</b>	30	20	0	50
<b>Grupo D</b>	10	40	0	50
<b>Grupo E</b>	10	20	20	50
<b>Grupo F</b>	0	20	30	50
<b>Total</b>	140	110	50	300

$$\chi^2 = 255,7 \quad p = 0,0001$$

#### 4.2.7.2. Edema y dilataciones vasculares linfáticas y sanguíneas

En placa de Peyer, fueron observados vasos capilares linfáticos con luces perceptibles, rodeados de un estroma de aspecto laxo en los animales de los grupos A y B. Este escenario descrito, válido para las vellosidades interdómicas fue considerado el habitual para los mismos (Foto 15a).

En el grupo C, la situación fue similar, aunque en algunos animales existió edema de grado leve (Foto 15b). En cambio, los conejos del grupo D exhibieron edema y linfangiectasias, que aumentaron en orden creciente según pertenecieran a los grupos E o F. Al igual que en apéndice cecal, las ectasias vasculares capilares resultaron de escasa trascendencia (Foto 15c y d y Tabla 18).



**Foto 15: Cambios histopatológicos en placa de Peyer de conejo**

**(a)** Vellosoidad interdómica con vasos linfáticos conspicuos (flechas negras). El asterisco indica el domo. H&E 100x. **(b)** Grupo C con linfangiectasias leves (flechas) y algo de edema en el corion circundante. El asterisco indica el domo. H&E 100x. **(c)** Linfangiectasias (flechas negras) y edema moderado a nivel vellositario. El domo vecino es señalado con un asterisco. H&E 100x. **(d)** A mayor aumento se reconoce un capilar linfático sumamente dilatado (asterisco), rodeado de estroma edematoso, con grupos de eosinófilos (flechas). H&E 400x.

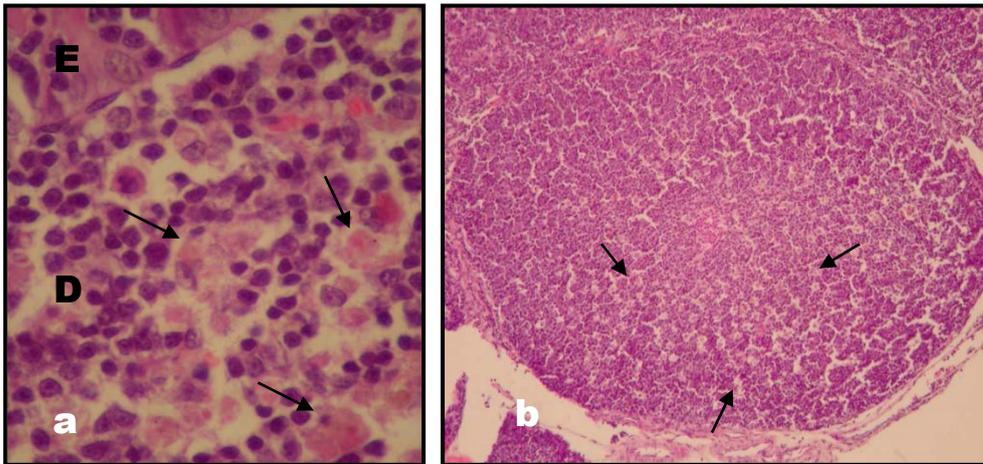
**Tabla 18**  
**Frecuencias absolutas observadas de edema y linfangiectasias en vellosidades de placa de Peyer de conejos ante diferentes tratamientos**

	Edema y linfangiectasias			Total
	Habitual	Leve	Moderado	
<b>Grupo A</b>	50	0	0	50
<b>Grupo B</b>	40	10	0	50
<b>Grupo C</b>	20	25	5	50
<b>Grupo D</b>	10	30	10	50
<b>Grupo E</b>	10	20	20	50
<b>Grupo F</b>	0	20	30	50
<b>Total</b>	130	105	65	300

$\chi^2 = 182,7$        $p = 0,0001$

**4.2.7.3. Macrófagos**

En la placa de Peyer, los macrófagos encontrados fueron los dómicos subepiteliales y en los centros germinativos foliculares. En los animales de los grupos D, E y F hubo aumento de estas células en ambas localizaciones. No fueron visualizados los cúmulos macrofágicos ubicados en los laterales de los folículos linfoides, como fuera descrito en apéndice cecal (Foto 16).



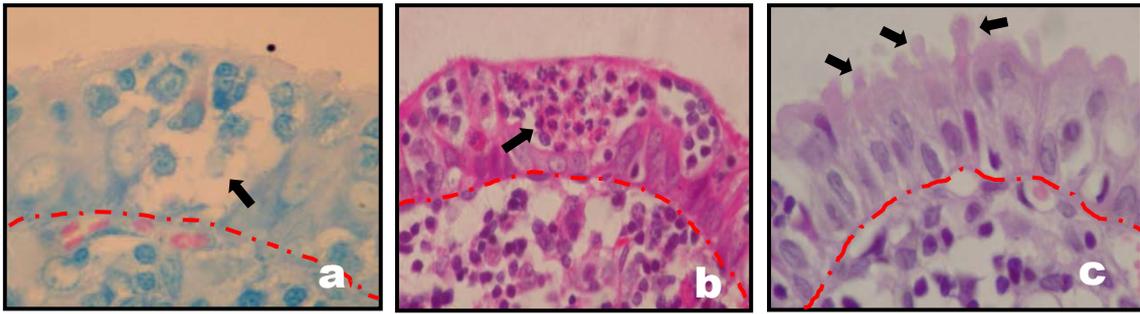
**Foto 16. Macrófagos en la placa de Peyer de conejo**

**(a)** Domo de placa de Peyer (D), próximo al epitelio (E), que evidencia numerosos macrófagos (flechas negras), algunos formando pequeños cúmulos. H&E 400x. **(b)** Fólculo linfoide con abundantes macrófagos de “tipo cuerpo tingible” (flechas). H&E 100x.

#### 4.2.7.4. FAE

En el grupo E y, en menor medida, en el F (1 semana y 15 días tras la segunda inmunización, respectivamente), los espacios correspondientes a los bolsillos de las células M fueron visualizados voluminosos, edematosos, con células inmunocompetentes aisladas y abundantes cuerpos apoptóticos. Además, se apreció relevante cantidad de eosinófilos, habitualmente no hallados a este nivel (Fotos 17a y b).

Asimismo, en la porción superior del FAE de estos animales las células epiteliales conservaban su forma cilíndrica, no presentaban linfocitos entre ellas y evidenciaban abundantes bullas, en mayor número que en los animales controles e inmunizados. Las células que exhibían estas protrusiones apicales eran delgadas, con citoplasmas de aspecto condensados y núcleos pequeños y picnóticos (Foto 17c).



**Foto 17. Histopatología del FAE de placa de Peyer en Grupos E y F**

**(a)** Bolsillos de las células M del FAE, voluminosos y con células inmunocompetentes separadas y con espacios entre ellas (flechas). Giemsa 600x. **(b)** Numerosos eosinófilos (flecha) relleno los bolsillos de las células M. H&E 400x. **(c)** Ápice del FAE con numerosas bullas superficiales (flechas). H&E 600x. Las líneas discontinuas rojas indican la membrana basal que separa FAE del domo.

## 5.1 - Referencias generales

---

En la Introducción fue destacada la relevancia de conocer la constitución de una superficie o barrera mucosa, sus mecanismos defensivos y situaciones intensificadoras o debilitadoras, así como la de hacer específico foco en la del tubo digestivo. Asimismo, se puso el acento en el singular trípode inmune-homeostático, red de interacciones generadoras de un microambiente flexible y dinámico, integrado por la microbiota bacteriana comensal, un epitelio con secreciones reforzadoras y el sistema inmune mucoso (SIM) – el mayor órgano inmune humano, pues aloja el 80% de las células inmunes - (Goto et al., 2012; Wittkopf et al., 2014).

Fue remarcado allí que era preciso, a fin de que los componentes de este trípode interactuaran y pudieran funcionar la exclusión y la inmunosupresión, que pequeñas cantidades de antígenos lumbinales atravesaran la barrera mucosa y contactaran con las células inmunocompetentes (Mestecky et al., 2015; Sehgal et al., 2017). Además, como tal traslado debía ser controlado, evitando lo deletéreo de su acceso masivo, fue subrayado que dicha tarea acontecía en localizaciones anatómicas específicas: apéndice cecal, placas de Peyer (íleon terminal) y nódulos linfoides aislados. Ello condujo a centrar la atención en el epitelio cilíndrico simple designado **FAE** (*follicle associated epithelium* o epitelio asociado al folículo) que, constituido primordialmente por **enterocitos** y **células M** (membranosas, *microfold*), tapizaba la cara convexa o superficie semiesférica de los domos (Rescigno, 2001; Wittig et al., 2003; Newberry et al., 2005; Jung et al., 2010; Ohno, 2016; Kimura 2018)<sup>1</sup>.

En el aludido contexto:

- ❖ el presente trabajo de tesis escudriña morfológicamente el FAE en apéndice cecal y en placas de Peyer (íleon terminal) cuniculares mediante los materiales y medios más adecuados a disposición
- ❖ el conejo fue seleccionado como modelo biológico porque:

---

<sup>1</sup> Las formas penta-hexagonales son las más adecuadas para recubrir superficies no aplanadas pues no dejan intersticios que el contenido luminal pueda aprovechar para acceder a los tejidos internos, con perniciosas consecuencias orgánicas (Wagensberg, 2013)

- ✓ este mamífero lagomorfo guarda evolutivamente mayor relación con primates que con roedores, ofreciendo, a la par, ventajas experimentales por sus similitudes anatomofisiológicas con el ser humano, de provecho esto para el estudio de determinadas enfermedades que lo afectan (Schnupf et al., 2012; Haines, 2016)
- ✓ su GALT es mucho más abundante que en otros mamíferos y el FAE aloja gran cantidad de células M (45%), a diferencia de murinos y humanos que exhiben allí apenas un 4% (Wolf et al., 1984; Pappo et al., 1989; Ermak et al., 1994; Haley, 2003; Cesta 2006)
- ✓ los filamentos intermedios citoplasmáticos de las células M reaccionan al anticuerpo monoclonal anti-Vimentina, un marcador fidedigno y universal que las identifica (Gebert et al., 1992; Jepson et al., 1992 y 1993) y, el aún controvertido origen, diferenciación y eliminación de las células M ofrece una atrayente faceta investigativa, entre otras
- ✓ ***la histopatología, aquí central por el enfoque morfológico, es “gold standard” para el estudio de su respuesta inmune*** (Schnupf et al., 2012), dada la carencia en el mercado de reactivos anti-conejo. Ello obedece a que este animal se emplea para producir inmunoglobulinas con alta afinidad por el antígeno por su mayor diversidad en comparación con otros animales en virtud del mecanismo madurativo periférico de la progenie de linfocitos B
- ❖ el número de animales en cada grupo, afín con un mínimo aceptable según criterios estadísticos y éticos (Montenegro et al., 2011), respondió a posibilidades operativas. Empero, la limitada disponibilidad de machos y hembras así como ulteriores inconvenientes procedimentales condujeron a remitir al Capítulo 8 (Anexo) acotadas diferencias intersexuales, estimadas de interés
- ❖ su adultez, sustentada en el peso de los animales, garantizó la madurez de la barrera mucosa intestinal (Friedenstein et al., 1965)
- ❖ el alojamiento, la exposición ambiental y la alimentación estuvieron en concordancia con lo aconsejable habitual, experimental y éticamente

- ❖ la eutanasia con pentobarbital sódico endovenoso se ajustó a lo aconsejado en la bibliografía (Green, 1979; Bolant et al., 1990; Close et al., 1997)
- ❖ los criterios bioéticos y de bioseguridad fueron satisfechos
- ❖ la administración de ovoalbúmina (empleada porque no integra la dieta habitual del conejo y, por ende, el animal no posee anticuerpos contra ella) con adyuvante de Freund para potenciar su acción inmunogénica genera micelas, producto de la solubilidad antigénica en aquél, que son retenidas en el sitio de inoculación. Allí actúan como factor quimiotáctico, atraen macrófagos y células presentadoras de antígenos, facilitan la fagocitosis y estimulan una respuesta inmune celular TH<sub>1</sub>, predominante sobre la humoral TH<sub>2</sub>. Así, la inyección subcutánea en conejo de albúmina humana emulsificada en adyuvante completo de Freund, produjo abundante IgG en mucosa oral. Ésta, aunque retardó la penetración de un definido antígeno en esa zona, desencadenó un aflujo de neutrófilos cuyas enzimas devinieron potenciales alteradores de la permeabilidad de la barrera mucosa y posibles facilitadores de la entrada de otros antígenos (Brandtzaeg et al., 1977). Valiéndose de *Shigella flexneri* y adyuvante e incorporándolos por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular y suplementándolos con un único desafío antigénico oral, otros obtuvieron disminución de la IgG sérica e incremento de la IgA en las secreciones intestinales (Keren et al., 1980; Keren et al., 1983; Keren et al., 1985; Keren et al., 1988).
- ❖ las 24 horas así como los 7 y 15 días fueron valorados tiempos eutanásicos apropiados a fin de evaluar si esos lapsos afectaban a algunos de los ítems estudiados, resultando a la postre de suma utilidad para el proceso inflamación-reparación
- ❖ la focalización en dos sitios inmunoaductores de los cuatro posibles obedeció a las semejanzas histológicas existentes entre apéndice cecal y saco redondo, y entre placa cecal y placas de Peyer (íleon terminal)
- ❖ el empleo de distintos procedimientos cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos (a doble ciego) resultó compatible con necesidades puntuales de cada ítem y se adecuó a

conductas corrientes – según requerimiento y posibilidad – en Histología e Histopatología, y finalmente:

- ❖ ***la opción por la vía parenteral, prácticamente inexplorada hasta la fecha en ambos órganos, y el registro de cambios morfológicos tras desafío antigénico en dos áreas inmunoaductoras claves confluyeron en favor de la originalidad exigible a este tipo de trabajos***

## **5.2.- Resultados particulares**

---

---

La discusión de estos resultados se efectúa por órgano estudiado rescatando en cada uno de ellos los mandatorios ***aportes inéditos u originales*** así como su ***posible derivación médica*** pues, aunque indudablemente indicativa dada la improcedente extrapolación conejo - ser humano, puede revestir utilidad futura para estudios en pacientes.

### **5.2.1. Apéndice cecal**

---

#### **Histología normal**

El apéndice cecal exhibe histológicamente algunos rasgos particulares como folículos linfoides alargados en forma de botellón, áreas T pequeñas y predominio de linfocitos B. Estas características se revelan también en la placa ileal de oveja (Mutwiri et al., 1999; Hein et al., 1989), del ganado vacuno (Yasuda et al., 2006) y en la de cerdos (Pabst et al., 1988) pues estos sitios morfológicos se comportan como órganos linfáticos primarios, análogos a la bolsa de Fabricio de las aves.

En este órgano, de gran tamaño en relación al del animal, proliferan los linfocitos B, diversifican su repertorio, expanden el clon y son seleccionados, de igual modo a lo que sucede en la médula ósea humana (Mage et al., 2000; Sinha et al., 2004; Mage et al., 2006; Sinha et al., 2006). Sin embargo, y de manera privativa en el conejo, resulta preciso para ello la microbiota luminal que, actuando a modo de superantígeno, coadyuva en la diversificación del repertorio preinmune de las inmunoglobulinas (Lanning et al., 2000 a y b; Rhee et al., 2004; Lanning et al., 2005; Shanmugam et al., 2005; Hanson et al., 2008).

A su vez, las numerosas células M cuniculares permiten conjeturar que tal abundancia respondería a la necesidad del conejo de trasladar antígenos lumbinales, especialmente bacterias comensales, que como fuera expresado colaboran en la linfopoyesis B, población mantenida por autoproliferación en la adultez del animal. Además, la extensión a mayor profundidad de sus prietas uniones ocluyentes y zónulas adherentes restringe la motilidad linfocitaria en el epitelio (Gebert et al., 1991).

### **Cambios histopatológicos<sup>2</sup>**

La densidad de **eosinófilos**, aumentada significativamente en D, E y F (desde las bases de los VIMs hasta los tercios medios y apicales vellositarios) respecto de A, B y C (leve y basales en los VIMs) puede implicar que, tras la inmunización empleada, ellos podrían ser reclutados y colonizar áreas donde predomina la renovación celular. Esto se compadecería con los hallazgos reportados en otros modelos experimentales, donde la activación e incremento del número de eosinófilos en médula ósea permaneció alto hasta 60 días después de las inmunizaciones, fueran éstas efectuadas con aluminio o con adyuvante completo de Freund (Chu et al., 2012).

Sin desestimarlos, estas células podrían experimentar mitosis *in situ*, lo que acrecentaría su número con la consiguiente activación y liberación de mediadores, que junto a otros, producirían vasodilatación y edema intersticial, amplificarían la síntesis de matriz intercelular y de fibras conectivas, y provocarían la secreción de mucus. De tal modo, los eosinófilos, con receptores al daño tisular, serían atraídos a los sitios de necrosis/apoptosis originados por la inflamación y colaborarían con la homeostasis tisular intentando reparar los tejidos (Shamri et al., 2011). Todavía más, al aumentar podrían irrumpir en el epitelio llegando a producir, en casos extremos, despeño hacia la luz.

Al mismo tiempo, su secreción de proteínas enzimáticas líticas y citoquinas pro-inflamatorias (factor de necrosis tumoral; interleuquinas 1 y 6) contribuiría al deterioro de la función de la barrera epitelial. En tal caso, no se excluye la eventualidad de sangrados posteriores, pérdida de proteínas y exposición de las células inmunes de la lámina propia a potenciales noxas lumbinales,

---

<sup>2</sup> La priorización de este ítem en la Discusión obedece a que conlleva consideraciones necesarias para los restantes.

hechos perceptibles en la enfermedad celíaca, la colitis ulcerosa y las alergias digestivas del lactante (Fillon et al., 2009).

De sumarse al susodicho aumento: (1) la notoria colonización en los grupos D, E y F de los sectores más apicales y yuxtaluminales de las VIMs, (2) su asociación al edema apical (ver más adelante), (3) las linfangiectasias, (4) la cercanía a plasmocitos y macrófagos, (5) la hipertrofia e hiperplasia de las células caliciformes, y (6) las bandas de fibrosis en el corion superficial, podría hablarse de una respuesta inflamatoria donde los eosinófilos coadyuvarían en todas sus etapas así como en la de reparación.

Además, su relación con la hipertrofia e hiperplasia de las células caliciformes y el esperable acrecentamiento de la secreción mucosa, podría favorecer la multiplicación de bacterias Gram (+), el desarrollo de disbiosis (desequilibrio de la distribución intestinal de la microbiota y de su actividad metabólica) y la ruptura del trípole inmune-homeostático.

Asimismo, al compartir el mismo nicho que los plasmocitos y macrófagos, secretores de factores anti-apoptóticos y de supervivencia para las células plasmáticas, bien podrían modular la respuesta inmune mucosa, excediendo su rol de células pro-inflamatorias (Chu et al., 2014).

Esta proximidad entre eosinófilos, macrófagos y plasmocitos, más su vecindad a las células apoptóticas, indicaría auxilio en la regeneración celular, la depuración de cuerpos apoptóticos y la fibrosis, producto de la estimulación fibroblástica y de la secreción de TGF- $\beta$  (Kim et al., 2010). Ello resulta apreciable frecuentemente en la esofagitis eosinofílica y la colitis ulcerosa, donde una exagerada reparación provocaría engrosamiento parietal y estenosis así como alteración de los plexos nerviosos y de la motilidad (Odze et al., 2009).

Por su parte, la densidad leve de eosinófilos justificaría su presencia en microambientes con preeminencia usual de proliferación celular a causa de producción de citoquinas y de factores de crecimiento, relevantes para su acumulación, supervivencia y diferenciación (Lee et al., 2010).

El **edema** – localizado en los ápices de las VIMs – se reveló leve en D y moderado en E y F mientras las **linfangiectasias** fueron visualizadas en todas las capas del órgano de los grupos D, E y F, y las ectasias sanguíneas, poco notorias.

Si bien en ratas sometidas a estrés fue detectada menor inflamación en las placas de Peyer ileales que en las vellosidades (Zhang et al., 2017) y el score inflamatorio en estas vellosidades podría ser comparable al edema aquí registrado en los VIMs, debe tenerse en cuenta en ese cotejo que se trata de especies diferentes.

En suma, los cambios histopatológicos en los animales tratados, de índole predominantemente inflamatoria (edema, linfangiectasias e infiltrados celulares a predominio eosinófilo), mostraron un incremento progresivo en los grupos C y D en tanto que en el grupo E, a pesar de la persistencia inflamatoria, pusieron de relieve evidencias iniciales de fibrosis e hiperplasia de las células caliciformes, más acentuadas en F, que corresponderían a una etapa de reparación en ciernes.

Siempre dentro del sector en análisis, la porción dómica tapizada por el FAE así como los folículos linfáticos subyacentes se manifestaron refractarios al común de estas modificaciones.

Estos resultados en apéndice cecal fueron similares a los comunicados en ciego y recto de conejos mediante método análogo (Bassan et al., 2002; Roma et al., 2004; Vinuesa et al., 2005). Y lo fueron a pesar de que en ellos se recurrió como adyuvante al hidróxido de aluminio que polariza la respuesta inmune en el sentido TH<sub>2</sub> y no, al adyuvante de Freund que lo hace en sentido TH<sub>1</sub> (Gottwein et al., 2001), como se hizo en esta ocasión.

Parecidas alteraciones fueron reportadas en ileítis lagomórficas inducidas por inoculación intragástrica de microbios (Sundaram et al., 1999) u oclusión quirúrgica de intestino delgado (Kabaroudis et al., 2003) y en enfermedades intestinales inflamatorias (Ozde et al., 2015).

Las repercusiones histopatológicas producidas por noxas distantes al tubo digestivo como falla cardíaca o injuria traumática cerebral (Zhang et al., 2017) revelan que los patrones inflamatorios aparecerían así se hallare la noxa en aquél o alejada del mismo (Peuhkuri et al., 2010).

Resumiendo, podría decirse que todos estos cambios inflamatorios tornarían más laxas las uniones intercelulares lo que, sumado a una mayor extrusión epitelial, facilitaría la apertura de brechas que habilitarían el acceso del contenido luminal (Sánchez de Medina et al., 2014; Goll et

al., 2015). Por consiguiente, tal ingreso masivo afectaría la barrera mucosa con efectos deletéreos perpetuadores de la inflamación local.

A su vez, los no cuantificados **macrófagos** fueron diferenciados cualitativamente en tres variedades. Una, mayoritaria, fue localizada a nivel subepitelial en el domo y en la vecindad de las células M; otra, vimentina (-), con apoptosis y sin gérmenes, lo fue en la zona oscura de los centros germinativos foliculares junto a grandes linfocitos (macrófagos de cuerpo tingible), y la restante<sup>3</sup>, patognomónica de las hembras en apéndice cecal (ver Capítulo 8 – Anexo - Apartado 8.2), vimentina (+), sin apoptosis, con bacterias fagocitadas en sus citoplasmas y probablemente células maduras, fue identificada lindante con las áreas T, cercana a las vénulas post-capilares de endotelio alto y conformando grandes cúmulos en los sectores laterales foliculares.

***Estos cúmulos macrofágicos constituyeron un aporte morfológico original de esta tesis hasta la aparición del reporte de Beyaz et al. (2017).***

Sin embargo, a diferencia de este grupo de investigadores que no empleó Vimentina y que los consideró células fagocíticas de cuerpos apoptóticos, se piensa en este trabajo que, además de ese rol, podrían vincularse con la adecuación de antígenos tras su captación por las células M y previo a su destino folicular. Tal presunción se basa en: (1) el requerimiento de determinadas poblaciones bacterianas por el conejo, y (2) su presencia donde el animal diversifica su repertorio de inmunoglobulinas y mantiene constante la población de linfocitos B. Localizados estratégicamente en la vecindad de las células M dómicas, estos macrófagos fagocitarían bacterias lumbales, migrarían, luego, hacia los folículos linfoides y allí adquirirían no sólo madurez fenotípica sino que aportarían las bacterias necesarias para los procesos inmunes.

### **Área del FAE**

El área del FAE<sup>4</sup> disminuyó en los grupos C y D, recuperándose en E y F. La eutanasia inmediata a la inmunización (C y D) produjo descensos congruentes con una etapa de agresión

---

<sup>3</sup> Los filamentos intermedios de Vimentina en los macrófagos indican madurez y activación celular, son estabilizadores citoplasmáticos, ancoran organoides y tienen expresión dinámica. Los de disposición periférica actúan como receptores de anclaje para las bacterias, luego fagocitadas y destruidas (Mor-Vaknin et al., 2003; Mak et al., 2016)

<sup>4</sup> A nivel subepitelial, el apéndice cecal posee mayor población de linfocitos B y menor de linfocitos T que las placas de Peyer (Ermak et al., 1990)

mientras que aquellas mediatas (E y F) mostraron restauraciones más ligadas con una etapa de reparación donde la acción del agente injuriante habría cedido tras varios días de haber sido inyectado el animal. El susodicho descenso del área podría atribuirse a una disminución de los LIEs de los bolsillos, en particular de los blastos, precursores de plasmablastos secretores de IgA, ya que los enterocitos y las células M no experimentaron cambios. A su vez, su aumento ulterior podría coincidir con una mayor colonización epitelial linfocitaria.

### **Área de los bolsillos membranosos de las células M**

El área de los bolsillos membranosos de las células M repitió el patrón descenso (inflamación) - ascenso (reparación) anteriormente señalado. Su disminución podría atribuirse al número linfocitario y su aumento, a mayores células allí ubicuas o a edema.

Se resalta aquí que el empleo conjunto de vimentina y microscopio láser confocal **permitió determinar el aspecto columnar irregularmente hexagonal o pentagonal adoptada por las células M, forma que no deja brechas y responde, además, a su contribución a la barrera mucosa (ver Capítulo 8 – Anexo - Apartado 8.4).**

Más aún, **el área de los bolsillos membranosos de las células M<sup>5</sup> por no haber sido abordado con anterioridad coadyuva, con otras aportaciones, a la originalidad de esta tesis.** Por ello, se omitió estimar el porcentaje del FAE ocupado por las células M pues ya lo fue por otros autores (Pappo and Ermak, 1989; Gebert et al., 1992), quienes establecieron que el conejo posee un 40-50% de células M, determinando, asimismo, una mayor eficiencia en la captación de partículas en relación a modelos murinos.

La bibliografía reporta cambios en el FAE y en las células M en distintos animales. Así, ratas inyectadas subcutáneamente con indometacina mostraron mayor longitud del FAE y aumento de las células M (Kucharzik et al., 2000b; Lügering et al., 2004). Por su parte, ratones mantenidos al nacer en un medio libre de gérmenes y transferidos luego a un hábitat normal revelaron aumento del área cubierta por células M (Smith et al., 1987). Similares resultados fueron obtenidos al

---

<sup>5</sup> Los bolsillos basolaterales de las células M son espacios intersticiales inter-epiteliales que no acumulan productos secretorios ni desechos celulares limitándose a alojar células inmunocompetentes. El aumento o disminución de este espacio es mucho más dinámico y rápido que el incremento o decremento de células completas.

infectar oralmente ratones libres de gérmenes con Salmonella (Savidge et al., 1991). En conejos, la administración endovenosa de dexametasona generó disminución de células M (Roy et al., 1992). No obstante, en conejos receptores de nutrición parenteral a largo plazo fue reportado lo opuesto (Fujimura et al., 2007). Dable es apreciar en todos ellos, que no utilizaron el material y/o el método aquí usado ni formulado, que la variación ocurrió a nivel del contenido luminal o que fue consecuencia de medicamentos inductores o aliviadores de la inflamación.

### **LIEs**

Los LIEs en los bolsillos de las células M fueron cuantificados y en todos los grupos analizados, fueron mayoritariamente de gran tamaño (10  $\mu$ m o más).

También en su totalidad, hubo disminución del número linfocitario que, al margen de la significativa merma blástica en C y D, lo fue particularmente en E y F.

Por consiguiente, el tratamiento habría producido una menor entrada de linfocitos a los bolsillos más una inhibición de la transformación blástica así como una incompleta recuperación homeostática durante las días estudiados.

Dado que el apéndice cecal es el sitio periférico de expansión de los linfocitos B, esta caída blástica, a través del descenso de plasmocitos, bien podría afectar la inmunidad humoral del animal.

Los resultados antedichos coincidieron con la gran cantidad de LIEs intermedios y grandes en los bolsillos de las células M reportada por trabajos realizados en conejos y en otros animales (Shimizu et al., 1967; Owen et al., 1974; Marsh, 1975 a y b; Schmedtje, 1980; Gebert et al., 1991; Gebert et al., 1992; Brandtzaeg, 2004). En cambio, hubo quienes si bien comunicaron su aumento en conejos tras administración oral de una bacteria no intestinal (Borghesi et al., 1996) y en ratas libres de gérmenes luego de colonización microbiana (Yamanaka et al., 2003), no lo hicieron distinguiéndolos por tamaño.

### **Apoptosis**

Las células apoptóticas, cuantificadas de igual modo que los LIES, registraron un decremento leve no significativo en el grupo C; otro, estadísticamente significativo en los animales

con dos inmunizaciones subcutáneas (grupo D). Al cotejar los grupos E y F con el D se detectó un incremento significativo primordialmente por lo sucedido en E ya que en F se apreció un perceptible descenso.

Los cuerpos apoptóticos, por su tamaño pequeño, su forma esférica y la ubicación en los bolsillos de las células M, fueron interpretados como fragmentos de células inmunocompetentes (en su mayoría de estirpe linfocitaria como ya se adelantó) y no, como vestigios de células epiteliales.

Los decrementos apoptóticos en los grupos C y D (etapa de inflamación) podrían atribuirse a que, dado que los bolsillos de las células M son extensiones de los centros germinales según se dijo oportunamente, los linfocitos, en fase efectora durante este período de la respuesta inmune, expresarían factores antiapoptóticos como bcl-2, que aumentaría su sobrevivencia (Yamakana et al., 2001)

Cedida la noxa (etapa de reparación), el sistema inmune mucoso tendería a recuperar su homeostasis, eliminando linfocitos innecesarios a través del proceso apoptótico lo que podría explicar el incremento detectado a los 7 días de la segunda inmunización (grupo E). A su vez, la marcada disminución apoptótica a los 14 días de ella (grupo F) coincidiría con el aumento de macrófagos en el centro folicular y en el domo. Este fenómeno daría cuenta de la existencia de apoptosis y, asimismo, de aclaramiento por fagocitosis lo que impediría la llegada de estos “restos linfocitarios” al epitelio.

Heczko et al. (2001) reportaron disminución de la actividad apoptótica en tubo digestivo de conejos infectados oralmente con cepa enteropatogénica de *Escherichia coli*, interpretándola como debida a una menor producción de factores pro-apoptóticos o a un mayor aclaramiento por la llegada de numerosos macrófagos.

A este respecto, corresponde agregar que la apoptosis es un proceso detectable tanto en la fase de iniciación cuanto en la de resolución final de la respuesta inmune ya que no sólo mantiene así un estricto número de linfocitos en el organismo (Giovannetti et al., 2008) sino que resulta específicamente útil para la modulación de la respuesta inmune puesto que implica la eliminación

de células previamente activadas y descartables y la liberación de factores anti-inflamatorios, mecanismo éste muy ligado al proceso de regeneración tisular (Arandjelovic et al., 2015).

Una apoptosis linfocitaria ineficiente en apéndice cecal podría afectar la función de barrera mucosa con la correspondiente translocación de bacterias intestinales potencialmente patógenas y de endotoxinas, las que al activar la respuesta inflamatoria, aumentarían el daño celular y harían ingresar en un círculo vicioso de difícil control (Fan et al., 2009). Además, podría alterar la respuesta inmune secretoria en la mucosa digestiva, donde es necesaria la interacción entre linfocitos B y T y otros territorios mucosos donde favorecía su colonización por gérmenes patógenos. Esto último se basa en que el referido órgano cunicular, de gran tamaño, es el sitio principal de generación de células B, mantenidas por auto-renovación en este GALT en presencia de una microbiota luminal adecuada. Las células seleccionadas son preservadas de la apoptosis, realizan cambio de isotipo hacia IgA y se alojan no sólo en la lámina propia del tubo digestivo sino en lugares distantes como las glándula salival y mamaria y los tractos respiratorio y reproductivo (Pospisil et al., 1998; Mage et al., 1999).

### **Patrones de glicosilación y eventuales cambios en los residuos de sacáridos**

A pesar de existir cambios inflamatorios y algunos signos de reparación no fueron observadas modificaciones en los patrones de glicosilación.

Cualitativamente, las células M revelaron en su superficie y bolsillos laterales L-fucosa (monosacárido) que no fue revelada en enterocitos ni en el mucus. La N-acetil- galactosamina (derivado de monosacárido), fue más notoria que en los enterocitos vecinos y estuvo ausente en mucus.

Así como la D-galactosa estuvo ausente en células M, enterocitos y mucus, la N-acetil- glucosamina (derivado de monosacárido) fue evidenciada intensamente en dichos componentes.

Si bien las células del FAE guardan cierto parecido morfológico esta faceta diferiría en sus marcadores de superficie sugiriendo una mayor adaptación en apéndice cecal al microambiente bacteriano variable (Jepson et al., 1993; Gebert et al., 1993; Lelouard et al., 1999; Lelouard et al., 2001). Además, la diferente composición de la membrana apical de las células M resulta de

utilidad para el empleo de vacunas y antígenos en enfermedades autoinmunes y podría explicar por qué algunos gérmenes, toxinas y priones se unen a ellas y explotan esta vía para infectar el organismo.

### 5.2.2 Placas de Peyer (íleon terminal)

---

#### Histología normal

Existen algunas diferencias morfológicas de placa de Peyer en relación a apéndice cecal. Una de ellas es la presencia de folículos linfoides más esféricos, áreas T de mayor superficie y con mayor cantidad de linfocitos T (Haines et al., 2016). Otra reside en el FAE que se halla en mayor contacto con el contenido luminal y cubierto parcialmente por vellosidades elongadas y acodadas hacia el domo (Faulk et al, 1971).

En contraste, el epitelio del apéndice cecal se encuentra separado de la luz por las grandes vellosidades interdómicas en su casi totalidad (Snipes, 1978; Cesta, 2006).

Tal como fuera adelantado en apéndice cecal, esta histoarquitectura indicaría que placa de Peyer funcionaría más como un órgano linfático secundario que como generador de linfocitos B.

#### Cambios histopatológicos

Algunos de los cambios histopatológicos referidos a **edema, linfangiectasias y macrófagos** dómicos e intrafoliculares son similares a los previamente reportados y debatidos en apéndice cecal. Empero, resulta pertinente resaltar que los dos primeros mostraron mayor intensidad a nivel ileal (grado moderado), lo que indicaría una mayor respuesta a la inmunización subcutánea en esta localización.

Puede decirse, entonces, que los cambios histopatológicos hallados son los descritos en ocasión de inflamación intestinal (Jiminez et al., 2015).

Por su parte, los **leucocitos eosinófilos**, adoptan una ubicación similar a los apendiculares. Tal proximidad a las áreas T y a las criptas asociadas al folículo, confirman su participación tanto en la renovación epitelial como en la respuesta inmune, colaborando en el reforzamiento de la barrera mucosa. En los animales de los grupos D, E y F se reconoció un aumento en las zonas

descriptas, particularmente en la lámina propia del domo y en el FAE llenando los bolsillos de las células M y en reemplazo de los linfocitos en muchos casos. Esto indicaría que, pese que a este nivel no existieron fenómenos reparativos tan marcados como los apendiculares (fibrosis, hiperplasia de células caliciformes), los eosinófilos sumarían su participación en las últimas etapas de la respuesta inmune intentando retomar la homeostasis. Lo que sí fue visualizado es que se aproximaban a los cuerpos apoptóticos en el epitelio o a los macrófagos estromales con material apoptótico en sus citoplasmas. Así, podría conjeturarse que aumentan en áreas de degradación celular, creando quizá un microambiente que mantiene a los macrófagos en un estado de hiporespuesta, pasible de dañar aún más la mucosa y de debilitar la barrera (Mowat et al., 2010).

Como se dijera, el aumento del infiltrado de eosinófilos fue hallado ya en otros órganos del aparato digestivo de conejo ante la sensibilización subcutánea, con mayor intensidad a la aquí descrita y empleando hidróxido de aluminio como adyuvante (Bassan et al., 1999; Roma et al., 2004; Vinuesa et al., 2005). Si bien fue también puntualizado en placa de Peyer de ratones en modelos de hipersensibilidad tipo I (TH<sub>2</sub>) (Mishra et al., 2000), no fueron halladas descripciones de su aumento ni de su participación en el FAE en diferentes patologías.

Discordancias ultraestructurales entre células M de placa de Peyer y apéndice cecal cunicular (bolsillos mal delimitados, con cúmulos linfocitarios más irregulares en tamaño y forma, existencia de uniones ocluyentes y zónulas adherentes extendidas menos en profundidad y dotadas de menor cantidad de hebras sobrepuestas) (Gebert et al., 1991) permiten suponer una mayor movilidad de células inmunocompetentes y el ingreso de eosinófilos.

A los antedichos cambios histopatológicos, cabe sumar la presencia de **bullas apicales** en el **epitelio columnar del FAE**. Estas protrusiones aumentaron en los animales de los grupos E y F (etapa de reparación). Muchas de las células que las portaban evidenciaron citoplasmas condensados, carentes de linfocitos intraepiteliales y núcleos pequeños y picnóticos. Existen autores que, morfológicamente, las han descrito en la fase citoplasmática de ejecución de la apoptosis (Mills et al., 1999). Con posterioridad, otros han especulado al respecto que al contraerse el anillo periférico de actina, crece la presión intracelular y el citoesqueleto se desmantela (Tixeira et al., 2017). Funcionalmente, hay quienes las presumen fuente de reserva de

membrana (Erickson et al., 1976) o bien, de utilidad durante el movimiento celular y la citocinesis (Charras, 2008).

La asociación de bullas apicales con condensación citoplasmática y núcleos pequeños y picnóticos sugiere degeneración celular. Más aún, considerando que estas células se hallan próximas a un capilar sanguíneo puede conjeturarse que están en fase de anoikis, previa a la extrusión (Grossmann et al., 2001; Bullen et al.; 2006). Finalmente, el despeño de células hacia la luz podría abrir brechas en el epitelio (Liu et al., 2013) y facilitar el contacto con el contenido luminal, cuyo ingreso masivo podría resultar deletéreo.

### **Áreas del FAE y de los bolsillos membranosos de las células M**

El **área del FAE** en placa de Peyer experimenta un descenso no estadísticamente significativo. La superficie aumenta en la etapa de reparación superando los valores de los animales controles a los 15 días post-inmunización.

Por su parte, el **área de los bolsillos membranosos de las células M** acompaña estas modificaciones.

El incremento significativo del área de los bolsillos de las células M de placa de Peyer de los animales de los grupos E y más aún en los del grupo F (etapa reparativa) podría estar más relacionado con la presencia de edema (aumento del líquido extracelular) y de elementos celulares no habituales en el FAE (eosinófilos) que con representantes de la progenie linfocítica, pues los blastos descienden - como se verá más adelante - y los linfocitos son células pequeñas.

Han sido reportadas aumento de células M en ratones (Smith et al., 1987; Savidge et al., 1981) y en conejos (Borghesi et al., 1999; Man et al., 2008) por cambio del contenido luminal y en ileítis inducida por indometacina en ratas (Kucharzik et al., 2000 (b); Lügering et al., 2004). En contraste, se ha comunicado su disminución en placa de Peyer cunicular tras nutrición parenteral prolongada (Fujimura et al., 2007).

Empero, en este estudio no fue constatada modificación en el número de tales células ya que el área ocupada por ellas se mantuvo en valores similares y la superficie de los bolsillos cambió en relación al área epitelial.

### LIEs y apoptosis

Los numerosos **LIEs** en el FAE de placa de Peyer, distribuidos asimétrica, irregular y fundamentalmente en los bolsillos de las células M, son en su mayoría de gran tamaño (10  $\mu\text{m}$  de diámetro o más) (Faulk et al., 1971; Rowinsky et al., 1984).

Desde los bolsillos de las células M, éstos caen a la luz por la mayor laxitud de las uniones a este nivel, se localizan entre las bridas de mucus y la microbiota luminal donde mantendrían su competencia inmunitaria, según fue comprobado en lagomorfos (Heatley et al., 1984).

El aumento de los blastos y el descenso de las células inmunocompetentes de pequeño tamaño, posterior a ambas inmunizaciones, y su comportamiento inverso en la etapa de reparación fueron notorios. Se ha apreciado morfológicamente que la administración parenteral produjo inflamación, algunos signos de degeneración epitelial y modificaciones en las poblaciones linfocitarias en los bolsillos del FAE pese a ignorarse si las células dendríticas captan el antígeno en el sitio subcutáneo de inoculación o bien sensibilizan linfocitos que luego se dirigen a los GALTs (Clements et al., 2016).

En consecuencia, el referido aumento de blastos podría deberse en parte a una disminución en las **apoptosis** y esto acrecentaría igualmente los precursores de plasmablastos secretores de IgA. Por su parte, su disminución en etapa de reparación podría indicar que el sistema estaría retomando su homeostasis al desaparecer el antígeno, con una mayor muerte celular programada de linfocitos.

Si bien ha sido reportados incrementos de las poblaciones intraepiteliales de placa de Peyer cunicular (Regoli et al., 1994) y en ratas (Yamanaka et al., 2003), los mismos se han registrado después de la administración oral de gérmenes y sin discriminar el tamaño de los linfocitos. También, fue comunicada su disminución en lagomorfos post-tratamiento con dexametasona (Roy et al., 1992).

En general, ha sido demostrado en mamíferos que la cantidad de linfocitos de los sitios inmunoinductores del aparato digestivo depende de su arribo por vía sanguínea, de su salida de la linfa, de la apoptosis y de la proliferación local. A su vez, en cerdos en particular fue observado que su número en la placa ileal (morfológicamente similar al apéndice cecal cunicular) es más

reducido al que accede a la placa yeyunal (Rothkötter et al., 1999). Ello podría explicar por qué los cambios histopatológicos en el FAE de apéndice cecal son menores a los más notables exhibidos por la placa de Peyer.

### **Patrones de glicosilación y eventuales cambios en los residuos de sacáridos**

Excediendo los cambios inflamatorios y algunos signos de reparación no fueron registradas modificaciones en los patrones de glicosilación en esta placa. Por su parte, las células M revelaron cualitativamente en superficie y en sus bolsillos laterales L-fucosa (monosacárido). Por su parte, la N-acetil-galactosamina (derivado de monosacárido), fue muy intensa, tanto en las células cuanto en el mucus superficial.

A este respecto, hubo quienes observaron aumento de la fucosilación de las células en el FAE en placa de Peyer utilizando ratones expuestos a toxina colérica y dos sustancias pro-inflamatorias (dextrán-sulfato de sodio e indometacina), todos ellos agentes inductores de estrés al alterar el medio intestinal (Terahara et al., 2011). Precisamente, la inflamación, por liberación de citoquinas como linfotóxina y TNF- $\alpha$ , puede inducir la reducción en la formación de microvellosidades y esto alterar la función de barrera por mayor posibilidad de pasaje de macromoléculas (Bennett et al., 2014).

## **5.3 Concordancias, discordancias e interacciones entre apéndice cecal y placa de Peyer**

Entre ambos órganos, dable es puntualizar determinadas concordancias, discordancias e interacciones:

### **5.3.1 Concordancias**

Excediendo las ya citadas concordancias morfológicas (en grupos control y experimentales) atribuibles a una similar respuesta orgánica al desafío antigénico parenteral en los tiempos realizados, existe otra, destacable y clave en este trabajo,

La **proliferación criptal y el origen de las células M** constituyen un ítem común a apéndice cecal y placa de Peyer

En el conejo, la proliferación a nivel de las criptas, ha sido estudiada en ciego e intestino grueso (Grant et al., 2001) ***pero no en los órganos aquí estudiados ni en las criptas asociadas al folículo.***

La aportación al respecto reside en que el sector proliferativo se ubica en el tercio medio y el inferior de las criptas, pero en la base misma de ellas o en sus proximidades (vale decir, en la posición 0 o inmediatas) no fueron hallados núcleos Ki-67 positivos.

Considerar a las células de acuerdo a su posición criptal y en dirección ascendente desde la base de ésta hasta la unión cripto-dómica no sólo indica la ubicación de las células sino que informa, además, sobre su edad y su comportamiento. En lo que a edad celular concierne, las más añejas son las más profundas y las más jóvenes son aquéllas halladas según se asciende. En lo que atañe a su comportamiento, las inferiores son las más indiferenciadas y ganan en diferenciación hacia determinado linaje a medida que ganan altura.

Cuando se dividen, las células del compartimiento proliferativo orientan su aparato mitótico paralelo a la luz, de modo tal que las nuevas células se agregan siguiendo la columna de núcleos preexistentes. Tras dos o tres rondas de divisiones celulares y coincidiendo con el sector medio de la cripta, la actividad mitótica se acelera como lo trasunta morfológicamente la acumulación nuclear que protruye hacia la luz<sup>6</sup>. Como se ha dicho, la mediana del último núcleo en registrar proliferación corresponde al localizado en la posición 14.

Asimismo, a nivel de las células en rápida división se manifiestan, inicial y citoplasmáticamente, pequeños trazos filamentosos de vimentina, paralelos al eje mayor nuclear. Esto, más evidente en la vertiente folicular de la cripta, equivale a decir que, en coincidencia con la mayor proliferación celular, los primeros indicios de predeterminación hacia la línea M pueden ser reconocidos.

En relación a su diferenciación:

- a. los primeros indicios de diferenciación hacia la línea M a nivel de las criptas coinciden con las células en etapa divisional más acelerada

---

<sup>6</sup> Estas células son denominadas divisionales en tránsito en las criptas intestinales de rata y ratón (Crosnier et al., 2006).

- b. las células, que completarán su maduración en el FAE y se asociarán a elementos linfoides, están ya pre-determinadas hacia la línea M antes de abandonar la cripta, según se precitara en (a)
- c. las células M cuniculares, en consecuencia, no se originarían de enterocitos diferenciados sino de células madres criptales, de igual modo a que lo hacen otras líneas celulares (enterocitos, células caliciformes y enteroendocrinas)

Por consiguiente, podría señalarse que, **además de lo nuevamente aportado en relación con la proliferación celular en las criptas asociadas al folículo, se suman resultados en conejos obtenidos con vimentina y vinculados al origen de las células M en células madres criptales** (Gebert, 1992; Jepson et al., 1993; Gebert et al., 1997a; Gebert et al., 1999). La diferencia con otros autores sostenedores del origen a partir de enterocitos de las células M, es que ellos trabajaron con técnicas indirectas y lo hicieron en ratas, ratones o línea celular de carcinoma (Bye et al., 1984; Roy, 1987; Lügering et al., 2005; Westphal et al., 2008; Knoop et al., 2009; Hsieh et al., 2010; Ebisawa et al., 2011; Hsieh et al., 2012; Nakato et al., 2016).

Por consiguiente, además de avalar lo antedicho, estos resultados contrarían la diferenciación a partir de enterocitos maduros, por contacto con células inmunes o mediadores solubles, respaldada por otros investigadores (Smith et al., 1980; Bhalla et al., 1982; Savidge et al., 1991; Smith et al., 1992; Kernéis et al., 1997; Borghesi et al., 1999; Nicoletti, 2000). A ello debe agregarse la alta improbabilidad de que una célula madura como el enterocito se desdiferencie para luego volver a diferenciarse hacia otra estirpe celular como la M.

### **5.3.2 Discordancias e interacciones**

---

Las **discordancias cuantitativas y cualitativas** entre ambos órganos analizados indicarían que la administración parenteral de un antígeno podría influir negativamente en la interacción cognada entre linfocitos B y T durante la caracterizada etapa inflamatoria (más acentuada en placa de Peyer).

A su vez, las **discordancias histopatológicas** entre apéndice cecal y placa de Peyer podrían explicarse según lo demostrado en mamíferos, particularmente en el cerdo, según lo ya debatido en el ítem LIEs y apoptosis de la antedicha placa (Rothkötter et al., 1999).

Por último, las **interacciones** podrían llevar a inferir: **(a) la existencia de conexiones entre el SIP y el SIM<sup>7</sup>**, y **(b) una probable alteración o debilitamiento funcional en dos de los componentes del trípole inmune-homeostático (epitelio-SIM), más marcada en placa de Peyer**

Más aún, articulándolo con determinados rasgos histoarquitectónicos de esta última (presencia de folículos linfoides más esféricos, mayor área T, células M con bolsillos más voluminosos y uniones intercelulares más laxas y menos profundas) podría corroborarse el rol predominante de **órgano linfático secundario** de la **placa de Peyer** y el de **órgano linfático primario** del **apéndice cecal cunicular**, en congruencia con lo hallado en cabras, cerdos, ovejas y vacunos (Pabst et al., 1988; Hein et al., 1989; Mutwiri et al., 1999; Yasuda et al., 2006).

#### 5.4. Posible derivación médica

---

La placa de Peyer (GALT) es un centinela que monitorea continuamente el contenido luminal. Traslada pequeñas cantidades de éste y educa a las células T no sólo hacia la inmunotolerancia de los antígenos alimentarios y la microbiota comensal sino hacia la generación de una respuesta secretoria, rica en IgA (Iweala and Nagler, 2006; Kobayashi et al., 2019). Para que ello acontezca se requiere la transferencia eficiente de dichas porciones de contenido luminal hasta el tejido linfóide subepitelial, a través de las células M (Kanaya et al., 2020).

Desde la placa de Peyer y los folículos linfoides solitarios, brazos inmuno-inductores del SIM, las células dendríticas migran hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, barrera eficiente que impide el paso de tales antígenos al resto del organismo, donde la respuesta inmune se amplifica.

---

<sup>7</sup> El SIM, originado filogenéticamente antes que el SIP, es casi tan antiguo como el timo, también endodérmico. Se diferencia del SIP en la composición celular, en los mecanismos de reconocimiento de antígenos y en las funciones efectoras (Nakamura et al., 2018)

En ese marco, probablemente, administrar un antígeno por vía subcutánea alteraría la homeostasis del SIM provocando, a partir de tal desequilibrio, el ingreso descontrolado de antígenos lumbinales, cuyo pasaje masivo a los tejidos internos excedería las barreras mucosas y bloquearía la tolerancia o la colonización de otros órganos.

Lo hasta aquí comunicado y debatido, indicaría una posible alteración de la barrera mucosa (epitelio, células inmuno-competentes), pasible de facilitar el pasaje de bacterias lumbinales o antígenos alimentarios al interior del organismo y de conducir, transcurrido determinado plazo, a la aparición de enfermedades.

Al respecto, en casos de espondiloartropatía humana (patología con manifestaciones reumáticas e inflamación localizada en placa de Peyer y válvula íleo-cecal) fue identificado ultraestructuralmente un aumento de las células M en tal placa (Cuvelier et al., 1994).

Similares hallazgos han sido reportados en pacientes con colitis ulcerosa (Smillie et al., 2019) y con enfermedad de Crohn (Fujimura et al., 1996) revelando que el microambiente inflamatorio o infeccioso induce la población de células M, aumentaría el traslado macromolecular y agravaría aún más la respuesta inflamatoria.

Resulta igualmente atractivo postular la colaboración de las células M y la disbiosis en la patogenia de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea, la diabetes tipo 1, la esclerosis múltiple y el síndrome de Guillain- Barré. A este último, de aparición post-vaccinal o post-infección, se lo ha relacionado con el *Campylobacter jejuni*, que ingresaría al organismo provocando la producción de anticuerpos que reaccionarían de manera cruzada con gangliósidos de la mielina. Precisamente, se ha comprobado en el conejo – animal aquí utilizado- que el *Campylobacter* se adhiere de manera selectiva a las células M de la placa de Peyer, siendo trasladado rápidamente por ellas (Walker et al., 1988).

Por ende, nada ocioso es insistir en la necesidad de conocer la composición de la membrana apical de las células M desde que, además de explicar por qué algunos gérmenes, toxinas y priones se unen a ellas y explotan esta vía para infectar el organismo, podría proveer información para el empleo de vacunas y antígenos en enfermedades autoinmunes.

El requerimiento de estudios morfológicos se torna más indispensable porque aunque se sostiene actualmente que la administración parenteral de una vacuna no induce respuesta inmune en el SIM ni su administración oral en el SIP, existen autores que en saliva, amígdala y fluido vaginal humanos hallaron aumento de IgA o de sus células secretoras tras su inmunización por vía parenteral, con toxoide tetánico, subvirión influenza, polisacárido de meningococo, pneumococo o hemophilus influenza, (Clements et.al, 2016), sin haber abundado, eso sí, en lo histológico ni en lo histopatológico.

Los resultados registrados en este trabajo, desde ya indicativos por no ser extrapolables de conejos a humanos pese a ser *Oryctolagus cuniculus* evolutivamente más cercano que *Rattus norvegicus* y *Mus Musculus* a *Homo sapiens sapiens*, respaldarían tal requerimiento puesto que una administración antigénica parenteral como la llevada a cabo podría:

- (a) afectar no sólo a la mucosa intestinal sino a otras (respiratoria, urinaria)
- (b) plantear si en personas vacunadas subcutánea o intramuscularmente no pudiere suceder lo reportado en este estudio o algo similar y, de ocurrir, si lo hallado podría compatibilizarse con los aumentos antedichos de plasmocitos y de IgA en humanos
- (c) sustentar la viabilidad o no de administrar inmunógenos orales a pacientes que sobrellevan simultáneamente una infección o una enfermedad sistémica, y, de ser ello posible, establecer el momento más conveniente de su empleo

A modo de cierre y en idéntica tesitura, se deja abierto el siguiente interrogante: ¿el cuadro diarreico presentado por un niño días después de una amigdalitis podría estar relacionado de algún modo con lo hallado en esta tesis?

***Responsum est in scientia***

Se valora que la presente tesis doctoral, centrada en lo morfológico (hoy, *gold standard*) y cuyos momentos lógico, metodológico, técnico y teórico (Sabino, 1996; Di Masso et al., 2014) fueron expuestos en los capítulos precedentes:

- acrecienta desafíos antigénicos orales registrados en la bibliografía especializada
- responde y excede a las preguntas - guía de su hipótesis
- describe y explica determinados hechos corroborando<sup>1</sup> lo conjeturado en su hipótesis alternativa (H<sub>A</sub>) mediante resultados obtenidos dentro de un definido contexto (lugar, tiempo y participantes).
- satisface sus objetivos general y específicos a través de método y técnicas acordes (cuantitativas, semicuantitativas y cualitativas)
- recurre a la vía parenteral, prácticamente inexplorada hasta la actualidad en dos órganos inmunoadyuvantes clave

En este marco, ha sido dable apreciar: (a) aportes inéditos u originales y, (b) posible derivación médica

### **Aportes inéditos u originales**

---

#### ***Modificaciones tras desafío antigénico parenteral (vía inusual)***

- ✓ Presencia de folículos voluminosos, áreas T pequeñas y cambios histopatológicos poco acentuados en apéndice cecal indicando que éste, que funge de órgano linfático primario durante los tres primeros meses de vida del animal devendría luego secundario, pero conservaría ciertas características funcionales de primario, y aspectos morfológicos en placa de Peyer compatibles con su rol de órgano linfático secundario
- ✓ Cambios histopatológicos cuanti-cualitativos en apéndice cecal y placa de Peyer (eosinófilos, linfangiectasias y edemas), caracterizadores de dos etapas: inflamatoria o de

---

<sup>1</sup> El austríaco Karl Raimund Popper (1902-1994) seleccionó este término obviando otros más afirmativos y terminantes como: probada, avalada, confirmada, validada, legitimada o verificada. Él hacía base en la falsación (o refutación) cuyo sostén lógico era el argumento: *modus tollendo tolens* (modo que al negar, niega). Aplicado a esta tesis, fue conjeturado que ocurrirían modificaciones. De no haberlas habido, tal hipótesis hubiera sido falsa (doble negación) y se hubiera cumplido el antedicho argumento. En tal caso, la refutación no necesariamente anulaba sino que debilitaba la hipótesis y habría sido necesario replantearla.

agresión en C, D y E y reparadora en ciernes en F. Estas etapas, no reportada en los desafíos orales, son perfiladas en esta tesis desde una mirada morfológica

- ✓ Modificaciones semicuantitativas y cuantitativas en las áreas del FAE y de los bolsillos membranosos de las células M, LIEs y apoptosis en apéndice cecal y placa de Peyer que, compatibles con las susodichas etapas, permitirían definir a tales sitios orgánicos como antígeno-dependientes
- ✓ Patrones de glicosilación y eventuales cambios en los residuos de sacáridos distintos en membrana de células M, en apéndice cecal y placas de Peyer
- ✓ Merma funcional en la barrera mucosa de ambos órganos en dos de los componentes del trípode inmune-homeostático (epitelio y sistema inmune mucoso)
- ✓ Existencia de concordancias, discordancias e interacciones entre ambos órganos
- ✓ Interconexión entre los sistemas inmunes periférico y mucoso que, negada por algunos autores, es afirmada por otros que, empero, no lo hacen desde una perspectiva morfológica como la aquí efectuada

### ***Origen de las células M***

- ✓ Origen de las células M en el conejo a partir de las células madres indiferenciadas de las criptas asociadas al folículo en ambos órganos

### **Posible derivación médica**

---

A este respecto, los resultados, indicativos y no extrapolables de conejos a humanos, sugieren la conveniencia de estudios similares en pacientes, éticamente sustentados, ya que la administración antigénica parenteral podría tener consecuencias indeseables sobre distintas mucosas, en tratamientos vigentes y en desarrollo.

Más aún, sin poderse descartar la influencia de otros factores en una compleja red de interacciones.

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

- Acton S, Reis e Sousa C. Dendritic cells in remodeling of lymph nodes during immune responses. *Immunol Rev* 2016; 271: 221-229
- Arandjelovic S, Ravichandran K. Phagocytosis of apoptosis cells in homeostasis. *Nat Immunol* 2015; 16 (9): 907-917
- Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol* 2011; 8: 36-45
- Azzali G. Ultrastructural and three dimensional aspects of the lymphatic vessels of the absorbing peripheral lymphatic apparatus in Peyer's patches of the rabbit. *Anat Rec* 2000; 258: 71-70
- Atkin-Smith G, Poon I. Disassembly of the dying: mechanisms and functions. *Trends Cell Biol* 2017; 27(2): 51-162
- Bailey-Bucktrout S, Bluestone J. Regulatory T cells: stability revisited. *Trends Immunol* 2011; 32: 301-306
- Bain C, Mowat A. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev* 2014; 260: 102-117
- Bassan N, Carbó M, Roma S, Vinuesa M, Pérez F, Bernardi S. Modificaciones del pH del contenido y de la microflora cecal del conejo por el uso de acidificantes en el agua de bebida. *Therios: Rev Med Vet* 1998; 27 (143): 238-240.
- Bassan ND, Vinuesa MA, Roma SM. Población intraepitelial de linfocitos T en íleon de conejos sensibilizados con ovoalbúmina. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 1998; 28:183-187
- Bassan N, Roma S, Vinuesa M, Pérez F, Bernardi S, Araujo A. Ciego de conejos sensibilizados con ovoalbúmina y desafiados por vía oral: histoinmunopatología. *Patol Rev Latinoam* 1999; 37: 87-92
- Bassan N, Vinuesa M, Roma S, Vinuesa F, Pérez F. Modelo biológico para la detección de antígenos alimentarios. *Arch Latinoam Nutr* 2002; 52 (3): 249-255

- Bennett K, Walker S, Lo D. Epithelial microvilli establish an electrostatic barrier to microbial adhesion. *Infect Immun* 2014; 82 (7): 2860-2871
- Betterman K, Harvey N. The lymphatic vasculature: development and role in shaping immunity. *Immunol Rev* 2016; 271: 276-292
- Beyaz F, Ergün E, Bayraktaroglu A, Ergün L. The identification of intestinal M cells in the sacculus rotundus and appendix of the Angora rabbit. *Vet Res Commun* 2010; 34: 255-265
- Beyaz F, Liman N, Ergün E, Ergün L, Özbek M. Intestinal macrophages in Peyer's patches, sacculus rotundus and appendix of Angora rabbit. *Cell Tissue Res* 2017; 370: 285-295
- Bhalla D, Owen R. Cell renewal and migration in lymphoid follicles of Peyer's patches and cecum-An autoradiographic study in mice. *Gastroenterology* 1982; 82: 232-242
- Bhogal H, Kennedy L, Babic K, Reynolds J. The role of macrophages in the removal of apoptotic B-cells in the sheep ileal Peyer's patch. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 843-853
- Bibiloni R, Schiffrin E. Intestinal host-microbe interactions under physiological and pathological conditions. *Int J Inflamm* 2010; 2010: 1-8
- Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 1999; 116: 4-14
- Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol* 2009; 101:81-121
- Blechschmidt E. The ontogenetic basis of human Anatomy. A biodynamic approach to development from conception to birth. North Atlantic Books. California 2004.
- Bockman D, Winborn W. Light and electron microscopy of intestinal ferritin absorption. Observations in sensitized and non-sensitized hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Anat Rec* 1966; 155: 603-622
- Bockman D, Cooper M. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the Bursa of Fabricius, appendix and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat* 1973; 136: 455-478
- Boehm T, Hess I, Swann J. Evolution of lymphoid tissues. *Trends Immunol* 2012; 33: 315-321

- Boehm T. Form follows function, function follows form: how lymphoid tissues enable and constrain immune reactions. *Immunol Rev* 2016; 271: 4-9
- Bolant D, Calvo, M, Cejalvo D, Gimeno LO, Gimeno L, Lloris J. La eutanasia en los animales de Laboratorio. *Res Surgery* 1990; Supl 5: 45-56
- Borghesi C, Regoli M, Bertelli E, Nicoletti C. Modification of the follicle-associated epithelium by short-term exposure to a non-intestinal bacterium. *J Pathol* 1996; 180: 326-332
- Borghesi C, Taussig M, Nicoletti C. Rapid appearance of M cells after microbial challenge is restricted at the periphery of the follicle-associated epithelium of Peyer's patch. *Lab Invest* 1999; 79: 1393-1401
- Brandtzaeg P; Tölö K. Mucosal penetrability enhanced by serum-derived antibodies. *Nature* 1977; 266: 262-263
- Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol* 2004; 11: 570-577
- Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell M. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* 2008; 1: 31-37
- Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 2009; 70: 505-515
- Brandtzaeg P. Food allergy: separating the science from the mythology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 380-400
- Brandtzaeg P. The gut as communicator between environment and host: Immunological consequences. *Eur J Pharmacol* 2011; 668: S16-S32
- Bullen T, Forrest S, Campbell F, Dodson A, Hershman M, Pritchard D, Turner J, Montrose M, Watson A. Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest* 2006; 86: 1052-1063
- Bye W, Allan C, Trier J. Structure, distribution and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 1984; 86: 789-801

- Cairnie A, Lamerton L, Steel G. Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters. *Exp Cell Res* 1965; 39: 528-538
- Caricilli AM, Castoldi A, Camara N. Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014; 5: 18-32
- Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 735-744
- Cesta M. Normal structure, function and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 599-608
- Charras G. A short story of blebbing. *J Microsc* 2008; 231: 466-478
- Chen H, Leblond P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I Columnar cell. *Am J Anat* 1974; 141: 461- 480
- Chu V, Berek C. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur J Immunol* 2012; 42: 130-137
- Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* 2014; 40:582-93
- Clark MA, Jepson M, Simmons N, Booth T. Differential expression of lectin-binding sites defines mouse intestinal M-cells. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1679-1687
- Clayburgh D, Shen L, Turner J. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 2004; 84: 282-291
- Clements J, Freytag L. Parenteral vaccination can be an effective means of inducing protective mucosal responses. *Clin Vaccine Immunol* 2016; 23 (6): 438-441
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission *Lab Anim* 1997; 31(1): 1-32
- Crabb E, Kelsall M. Organization of the mucosa and lymphatic structures in rabbit appendix. *J Morphol* 1940; 67: 351-367

- Craighead J. Report of a workshop: Disease accentuation after immunization with inactivated microbial vaccines. *J Infect Dis* 1975; 131: 749-754
- Crosnier C, Stamataki D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 2006; 7 (5): 349-359. doi: 10.1038/nrg1840
- Cuvelier C, Quatacker J, Mielants H, de vos M, Veys E, Roels H. M-cells are damaged and increased in number in inflamed human ileal mucosa. *Histopathol* 1994; 24: 417-426
- Da Silva C, Wagner C, Bonnardel J, Gorvel J, Lelouard H. The Peyer's patch mononuclear phagocyte system at steady state and during infection. *Front Immunol* 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01254
- Dasso J, Obiakor H, Bach H, Anderson A, Mage R. A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Dev Comp Immunol* 2000; 24 (8): 797-814
- Davis I, Owen R. The immunopathology of M cells. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 18: 421-448
- Di Masso R, Gayol M del C, Tarrés MC. El proceso de investigación. De la idea disparadora al artículo científico. *Rev vet* 2014; 25: 146-153
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, Sáez FJ, Díaz-Flores Jr, Valladares F, Madrid JF. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histol Histopathol* 2014; 29: 831-870
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, González M, Sáez FJ, Aparicio F, Díaz-Flores Jr, Madrid JF. Human resident CD34+ stromal cells/telocytes have progenitor capacity and are a source of  $\alpha$ SMA+ cells during repair. *Histol Histopathol* 2015; 30: 615-627
- Dillon A, Lo D. M cells: intelligent engineering of the mucosal immune surveillance. *Front Immunol* 2019; 10: 1499. doi: 10.3389/fimmu.2019.01499

- Ebisawa M, Hase K, Takahashi D, Kitamura H, Knoop K, Williams I, Ohno H. CCR6<sup>hi</sup>CD11<sup>int</sup> B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. *Int Immunol* 2011; 23:261-269
- Enticknap J. Phagocytosis of intestinal bacteria in the appendix of normal rabbits. *J Comp Path* 1953; 63: 7-16
- Erickson C, Trinkaus P. Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp Cell Res* 1976; 99: 375-384
- Erickson K, Hubbard N. Assessing mucosal immunity with new concepts and innovative, time-honored strategies. *Nutr Rev* 2009; 67(suppl. 2): S172-S182
- Ermak T, Steger H, Pappo J. Phenotypically distinct subpopulations of T cells in domes and M-cell pockets of rabbit gut-associated lymphoid tissues. *Immunology* 1990; 71: 530-537
- Ermak T, Bhagat H, Pappo J. Lymphocyte compartments in antigen-sampling regions of rabbit mucosal lymphoid organs. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 14-28
- Ermund A, Gustafsson J, Hansson G, Keita A. Mucus properties and goblet cell quantification in mouse, rat and human ileal Peyer's patches. *PLoS One* 2013; 8: e83688. doi: 10.1371/journal.pone.0083688. eCollection 2013
- Fan J, Xie Y, Li X, Guo G, Meng Q, Xiu Y, Li T, Feng W, Ma L. The influence of Peyer's patch apoptosis on intestinal mucosal immunity in burned mice. *Burns* 2009; 35: 687-694
- Faulk W, McCormick J, Goodman J, Yoffey J, Fudenberg H. Peyer's patch: morphologic study. *Cell Immunol* 1971; 1(5): 500-200
- Fillon S, Robinson Z, Colgan S, Furuta G. Epithelial function in eosinophilic gastrointestinal diseases. *Immunol Allergy Clin Noth Am* 2009; 29 (1): 171-178
- Friedenstein A, Goncharenko I. Morphological evidence of immunological relationships in the lymphoid tissue of rabbit appendix. *Nature* 1965; 206: 1113-1115
- Fujimura Y, Kamoi R, Iida M. Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry *Gut* 1996; 38: 724-732

- Fujimura Y, Haruma K, Owen R. Bombesin prevents the atrophy of Peyer's patches and the dysfunction of M cells in rabbits receiving long-term parenteral nutrition. *JPEN* 2007; 31(2): 75-85
- Gebert A, Bartels H. Occluding junctions in the epithelia of gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the rabbit ileum and caecum. *Cell Tissue Res* 1991; 266: 301-314
- Gebert A, Hach G, Bartels H. Co-localization of Vimentin and cytokeratins in M cells of rabbit gut-associated lymphoid tissue (GALT). *Cell Tissue Res* 1992; 269: 331-340
- Gebert A, Hach G. Differential binding of lectins to M cells and enterocytes in the rabbit cecum. *Gastroenterology* 1993; 105: 1350-1361
- Gebert A. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. *Histochem Cell Biol* 1997; 108: 455-470 (a)
- Gebert A, Posselt W. Glycoconjugate expression defines the origin and differentiation pathway of intestinal M-cells. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 1341-1350 (b)
- Gebert A, Fassbender S, Werner K, Weissferdt A. The development of the M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *Am J Pathol* 1999; 154: 1573-1582
- Gecele P. Fisiología digestiva del conejo adulto. *Monografías en Medicina Veterinaria*, 8; 1986. Disponible en: <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/4876/4762>
- Giannasca P, Giannasca K, Falk P, Gordon J, Neutra M. Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. *Am J Physiol* 1994; 267 (Gastrointest Liver Physiol. 30): G1108-G1121
- Giovannetti A, Pierdominici M, Di Iorio A, Cianci R, Murdaca G, Puppo F, Pandolfi F, Paganelli R. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr Pharm Des* 2008; 14 (3): 253-268
- Gkouskou K, Dligianni C, Tsatsanis C, Eliopoulos A. The gut microbiota in mouse models of inflammatory bowel disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4: 28

- Glücksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1951; 26(1): 59-86
- Goll R, Grandlund A. Intestinal barrier homeostasis in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50: 3-12
- Goto Y, Kiyono H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev* 2012; 245: 147-163
- Gottwein J, Blanchard T, Targoni O, Eisenberg J, Zagorski B, Redline R, Nedrud J, Tary-Lehmann M, Lehmann P, Czinn S. Protective anti-*Helicobacter pylori* immunity is induced with aluminum hydroxide of complete Freund's adjuvant by systemic immunization. *J Infect Dis* 2001; 184: 308-314
- Grant T, Specian R. Epithelial cell dynamics in rabbit cecum and proximal colon P1. *Anat Rec* 2001; 26 4: 427-437
- Green CJ. *Animal anaesthesia*. London: Laboratory Animals Ltd., 1979
- Gross M, Salame T, Jung S. Guardians of the gut-murine intestinal macrophages and dendritic cells. *Front Immunol* 2015; 6: 254-263
- Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Schölmerich J. Apoptosis signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 147-155
- Grossmann J, Walther K, Artinger M, Rümmele P, Woenckhaus M, Schölmerich J. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1421-1428
- Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev* 2014; 260: 76-85
- Haines R, Urbiztondo R, Haynes R, Simpson E, Niewiesk S, Lairmore M. Characterization of New Zealand white rabbit Gut-associated lymphoid tissues and use as viral oncology animal model. *ILAR J* 2016; 57: 34-43

- Haley P. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* 2003; 188: 49-71
- Hanson N, Lanning D. Microbial induction of B and T cell areas in rabbit appendix. *Dev Comp Immunol* 2008; 32: 980-991.
- Hapfelmeier S, Macpherson A. In remembrance of commensal intestinal microbes. *Commun Integr Biol*; 2010; 3: 569-571
- Heatley R, Bienenstock J. Luminal lymphoid cells in the rabbit intestine. *Gastroenterology* 1982; 82: 268-275
- Heczko U, Carthy C, O'Brien B, Finlay B. Decreased apoptosis in the ileum and ileal Peyer's patches: a feature after infection with rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Infect Immun* 2001; 69 (7): 4580-4589
- Hein W, Dudler L, Mackay C. Surface expression of differentiation antigens on lymphocytes in the ileal and jejunal Peyer's patches of lambs. *Immunol* 1989; 68: 365-370
- Hermsen J, Sano Y, Kudsk K. Food fight: parenteral nutrition, enteral stimulation and gut-derived mucosal immunity. *Langenbecks Arch Surg* 2009; 394: 17-30
- Hooper L, Gordon J. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-1118
- Hooper L, Littman D, Macpherson A. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336: 1268-1273
- Hrcir T, Stepánková R, Kováková H, Hudcovic T, Tlaskalová-Hogenová H. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. *BMC Immunol* 2008; 9: 65-75
- Hsieh E, Fernández X, Wang J, Hamer M, Calvillo S, Croft M, Kwon B, Lo D. CD137 is required for M cell functional maturation but not lineage commitment. *Am J Pathol* 2010; 177: 666-676
- Hsieh E, Lo D. Jagged1 and Notch1 help edit M cell patterning in Peyer's patch follicle epithelium. *Dev Comp Immunol* 2012; 37: 306-312

- Iwasaki A, Kelsall B. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 $\alpha$ , MIP-3 $\beta$ , and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000; 191(8): 1381-1393
- Iweala O, Nagler C. Immune privilege in the gut: the establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora. *Immunol Rev* 2006; 213: 82-100
- Jeong K, Suzuki H, Nakayama H, Doi K. Ultrastructural study on the follicle-associated epithelium of nasal-associated lymphoid tissue in specific pathogen free (SPF) and conventional environment-adapted (SPF-CV) rats. *J Anat* 2000; 196: 443-451
- Jepson M, Mason C, Bennett M, Simmons N, Hirst B. Co-expression of vimentin and cytokeratins in M cells of rabbit intestinal lymphoid follicle associated epithelium. *Histochem J* 1992; 24: 33-39
- Jepson M, Simmons N, Hirst G, Hirst B. Identification of M cells and their distribution in rabbit intestinal Peyer's patches and appendix. *Cell Tissue Res* 1993; 273: 127-136
- Jiminez J, Uwiera T, Inglis DG, Uwiera R. Animals models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog* 2015; 7:29. Doi 10.1186/s13099-015-0076-y
- Joeris T, Müller-Luda K, Agace W, Mcl Mowat A. Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal Immunol* 2017;10: 845-864
- Johansson M, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson G. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 15064-15069
- Johnson-Delaney CA. Anatomy and physiology of the rabbit and rodent gastrointestinal system. *Proceedings of Association of Avian Veterinarians, Association of Exotic Mammal Veterinarians (AEMV) Sessions*. 2006. p. 9–17
- Jung C, Hugot J, Barreau F. Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. *Int J Inflamm* 2010; 2010:823710. doi: 10.4061/2010/823710

- Kabaroudis A, Papaziogas B, Koutelidakis I. Disruption of the small-intestine mucosal barrier after intestinal occlusion. A study with light and electron microscopy. *J Invest Surg* 2003; 16 (1): 23-28
- Kanaya T, Ohno H. The mechanisms of M-cell differentiation. *Biosci Microbiota Food Health*. 2014; 33: 91-97
- Kanaya T, Williams I, Ohno H. Intestinal M cells. Tireless samplers of enteric microbiota. *Traffic* 2020; 21 (1): 34-33. doi: 10.1111/tra.12707
- Keren D, Holt P, Collins H, Gemski P, Formal S. Variables affecting local immune response in ileal loops: role of immunization schedule, bacterial flora and postsurgical inflammation. *Infect Immun* 1980; 28: 950-956
- Keren D, Scott P, McDonald R, Wiatrak M. Effect of parenteral immunization on the local immunoglobulin A responses of the intestine to *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1983; 42: 202-203
- Keren D, McDonald R, Scott P, Rosner A, Strubel E. Effect of antigen form on local immunoglobulin A memory responses of intestinal secretions to *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1985; 47: 123-128
- Keren D, McDonald R, Carey J. Combined parenteral and oral immunization results in an enhanced mucosal immunoglobulin A response to *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1988; 56: 910-915
- Kernéis S, Bogdanova A, Kaehenbuhl J, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 1997; 177: 949-953
- Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
- Kiesslich R, Goetz M, Angus E, Hu Q, Guan Y, Potten C, Allen T, Neurath M, Shroyer N, Montrose M, Watson A. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. *Gastroenterology* 2007; 133: 1769-1778

- Kim H, Alonzo E, Dorothee G, Pollard J, Sant'Angelo D. Selective depletion of eosinophils or neutrophils in mice impacts the efficiency of apoptotic cell clearance in the thymus. *PLoS One* 2010; 5 (7): 1-15.
- Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H, Iwanaga T. Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of the maturation in cecal patches. *Mucosal Immunol* 2015; 8:650-60
- Kimura S. Molecular insights into the mechanisms of M-cells differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anat Sci Int* 2018; 93(1): 23-34. doi 10.1007/s12565-017-0418-6
- Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa N, Sato S, Kaisho T, Ohno H, Hase K. Sox8 is essential for M cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. *J Exp Med* 2019. DOI.org/10.1084/jem.20181604
- Kiyono H, Kweon M, Hiroi T, Takahashi I. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand* 2001; 51: 145-153
- Knoop K, Kumar N, Butler B, Sakthivel S, Taylor R, Nochi T, Akiba H, Yagita H, Kiyono H, Williams I. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* 2009; 183: 5738-5747
- Kobayashi N, Takahashi D, Takano S, Kimura S, Hase K. The roles of Peyer's patches and microfold cells in the gut immune system: relevance to autoimmune diseases. *Front Immunol* 2019. doi :10.1038/fimmu.2019.02345
- Kohles M. Gastrointestinal anatomy and physiology of select exotic companion mammals. *Vet Clin Exot Anim* 2014; 17: 165-178.
- Kosek M, Bern C, Guerrant R. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* 2003; 81 (3): 197-204
- Kucharzik T, Lügering N, Rautenberg K, Lügering A, Schmidt M, Stoll R, Domschke W. Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 171-183 (a)

- Kucharzik T, Lügering A, Lügering N, Rautenberg K, Linnepe M, Cichon C, Reichelt R, Stoll R, Schmidt M, Domschke W. Characterization of M cells development during indomethacin-induced ileitis in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 247-256 (b)
- Kumagai K. Über den Resorptionsvergang der corpusculären Bestandteile im Darm. *Kekkaku-Zassi* 1922; 4: 429-431. Abstracted in *Berichte über die gesamte Physiologie und experimentelle Pharmakologie* 1923; 17: 414-415
- Kumar V, Abbas A, Aster J. *Robbins Patología Humana*. 10<sup>o</sup> Edición. Editorial Elsevier. 2018
- Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal ecological network of epithelium and immune cells for gut homeostasis and tissue healing. *Annu Rev Immunol* 2017; 35: 119-147
- Lamers M, Beumer J, van der Vaart J, Knoop K, Puschhof J, Breugem T, Ravelli R, van Schayck J, Mykytyn A, Duimel H, van Donselaar E, Riesebosch S, Kuijpers H, Shippers D, van de Wetering W, de Graaf M, Koopmans M, Cuppen E, Peters P, Haagsmans B, Clevers H. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science* 2020; doi 10.1126/science.abc1669
- Lanning D, Zhu X, Zhai S, Knight K. Development of the antibody repertoire in rabbit: gut associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunol Rev* 2000; 175: 214-228
- Lanning D, Sethupathi P, Rhee K, Zhai S, Knight K. Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J Immunol* 2000; 165: 2012-2019.
- Lanning D, Rhee K, Knight K. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol* 2005; 26: 419-425
- Lee J, Jacobsen E, McGarry M, Schleimer R, Lee N. Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clin Exp Allergy* 2010; 40 (4): 563-575
- Lelouard H, Reggio H, Mangeat P, Neutra M, Montcourrier P. Mucin related epitopes distinguish M cells and enterocytes in rabbit appendix and Peyer's Patch. *Infect Immun* 1999; 67 (1): 357-367

- Lelouard H, Reggio H, Roy C, Sahuquet A, Mangeat P, Montcourrier P. Glycocalix on rabbit intestinal M cells display carbohydrate epitopes from Muc2. *Infect Immun* 2001; 69 (2): 1061-1071
- Lelouard H, Fallet M, de Bovis B, Meresse S, Gorvel J. Peyer's Patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology* 2012; 142: 592-601
- Leushacke M, Barker N, Pin C. Quantifying Lgr5-positive stem cell behaviour in the pyloric epithelium. *Sci Rep* 2016; 6: 21923. doi 10.1038/srep21923
- Liebler-Tenorio E, Pabst R. MALT structure and function in farm animals. *Vet Res* 2006; 37: 257-280
- Liu J, Davis E, Wine E, Lou Y, Rudzinski J, Alipour M, Boulanger P, Thiesen A, Consolato S, Fedorak R, Muruve D, Madsen K, Irvin R. Epithelial cells extrusion leads to breaches in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19 (5): 912-921
- Lügering A, Floer M, Lügering N, Cichon C, Schmidt MA, Domschke W, Kucharzik T. Characterization of M cells formation and associated mononuclear cells during indomethacin-induced intestinal inflammation. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 232-238
- Lügering A, Floer M, Westphal S, Maaser C, Spahn T, Schmidt MA, Domschke W Williams I, Kucharzik T. Absence of CCR6 inhibits CD4+ regulatory T-Cell development and M-Cell formation inside Peyer's patch. *Am J Pathol* 2005; 166: 1647-1654
- Lyte M. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Med Hypotheses* 2010; 74: 634-638
- MacDonald T. The mucosal immune system. *Parasite Immunol* 2003; 25: 235-246
- MacDonald T, Monteleone G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-1925
- MacDonald T, Monteleone I, Fantini M, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* 2011; 140: 1768-1775

- Macpherson A, Geuking M, McCoy K. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunol* 2005; 115: 153-162
- Macpherson A, Slack E, Geuking M, McCoy K. The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 145-149
- Mage R, Sehgal D, Schiaffella E, Anderson A. Gene conversion in rabbit B-cell ontogeny and during immune responses in splenic germinal centers. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 7-15
- Mage R, Pospisil R. CD5 and other superantigens may select and maintain rabbit self-renewing B-lymphocytes and human B-CLL cells. *Curr Topics Microbiol Immunol* 2000; 252: 87-96
- Mage R, Lanning D, Knight K. B cell and antibody repertoire development in rabbits: The requirement of gut-associated lymphoid tissue. *Dev Comp Immunol* 2006; 30: 137-15
- Mak T, Brüggermann H. Vimentin in bacterial infections. *Cells* 2016; 5.  
doi: 10.3390/cells5020018
- Makala L, Suzuki N, Nagasawa H. Peyer's patches: organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine. *Pathobiol* 2002; 70: 55-68
- Man A, Lodi F, Bertelli E, Regoli M, Pin C, Mulholland F, Satoskar A, Taussig M, Nicoletti C. Macrophage migration inhibitory factor plays a role in the regulation of microfold (M) cell-mediated transport in the gut. *J Immunol* 2008; 181: 5673-5680
- Mantis N, Forbes S. Secretory IgA: Arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunol Invest* 2010; 39: 383-406
- Marchetti M, Sirard J, Sansonetti P, Pringault E, Kernéis S. Interaction of pathogenic bacteria with rabbit appendix M cells: bacterial motility is a key feature in vivo. *Microbes Infect* 2004; 6: 521-528
- Marchiando A, Shen L, Graham V, Edelblum K, Duckworth C, Guan Y, Montrose M, Turner J, Watson A. The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology* 2011; 140: 1208-1218

- Marsh M. Studies of intestinal lymphoid tissue. I. Electron microscopic evidence of “blast transformation” in epithelial lymphocytes of mouse small intestinal mucosa. *Gut* 1975; 16: 665-674 (a)
- Marsh M. Studies of intestinal lymphoid tissue. II. Aspects of proliferation and migration of epithelial lymphocytes in the small intestine of mice. *Gut* 1975; 16: 674-682 (b)
- Marshman E, Booth C, Potten Ch. The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays* 2002; 24: 91-98
- Maslowski K, Mackay C. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* 2011; 12: 5-9
- Mayer LI. Mucosal Immunity. *Pediatrics* 2003; 111: 1595-1600
- McClugage S, Low F, Zimny M. Porosity of the basement membrane overlying Peyer’s patches in rats and monkeys. *Gastroenterology* 1986; 91: 1128-33
- McDole J, Wheeler L, McDonald K, Wang B, Konjufca V, Knoop K, Newberry R, Miller M. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* 2012; 483 (7389): 345-349
- McGarry M. The evolutionary origins and presence of eosinophils in extant species. In *Eosinophils in health and disease*. 2013; 13-18 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394385-9.00002-X>
- Mestecky J, Strober W, Russell M, Cheroutre H, Lambrecht BN, Kelsall B *Mucosal Immunology*. 4<sup>th</sup> Edition. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 2015
- Miller H, Zhang J, KuoLee R, Patel G, Chen W. Intestinal M cells. The fallible sentinels? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1477-1486
- Mills J, Stone N, Pittman R. Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol* 1999; 146 (9): 703-707
- Mishra A, Hogan S, Brandt E, Rothenberg M. Peyer’s patch eosinophils: identification, characterization, and regulation by mucosal allergen exposure, interleukin-5, and eotaxin. *Blood* 2000; 96: 1538-1544

- Mohan H. Patología Humana. 6° Edición. Editorial Médica Panamericana. 2012
- Montaldo E, Vacca P, Moretta L, Mingari M. Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. *Semin Immunol* 2014; 26: 107-113
- Montenegro SM, Gayol MC, Tarrés MC. Aspectos éticos de la investigación con animales. *Rev Med Rosario* 2011; 77:69-74
- Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, Markovitz D. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol* 2003; 5 (1): 59-63
- Mowat A, Bain C. The curious case of the intestinal eosinophil. *Mucosal Immunol*. 2010; 3:420-421
- Mutsaers S, Whitaker D, Papadimitriou J. Changes in the concentration of microvilli on the free surface of healing mesothelium are associated with alterations in surface membrane charge. *J Pathol* 1996; 180: 333-339
- Mutwiri G, Watts T, Lew L, Beskorwayne T, Papp Z, Baca-Estrada M, Griebel P. Ileal and jejunal Peyer's patches play distinct roles in mucosal immunity of sheep. *Immunology* 1999; 97: 455-461
- Nakamura Y, Kimura S, Hase K. M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. *Inflamm Regen* 2018; 38:15. doi-org/10-1186/s41232-018-0072-y
- Nakato G, Hase K, Sato T, Kimura S, Sakakibara S, Sugiyama M, Obata Y, Hanazato M, Iwanaga T, Ohno H. Epithelium-intrinsic MicroRNAs contribute to mucosal immune homeostasis by promoting M-cell maturation. *PLOS one* 2016; doi:10.1371/journal.pone.0150379
- Neutra M, Phillips T, Mayer E, Fishkind D. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res* 1987; 247: 537-546
- Neutra M, Pringault E, Kraehenbuhl J. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 275-300

- Neutra M. Current concepts in mucosal immunity. V. The role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol* 1998; 274: G785-G791
- Neutra M, Mantis N, Frey A, Giannasca P. The composition and function of M cells apical membranes: Implications for microbial pathogenesis. *Semin Immunol* 1999; 11: 171-181
- Neutra M, Mantis N, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosa lymphoid tissues. *Nature Immunol* 2001; 2: 1004-1009
- Newberry R, Lorenz R. Organizing a mucosal defense. *Immunol Rev* 2005; 206: 6-21
- Newberry R. Intestinal lymphoid tissues: is variety an asset or a liability? *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 121-128
- Nicoletti C. Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut* 2000; 47:735-739
- Odze R, Goldblum J. Surgical pathology of the gastrointestinal tract, liver, biliary tract, and pancreas. 3<sup>rd</sup> Edition. Elsevier Academic Press. Philadelphia 2015
- Ohno H. Intestinal M cells. *J Biochem* 2016; 159: 151-160
- Ohtani O, Ohtani Y. Organization and developmental aspects of lymphatic vessels. *Arch Histol Cytol* 2008; 71: 1-22
- Okamoto R, Watanabe M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1-6
- Okamoto R, Watanabe M. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci* 2005; 50: S34-S38
- Owen R, Jones A. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 1974; 66: 189-203
- Owen R, Nemanic P, Stevens D. Ultrastructural observations on Giardiasis in a murine model. I. Intestinal distribution. Attachment and relationship to the immune system of *Giardia muris*. *Gastroenterology* 1979; 76: 757-769

- Owen R, Apple R, Bhalla D. Morphometric and cytochemical analysis of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes. *Anat Rec* 1986; 216: 521-527
- Owen R. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches - A personal and historical perspective. *Semin Immunol* 1999; 11: 157-163
- Pabst R, Geist M, Rothkötter H, Fritz F. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology* 1988; 64:539-544
- Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 821-832
- Pappo J, Ermak H. Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 144-148
- Peuhkuri K, Vapaatalo H, Korpela R. Even low-grade inflammation impacts on small intestinal function. *World J Gastroenterol* 2010; 16 (9): 1057-1062
- Peyer JC (1677). *Exercitatio ant. De glandulis intestinalium earumque usu et affectionibus*. Schaffausen; in Garrison FH (ed): *An Introduction to the History of Medicine*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Saunders, 1929, p264
- Platt A, Mowat A. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett* 2008; 119: 22-31
- Popper K. *Conjectures and Refutations: The Growth of Scientific Knowledge*. New York, Harper Collins Publishers Eds., 1987, p52
- Pospisil R, Fitt M, Mage R. CD5 is a potential selection ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med* 1996; 184: 1279-1284
- Pospisil R, Mage R. Rabbit appendix: a site of development and selection of the B-cell repertoire. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1998; 229: 59-70 (a)

- Pospisil R, Mage R. CD5 and other superantigens as “ticklers” of the B-cell receptor. *Immunol Today* 1998; 19: 106-107 (b)
- Potten C, Allen T. Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *J Ultrastruct Res* 1977; 60 (2): 272-277
- Potten C. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; 353: 821-830
- Potten C, Booth C, Hargreaves D. The small intestine as a model for evaluating adult tissue stem cell drug targets. *Cell Prolif* 2003; 36: 115-129
- Pull S, Doherty J, Mills J, Gordon J, Stappenbeck T. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 99-104
- Raman C, Knight K. CD5+ cells predominate in peripheral tissues of rabbit. *J Immunol* 1992; 149: 3858-3864
- Ramiro-Puig E, Pérez-Cano F, Castellote C, Franch A, Castell M. The bowel: a key component of the immune system. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100: 29-34
- Reboldi A, Cyster J. Peyer’s patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunol Rev* 2016; 271: 230-245
- Regoli M, Borghesi C, Bertelli E, Nicoletti C. A morphological study of the lymphocyte traffic in Peyer’s patches after an in vivo antigenic stimulation. *Anat Rec* 1994; 239: 47-54
- Rescigno M. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361-367
- Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2011; 32: 256-264
- Rhee K, Sethupathi P, Driks A, Lanning D, Knight K. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J Immunol* 2004; 172: 1118-1124

- Roma SM, Bassan ND, Vinuesa MA. Cambios histopatológicos en recto de conejos sensibilizados y desafiados por vía oral con ovoalbúmina. *Analecta Vet.* 2004; 24: 5-9
- Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:9-22
- Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.*2006; 24:147-174
- Rothkötter H, Pabst R, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 157-165
- Rowinski J, Lamprecht J, Sicinski P. Non-random distribution of intraepithelial lymphoid cells in follicle-associated epithelium of Peyer's patches in mice. *J Anat* 1984; 139: 21-32
- Roy M. Precocious development of lectin (*Ulex europaeus* agglutinin I) receptors in dome epithelium of gut-associated lymphoid tissues. *Cell Tissue Res* 1987; 248: 483-489
- Roy M, Walsh T. Histopathologic and immunohistochemical changes in gut-associated lymphoid tissues after treatment of rabbits with dexamethasone. *Lab Invest* 1992; 64: 437-443
- Sabino CA. El proceso de investigación, 3° ed., Lumen-Humanitas, Buenos Aires, 1996
- Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martínez-Agustín O. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20 (12): 2394-2404
- Sansonetti P, Phalipon A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* 1999; 11: 193-203
- Sansonetti P. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 953-964
- Savidge T, Smith M, James P, Aldred P. Salmonella induces M-cell formation in germ free mouse Peyer's patch tissue. *Am J Pathol* 1991; 139:177-184
- Schenk M, Mueller C. Adaptations of intestinal macrophages to an antigen-rich environment. *Semin Immunol* 2007; 19: 84-93

- Schmedtje J. Some histochemical characteristics of lymphoepithelial cells of the rabbit appendix. *Anat Rec* 1965; 151: 412-413 (Abstr)
- Schmedtje J. Fine structure of intercellular lymphocyte clusters in the rabbit appendix epithelium. *Anat Rec* 1966; 154: 417 (Abstr)
- Schmedtje J. Lymphocyte positions in the dome epithelium on the rabbit appendix epithelium. *J Morphol* 1980; 155: 179-195
- Schnabl B, Brenner D. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* 2014; 146: 1513-1524
- Schnupf P, Sansonetti P. Quantitative RT-PCR profiling of the rabbit immune response: assessment of acute *Shigella flexneri* infection. *PLoS one* 2012; 7(6): e36446.  
doi: 10.1371/journal.pone.0036446
- Sehgal A, Kobayashi A, Donaldson D, Mabbott N. c-Rel is dispensable for the differentiation and functional maturation of M cells in the follicle-associated epithelium. *Immunobiol* 2017; 222: 316-326
- Seidelin J, Nielsen O. Epithelial apoptosis: cause or consequence of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 1429-1434
- Senda T, Dogra P, Granot T, Furuhashi K, Snyder M, Carpenter D, Szabo P, Thapa P, Miron M, Farber D. Microanatomical dissection of human intestinal T-cell immunity reveals site-specific changes in gut-associated lymphoid tissues over life. *Mucosal Immunol* 2019; 12 (2): 378-389. doi:10.1038/s41385-018-0110-8.Epub2018
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 2016; 14(8): e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.  
eCollection 2016 Aug
- Shamri R, Xenakis J, Spencer L. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 57-83
- Shanmugam M, Sethupathi P, Rhee K, Yong S, Knight K. Bacterial-induced inflammation in germ-free rabbit appendix. *Inflam Bowel Dis* 2005; 11: 992-996

- Sharma R, Schumacher U, Adam E. Lectin histochemistry reveals the appearance of M-cells in Peyer's patches of SCID mice after syngeneic normal bone marrow transplantation. *J Histochem Cytochem* 1998; 143-148
- Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res* 2017; 4: 14. doi: 10.1186/s40779-017-0122-9
- Shimizu Y, Andrew W. Studies on the rabbit appendix. I. Lymphocyte-epithelial relations and the transport of bacteria from lumen to lymphoid nodule. *J Morphol* 1967; 123: 231-250
- Sinha R, Mage R. Developing neonatal rabbit appendix, a primary lymphoid organ, is seeded by immature blood-borne B cells: evidence of roles for CD62L/PNAd, CCR7/CCL21,  $\alpha 4\beta 1$  and LFA-1. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 829-841
- Sinha R, Alexander C, Mage R. Regulated expression of peripheral node addressin-positive high endothelial venules controls seeding of B lymphocytes into developing neonatal rabbit appendix. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 110: 97-108
- Smillie CS, Biton M, Ordovas-Montanes J et al. Cellular and inter-cellular rewiring of the human colon during ulcerative colitis. *Cell* 2019; 178 (3) 714-730
- Smith M, Peacock M. "M" cell distribution in follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patch. *Am J Anat* 1980; 159: 167-175
- Smith M, James P, Tivey D. M cell numbers increase after transfer of SPF mice to a normal animal house environment. *Am J Pathol* 1987; 128: 385-389
- Smith M, Peacock M. Microvillus growth and M cells formation in mouse Peyer's patch follicle associated epithelial tissue. *Exp Physiol* 1992; 77: 389-392
- Smythies L, Sellers M, Clements R, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin W, Orenstein J, Smith P. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; 115: 66-75
- Sneller M, Strober W. M cells and host defense. *J Infect Dis* 1986; 154: 737-741
- Snipes R. Anatomy of the rabbit cecum. *Anat Embryol* 1978; 155: 57-80

- Spasova D, Surh C. Blowing on embers: commensal microbiota and our immune system. *Front Immunol* 2014; 5: 1-10
- Spencer J, Siu J, Montorsi L. Human intestinal Lymphoid Tissue in time and space. *Mucosal Immunol* 2018; 12 (2): 296-298
- Sundaram U, Coon S, Wisel S, West B. Corticosteroids reverse the inhibition of Na-glucose cotransport in the chronically inflamed rabbit ileum. *Am J Physiol* 1999; 276: G211-G218
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale L, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with Inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3380-3389
- Takeuchi T, Gonda T. Cellular kinetics of villous epithelial cells and M cells in rabbit small intestine. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 689-693
- Tannock G. What immunologists should know about bacterial communities of the human bowel. *Semin Immunol* 2007; 19: 94-105
- Terahara K, Nochi T, Yoshida M, Takahashi Y, Goto Y, Hatai H, Kurokawa S, Jang M, Kweon M, Domino S, Hiroi T, Yoshikazu Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi K, Kiyono H. Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404: 822-828
- Tixeira R, Caruso S, Paone S, Baxter A, Atkin-Smith G, Hulett M, Poon I. Defining the morphologic features and products of cells disassembly during apoptosis. *Apoptosis* January 2017. doi 10.1007/s10495-017-1345-7
- Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Kováková H, Hudcovic T. et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol* 2011; 8: 110-120

- Trahtemberg U, Mevorach D. Apoptotic cells induces signaling for immune homeostasis in macrophages and dendritic cells. *Front Immunol* 2017; 8: 1536. doi: 10.3389/fimmu.2017.01356
- Travers J, Rothenberg ME. Eosinophils in mucosal immune responses, 2015; 8: 464-475
- Valdivia Anda G, Cortés Fernández N, Alba Hurtado F, Martínez Rodríguez H, Tórtora Pérez J, Montaraz Crespo J. Morphological and immunologic aspects of the cecal appendix of the rabbit. *Vet Méx* 2007; 38: 319-330
- Van Cruchten S, Van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-223
- Van der Sluis M, Koning B, De Bruijn A, Velcich A, Meijerink J, Van Goudoever J, Büller H, Dekker J, Van Seuningem I, Renes I, Einerhand A. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that Muc2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006; 131: 117-129
- Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Rev Gastroenterol Hepatol* 2017. doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143
- Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viana S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 2002; 295: 1726-1729
- Vinuesa M, Bassan N, Roma S, Pérez F. Immunological modifications in the rectal mucosa from an animal model of food allergy. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97 (9): 629-636
- Wagensberg J. La rebelión de las formas: o como perseverar cuando la incertidumbre aprieta. 1ª. edición. Tusquets editores. Buenos Aires. 2013
- Walker W, Isselbacher K, Bloch K. Intestinal uptake of macromolecules. II. Effect of parenteral immunization. *J Immunol* 1973; 111: 221-226
- Walker W, Wu M, Isselbacher K, Bloch K. Intestinal uptake of macromolecules. III. Studies on the mechanism by which immunization interferes with antigen uptake. *J Immunol* 1975; 115: 854-861

- Walker R, Schmauder-Chock E, Parker J. Selective association and transport of *Campylobacter jejuni* through M cells of rabbit Peyer's patches. *Can J Microbiol* 1988; 34: 1142-1147
- Weber B, Saurer L, Mueller C. Intestinal macrophages: differentiation and involvement in intestinal immunopathologies. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 171-184
- Westphal S, Lugering A, von Wedel J, von Eiff Ch et al. Resistance of chemokine receptor 6-deficient mice to *Yersinia enterocolitica* infection. *Am J Pathol* 2008; 172: 671-680
- Wittig B, Zeitz M. The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 181-187
- Wittkopf N, Neurath M, Becker C. Immune-epithelial crosstalk at the intestinal surface. *J Gastroenterol* 2014; 49: 375-387
- Wolf J, Bye W. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Ann Rev Med* 1984; 35: 95-112
- Yamanaka T, Satraumfors A, Craig Morton H, Fausa O, Brandtzaeg P, Farstad I. M cell pockets of human Peyer's patches are specialized extensions of germinal centres. *Eur J Immunol* 2001; 31: 107-117
- Yamanaka T, Helgeland L, Farstad I, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of the Peyer's patches. *J Immunol* 2003; 170: 816-822
- Yasuda M, Jenne C, Kennedy L, Reynolds J. The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development. *Vet Res* 2006; 37: 401-415
- Zhang L, Song J, Bai T, Qian W, Hou X. Stress induces more serious barrier dysfunction in follicle-associated epithelium than villus epithelium involving mast cells and protease-activated receptor-2. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 4950.
- Zigmund E, Jung S. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol* 2013; 34: 162-168

## 8.1. TRABAJOS SOCIALIZADOS SOBRE EL TEMA

---

1. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, VI International Congress of Histology and Tissue Engineering y III Congreso Iberoamericano de Histología. Bilbao (Vizcaya, España), septiembre 2015

**Morphometric study of the Follicle-Associated Epithelium and the intraepithelial lymphocytic population in rabbit appendix** (Roma SM, Pérez FA, D'Ottavio AE)

(Comunicación Libre)

Publicado como Abstract en Histology and Histopathology. Cellular and Molecular Biology. 2015; 30 (Supp. 1): 64-65

2. XIX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, VII International Congress of Histology and Tissue Engineering y IV Congreso Iberoamericano de Histología. Santiago de Compostela (Galicia, España), septiembre 2017

**M cells in rabbit appendix: its area and origin after parenteral antigen challenge** (Roma SM, Pérez FA, D'Ottavio AE) (Comunicación Libre)

Publicado como Abstract en Histology and Histopathology. Cellular and Molecular Biology. 2017; 32 (Supp. 1):10-10

3. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, noviembre 2018

**Macrófagos vimentina (+) en apéndice cecal de conejo** (Roma S, Pérez FA, D'Ottavio AE) (Póster)

Publicado como **Vimentin (+) macrophages in rabbit cecal appendix (Abstract)** en Biocell 2019; 43 (Supp 2): A63

4. XX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, VIII International Congress of Histology and Tissue Engineering y V Congreso Iberoamericano de Histología. Murcia (Murcia, España), septiembre 2019

**Rabbit Peyer's patches membranous cells (M cells) subcutaneously challenged with ovoalbumin** (Roma SM, Pérez FA, D'Ottavio AE) (Comunicación Libre)

Publicado como Abstract en Histology and Histopathology. Cellular and Molecular Biology. 2019; 34 (Supp. 1): S73

5. XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, noviembre 2019

**Células membranosas en Placa de Peyer de conejo: área de los bolsillos y apoptosis de los linfocitos intraepiteliales** (Roma, SM; Pérez, FA; Di Paolo, B; Garcilazo M; Márquez Vallari L; D'Ottavio AE)

Aceptado para publicación en Biocell 2020

## **8.2. ALGUNAS DIFERENCIAS INTERSEXUALES**

---

A continuación, se rescatan algunas diferencias intersexuales que, por valorarse de interés, resultan pasibles de cuantificación y comparación ulterior tras o aumento y equiparación de animales de ambos sexos

### ***Apéndice cecal***

---

Dada su exclusividad en este órgano, los datos resultantes de la evaluación de 20 folículos linfoides (unidad experimental) / animal se presentan en la siguiente tabla:

**Porcentaje de cúmulos macrofágicos en relación con los folículos linfoides en apéndice cecal de conejos de ambos sexos sometidos a diferentes tratamientos**

Grupos		Folículos linfoides	Cúmulos macrofágicos	Total %
<b>A</b>	♀	60	53	88,33
	♂	40	9	22,5
<b>B</b>	♀	40	36	90
	♂	40	26	65
<b>C</b>	♀	40	18	45
	♂	40	17	42,5
<b>D</b>	♀	40	24	60
	♂	60	36	60
<b>E</b>	♀	40	15	37,5
	♂	60	35	58,33
<b>F</b>	♀	60	58	96,66
	♂	40	40	100

En A y B (grupos controles y expuestos sólo a adyuvantes), los cúmulos macrofágicos fueron prácticamente patognomónicos de las hembras ya que permitieron a histólogos no involucrados con este trabajo distinguir de inmediato a tales grupos.

### ***Placa de Peyer***

---

Al MO, las bullas (o blebs) apicales de las células epiteliales del FAE aparecieron más numerosas en conejos hembras que en animales machos.

### 8.3. LINFOPOYESIS EN EL CONEJO

---

El conejo inicia su linfopoyesis en el hígado fetal y el bazo, proceso que se traslada a la médula ósea poco antes del nacimiento (Mage et al., 2006).

La generación del repertorio fetal y neonatal de linfocitos B es muy peculiar en este animal ya que no ocurre en él una unión combinatoria y aleatoria de genes (como sucede en otros mamíferos; entre ellos, rata, ratón y ser humano) sino que, a pesar de que cuenta con más de 100 genes V, se vale de un número limitado de ellos, preferentemente el VH (porción variable de la cadena pesada de Ig) localizado en el extremo 3' y próximo a los loci D. Este rearrreglo génico luce algo ineficaz dada la unión limitada de genes (Lanning et al., 2000 a).

En las primeras semanas post-natales, los linfocitos B abandonan estos sitios linfopoyéticos y se dirigen por vía sanguínea a los GALTs (apéndice cecal, placa de Peyer y saco redondo) donde, además de completar la diversificación del repertorio pre-inmune de anticuerpos mediante dos mecanismos mutacionales (uno, símil conversión génica, y otro, hipermutación somática), proliferan, expanden los clones y experimentan selección positiva y negativa hasta los cuatro meses de vida extrauterina (Pospisil et al., 1998 a y b; Lanning et al., 2005).

Curiosamente, los GALTs son localizaciones anatómicas que cuentan con numerosos antígenos luminales expuestos continuamente a muestreo. El proceso de diversificación periférica del repertorio, a diferencia de lo que acontece en cabras, ovejas, cerdos y ganado vacuno, requiere en el conejo de la microbiota comensal, aunque se desconoce cómo colabora ella en tales procesos.

A este respecto, las células M cumplirían un rol fundamental pues, como se reiteró ya, están capacitadas en realizar la transcitosis de elementos particulados.

En el conejo, existen estudios que citan al *Bacteroides fragilis* (Gram-) y al *Bacillus subtilis* (Gram+) actuando en conjunto para inducir el desarrollo de los GALTs (Rhee et al., 2004; Shanmugam et al., 2005).

En una publicación de la autora de esta tesis, fue analizada, mediante métodos directos y estudios bacteriológicos, que el ciego del conejo (en cuyo extremo distal se encuentra elapéndice

cecal) contiene un 30% de bacilos Gram (+) y un 70% de (-), con escasa cantidad de cocos Gram (+). Por su parte, los cultivos anaeróbicos mostraron abundantes Clostridios, Bacteroides y Fusobacterium, coincidiendo en algunos aspectos con los investigadores antes citados (Bassan et al., 1998).

Si bien durante el primer trimestre de vida extra-uterina la linfopoyesis disminuye en un 99%, la cantidad de linfocitos B del animal no decrece. Ello ha llevado a pensar que se originan por auto-renovación en los GALTs o en otros sitios periféricos (Raman et al., 1992; Pospisil et al., 1996; Mage et al., 2006).

El 80 % de las células B del conejo adulto expresan la glicoproteína CD5 en su membrana. Ésta podría actuar como un antígeno endógeno que, además de proveerles una estimulación continua, promovería su expansión y supervivencia, y prevendría su eliminación por parte del sistema inmune (Pospisil et al.; 1996 y 1998 b).

#### 8.4. OTROS RESULTADOS Y RELACIONES EN APÉNDICE CECAL Y PLACA DE PEYER CUNICULARES

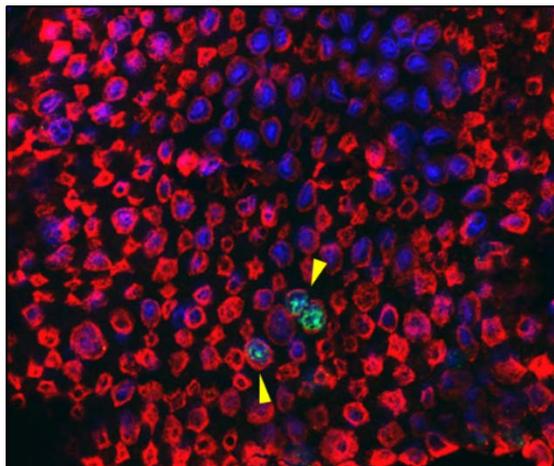
---

---

##### Resultados

---

La microscopía láser confocal permite la visualización de cortes gruesos y habilita la obtención de imágenes que incluyen la totalidad de la célula. Pudo así observarse en ambos órganos examinados que **las células del FAE adoptaban formas irregularmente hexagonales o pentagonales**, y **las células M** presentaban un citoesqueleto, rico en filamentos intermedios de vimentina, conformando una suerte de armazón citoplasmática reforzadora en torno a los bolsillos baso-laterales conteniendo células inmunocompetentes. Éstas, al arribar al FAE, aumentaban de tamaño (blastos) y adquirían capacidad proliferativa.



Vista superior del FAE mediante microscopía láser confocal. Las células M en rojo (Vimentina +) adoptan forma penta-hexagonal y se disponen alrededor de los enterocitos que, con idéntica forma, lucen como espacios negros al no utilizarse para ellos tinción fluorescente. En determinados bolsillos de las células M se aprecian núcleos de linfocitos (fluorescencia azul), algunos proliferando (fluorescencia verde)

### Relaciones

Relacionando mediante prueba de Kruskal-Wallis los diferentes grupos (control y experimentales) en apéndice cecal y placa de Peyer (íleon terminal) fueron registradas las significaciones que figuran en la Tabla que sigue:

#### Relación de diferentes variables en criptas de apéndice cecal y placa de Peyer de conejos ante varios tratamientos

Longitud de criptas	Proliferación	Diferenciación	Solapamiento
p = 0,370 ns	p = 0,884 ns	p = 0,287 ns	p = 0,2602 ns

## **8.5. PROPUESTAS CONJETURALES PASIBLES DE ULTERIOR PROFUNDIZACIÓN**

---

Sabido es que aún restan cuantificar no sólo las células M apendiculares cecales (con técnica no disponibles para esta tesis) sino, también, la IgA y los eosinófilos sanguíneos, así como evaluar la extensión temporal del efecto residual inactivante (metas que exceden a los objetivos aquí planteados).

Va de suyo, en igual sentido, que persisten preguntas nacidas de los resultados hallados que abren nuevas hipótesis a corroborar o falsear.

Queda tácita la intención de explorarlas por parte de quien esto suscribe y/o de quien posea los medios para lograrlo.