



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“USO DE DIFERENTES MARCADORES PARA LA LOCALIZACIÓN DE
CÉLULAS M EN INTESTINO DELGADO Y GRUESO DE CONEJO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

SAMANTHA JARDON XICOTENCATL

ASESORES: Dr. Carlos Gerardo García Tovar.
MVZ. Hugo César López Farías.
MVZ. Ana Leonor Reyes Sánchez.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

A MIS PADRES:

Leticia y Gerardo

Mamá, eres el regalo más grande que Dios pudo haberme dado, tu has guiado cada uno de mis pasos, has vivido conmigo mis victorias y mis derrotas; este trabajo es tuyo.

¡Gracias por ser mi madre!

Papá, eres mi ejemplo a seguir y simplemente el hombre más importante en mi vida, sin tu esfuerzo y apoyo yo nunca hubiera llegado a donde estoy. Espero que estés orgulloso de mí, porque no hay hija más orgullosa de su padre que yo.

¡¡¡Enorgullecerlos a ambos ha sido la tarea más importante de mi existir!!!

A MIS HERMANAS:

Brenda y Berenice

Por ser la otra mitad de mi corazón; para que este trabajo las motive a hacer grandes cosas.

Nunca podré expresar con palabras lo mucho que las amo.

A MI ABUELITA:

Por todas las hermosas lecciones de vida, por ser mí amiga, mi confidente, por tu paciencia y apoyo siempre. Te quiero muchísimo.

A JONATHAN:

Por amarme tanto y por darme los regalos más hermosos de la vida... tú amor y a nuestros benditos ángeles que me cuidan desde el cielo, me motivan, inspiran y dan paz.

Porque en mi complejo mundo y corazón que tiene altas y bajas, tú siempre has estado a mi lado para caminar juntos mano a mano, y cuando ese camino se torna frío y oscuro... tus brazos me han dado calor y tus ojos luz para seguir adelante.

Por enseñarme que en este mundo aun existe el amor eterno y resistente a los daños, por todo esto y más...

¡¡¡ Gracias mi amor, por hacer que todo valga la pena, te amo !!!

AL DR. CALOS GERARDO GARCIA TOVAR
*Por permitirme ser su tesista y por apoyarme siempre.
Por darme el ejemplo de que una vida exitosa,
es aún más grande cuando se acompaña de sencillez y humildad.
Fue un placer trabajar con usted.*

A GERMAN ISAURO GARRIDO FARIÑA:
*Por su invaluable apoyo en la realización de este trabajo.
Por ser más que un asesor, nunca podré expresar lo agradecida que le
estoy.*

A ANA REYES SANCHEZ:
Por sus enseñanzas, consejos y amistad brindados durante esta tesis.

A HUGO CESAR LÓPEZ FARÍAS
*Por el apoyo en la asesoría de este trabajo y mi proceso de titulación,
siempre con cordialidad y sencillez.*

A MI MAESTRO Y AMIGO FERNANDO VINIEGRA RODRIGUEZ:
*Por mostrarme el lado humano de la veterinaria, por sus consejos y
regaños, mis respetos señor.*

A JUANA ORTEGA MONDRAGON
*Por creer en mí y darme la oportunidad de conocer el maravilloso mundo
de la docencia, en la cual halle mi vocación.*

A MIS PROFESORES:
*Que me permitieron aprender de cada uno de ellos y por haber hecho de
mi una persona de bien abriéndome las puertas al hermoso mundo de la
medicina veterinaria.*

A JAIR VARGAS:

*Por su apoyo y cariño en los años que duro la carrera,
por no dejarme caer nunca y motivarme a seguir cabalgando por mis
sueños.*

A MIS AMIGOS ARTURO, GABRIEL, STEPHANIE Y CAROL:

*Por estar conmigo en mis buenos y malos momentos
Por enseñarme que la verdadera amistad perdura al tiempo y la distancia.*

A BENITO, TALOS, LUCAS Y RODRIGUEZ:

*Ustedes fueron siempre mis más grandes motivos para ser un buen Médico
Veterinario Zootecnista.*

A LA FESC:

*Mi casa, mi hogar, gracias por abrirme las puertas y haberme formado.
Por darme mí amada profesión.*

A LA UNAM

*Porque pertenecer a ti un día empezó como un sueño y hoy es una
realidad.
Es un honor ser uno más de tus frutos.*

A TODAS AQUELLAS PERSONAS

*Que me enseñaron que ser excelente es llegar a la meta por el camino de la
disciplina, la humildad, la lealtad y la entrega.*

A DIOS:

*Por tus innumerables bendiciones, por las personas que has cruzado en mi
camino...
Por regalarme vida para seguir cumpliendo mis sueños.*

MVZ. SAMANTHA JARDON XICOTENCATL.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Anatomía e histología del intestino delgado.....	7
1.2 Anatomía e histología del intestino grueso.....	8
1.3 Sistema de defensa intestinal.....	9
1.3.1 Inmunidad innata.....	9
1.3.2 Inmunidad adaptativa.....	9
1.4 Inmunidad de mucosas.....	10
1.4.1 Sistema inmunitario de las mucosas.....	10
1.5 Células M.....	11
1.5.1 Teorías sobre el origen de las células M.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Diseño experimental.....	14
3.2 Material biológico.....	14
3.3 Obtención de muestras.....	14
3.3.1 Técnica de desparafinado.....	15
3.3.2 Reactivos utilizados.....	16
3.4 Técnica de inmunofluorescencia.....	16
3.4.1 Procedimiento.....	16
3.5 Técnica de inmunoperoxidasa.....	18
3.5.1 Procedimiento.....	18
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSIÓN.....	29
6. CONCLUSIONES.....	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT “Estudio comparativo de los rearrreglos del citoesqueleto en células RK13 y enterocitos del conejo durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC)”, clave 1N203106-3 y por la Cátedra de Investigación “Morfología Veterinaria y Biología Celular”, clave PACIVE CONS105.

RESUMEN

La realización de este trabajo obedeció a la necesidad de tener los fundamentos sobre la localización de las células M, las cuales juegan un papel importante en los mecanismos inmunológicos a nivel intestinal en el conejo, estudiando la importancia de estas células en la captación y transporte de antígenos hacia los macrófagos, células dendríticas y linfocitos B y T, para que el sistema inmune monte la respuesta de defensa.

Para conocer la localización de estas células se probaron dos marcadores reportados en la literatura para identificar a las células M, los marcadores utilizados fueron anticuerpos dirigidos contra vimentina y citoqueratinas 8/18, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, en cortes intestinales embebidos en parafina de 3 conejos clínicamente sanos, posteriormente se determinó la efectividad de los marcadores en el intestino de conejo. La prueba de inmunofluorescencia con el marcador vimentina arrojó resultados positivos para células M, esta información se corroboró por la prueba de inmunoperoxidasa con el mismo marcador y se observaron resultados similares, por lo que se determinó que las células M en el conejo expresan predominantemente vimentina, por el anticuerpo dirigido a esta proteína del citoesqueleto; aunque en algunos casos también se observó marca en células de la túnica de la serosa intestinal.

Las regiones intestinales en las cuales predominan las células M fueron: la unión yeyuno-ileal, ámpula del fleon, la unión del ciego con el apéndice vermiforme y el ano.

Las células marcadas por el anticuerpo contra citoqueratinas 8/18 no correspondieron a células M, ya que se observó marca en la gran mayoría de los epitelocitos de la vellosidad intestinal, por lo tanto este marcador queda desechado para ser utilizado en esta especie animal como marcador específico de células M.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Anatomía e histología del intestino delgado.

El intestino delgado es el punto terminal de la digestión de los alimentos y de la absorción de nutrientes. Los procesos de digestión se completan en el intestino delgado donde los nutrientes (*productos de digestión*) son absorbidos por las células epiteliales de revestimiento. (Junqueira, 2005)

Anatómicamente el intestino delgado va del esfínter pilórico (*parte terminal del estómago*) hasta la unión iliocecal; está dividido en 3 segmentos: duodeno, yeyuno e íleon. La mucosa del intestino delgado presenta varios pliegues, los cuales aumentan su superficie, incrementando así el área disponible para la absorción de nutrientes. (Junqueira, 2005)

Histológicamente, al observar el órgano hacia la parte interna, se observan numerosos pliegues llamados válvulas conniventes o válvulas de Kerckring, posteriormente proyecciones digitiformes llamadas “vellosidades intestinales”, las cuales son proyecciones alargadas de la mucosa (*epitelio y lámina propia*) en dirección a la luz del intestino delgado, las vellosidades intestinales presentan a su vez microvellosidades en el borde estriado, conocidas como “ribete en cepillo”, las cuales se originan de la división mitótica en la porción basal de las criptas y migran hacia la superficie para terminar descamando hacia la luz intestinal. En el duodeno dichas proyecciones se aprecian como hojas adquiriendo, gradualmente, una forma de dedos a medida que se aproximan al íleon, entre las vellosidades existen pequeñas aperturas de glándulas tubulares simples denominadas glándulas intestinales o “criptas”. (Junqueira, 2005; Chávez et al, 2000)

Histológicamente está formado por 4 capas principales: mucosa, submucosa, muscular y serosa. Recorriendo al órgano hacia la parte externa se encuentra:

Túnica mucosa

- Epitelio simple columnar con microvellosidades y exocrinocitos caliciformes intercalados.
- Lámina propia (*Tejido conectivo colágeno laxo, que contiene glándulas intestinales*).

Muscular de la mucosa (*Tejido muscular no estriado*).

Tela submucosa (*Tejido conectivo colágeno laxo*).

Túnica muscular (*Tejido muscular no estriado*).

- Estrato circular interno.
- Estrato longitudinal externo.

Túnica serosa

- Tejido conectivo colágeno laxo.
- Mesotelio. ^(Chávez et al, 2000)

1.2 Anatomía e histología del intestino grueso.

El intestino grueso, por su parte, es un órgano cuya función principal es la absorción de líquidos y la formación de masa fecal. ^(Junqueira, 2005; Valdivia, 2007)

Anatómicamente se extiende desde la unión ileocecal al ano, comprende al ciego, el apéndice cecal, el colon, el recto y el canal anal. ^(Valdivia, 2007)

Histológicamente está formado por 4 capas principales: mucosa, submucosa, muscular y serosa.

Túnica mucosa

- Epitelio simple columnar con microvellosidades y abundantes exocrinocitos caliciformes intercalados.
- Lámina propia (*Mas gruesa que en intestino delgado*)

Muscular de la mucosa (*Tejido muscular no estriado*).

Tela submucosa (*Tejido conectivo colágeno laxo*).

Túnica muscular (*Tejido muscular no estriado*).

Túnica serosa

- Tejido conectivo colágeno laxo.
- Mesotelio. ^(Chávez et al, 2000)

Otra diferencia importante del intestino grueso en relación al intestino delgado, es que las criptas intestinales son más profundas, la lamina propia es rica en tejido linfóide, capilares sanguíneos y linfáticos que se extienden frecuentemente hasta la submucosa y base del epitelio, formando proyecciones hacia luz llamados “domos”. La riqueza en tejido linfóide está relacionada con la población bacteriana abundante en este órgano.

^(Chávez et al, 2000; Valdivia, 2007)

1.3 Sistema de defensa intestinal.

El intestino esta expuesto de manera rutinaria a una gran cantidad de antígenos extraños, muchos de los cuales se relacionan con el consumo dietético o con la flora bacteriana comensal. El sistema natural de defensa protege al organismo de estos antígenos. Tras la entrada de los patógenos en los alimentos, pueden ocurrir distintos tipos de respuestas inmunes en el tracto intestinal. (Laso, 2001; Montaña; 2005)

1.3.1 Inmunidad innata.

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra las infecciones. Los mecanismos de inmunidad innata existen antes de que haya tenido lugar el encuentro con cualquier patógeno y es la respuesta inicial que impide la infección del huésped y, en muchos casos, es capaz de eliminar los microorganismos. La inmunidad innata no solo tiene funciones de defensa esenciales en las primeras fases tras la infección, sino que además proporciona el aviso de que existe una infección contra la cual debe organizarse una repuesta inmunitaria adaptativa subsiguiente. (Laso, 2001; Montaña; 2005)

Los componentes de la inmunidad innata son: barreras físicas, tales como la piel y las mucosas; moléculas tales como defensinas y complemento; y poblaciones celulares que incluyen a fagocitos como los macrófagos y neutrófilos, células presentadoras de antígenos como las células dendríticas y células linfoides (*células NK*). (Alberts 2008, Roitt 2003, Vega 2001, Rus 2005, Mayer 2006, Coronato 1998)

1.3.2 Inmunidad adaptativa.

El sistema inmune adaptativo permite una respuesta inmunitaria mayor, así como el establecimiento de la denominada memoria inmunológica, es específica de los antígenos y requiere el reconocimiento de estos, durante un proceso llamado presentación de los antígenos. La especificidad del antígeno permite la generación de respuestas que se adaptan a patógenos específicos o a las células infectadas por patógenos, la habilidad de montar estas respuestas específicas se mantiene en el organismo gracias a las células de memoria. Las células que conforman al sistema inmune adaptativo son una clase especial de leucocitos llamados linfocitos. (Janeway 2005)

Las células B y las células T son las clases principales de linfocitos. Las células B están involucradas en la respuesta inmune humoral, es decir, en la producción de anticuerpos. Las células T lo están con la respuesta inmunitaria mediada por células. (Janeway 2005)

La respuesta inmune se inicia con el reconocimiento de moléculas inespecíficas características de los patógenos y que, en conjunto, se denominan inmunoestimulantes asociados a patógenos (IAP). Las células del sistema inmune innato reconocen estas moléculas e inician una respuesta contra los patógenos que las portan. Como parte de esta respuesta, las células dendríticas reconocen y fagocitan a estos patógenos y migran hacia zonas pobladas por linfocitos (*como es el caso de los linfonodos*) en donde realizan la presentación de antígenos y activan la respuesta inmune adaptativa. ^(Montaño 2005, Abbas 2001)

1.4 Inmunidad de mucosas.

Las mucosas son un sitio de acceso para los patógenos por lo que se encuentran asociadas a poblaciones linfáticas, es el tejido linfoide relacionado a mucosas (MALT, *por sus siglas en inglés*). Dependiendo del órgano, este MALT recibe diferentes nombres, en intestino se denomina Tejido Linfoide Asociado a Intestino (GALT, *por sus siglas inglés*) y está representado por los linfonódulos solitarios y agregados, estos últimos formando placas que se pueden distinguir fácilmente, aún a simple vista. ^(Montaño 2005, Abbas 2001)

1.4.1 Sistema inmunitario de las mucosas.

La superficie de la mucosa gastrointestinal esta colonizada por linfocitos y células accesorias que permiten al organismo responder de forma óptima a los antígenos ingeridos. La distribución de linfocitos en el tracto gastrointestinal se encuentra principalmente: en el interior de la capa epitelial, distribuidos en toda la lámina propia y en agrupaciones organizadas como los linfonódulos agregados. ^(Abbas 2001)

- Interior de la capa epitelial. La mayoría de los linfocitos intraepiteliales son células T (CD8+). ^(Abbas 2001)
- Lámina propia. Contiene una población celular mixta, en la que se incluyen los linfocitos T (CD4+), además de grandes cantidades de linfocitos B+ y de células plasmáticas, así como macrófagos, células dendríticas, eosinófilos y mastocitos. ^(Abbas 2001)

Además de contener linfocitos distribuidos por toda la mucosa, el sistema inmunitario de las mucosas contiene tejidos linfoides organizados, el más destacado son los linfonódulos agregados. ^(Abbas 2001)

Anatómicamente los linfonódulos agregados están localizados en el lado antimesentérico del intestino delgado y son más prominentes en el íleon, morfológicamente los linfonódulos agregados están separados en tres regiones: área folicular, área parafolicular y folículos asociados a epitelio (FAE) e histológicamente difieren de los linfonodos porque no poseen cápsula, médula, conductos linfáticos ni bordes claros. Las regiones centrales de estos linfonódulos de la mucosa son áreas ricas en células B, y una pequeña cantidad de células T. (Abbas 2001, Ogra,1998)

El FAE está conformado principalmente por células M (*de membrana*) especializadas, células epiteliales columnares, linfocitos intraepiteliales, y exocriocitos caliciformes (*células secretoras de moco*). (Montaño 2005, Abbas 2001)

1.5 Células M.

Las células M son células epiteliales que se presentan en el epitelio asociado a GALT y representan una minoría en el epitelio intestinal, pero son de gran importancia ya que constituyen el medio de entrada a la infección e inmunización. (Neutra 1996, Kraehenbuhl 2000)

Se ha reportado que alrededor del 50% de la superficie del FAE en el conejo esta ocupado por células M. (Ogra 1998)

Las células M pueden captar antígenos y transportarlos por transcitosis desde el lumen intestinal hacia el intersticio y ponerlos en contacto con macrófagos y células dendríticas, las cuales migran posteriormente a los linfonódulos agregados en donde se inicia la respuesta inmune adaptativa. (Neutra 1996, Kraehenbuhl 2000)

Estructuralmente, las células M difieren en su superficie apical de los enterocitos de absorción ya que carecen del típico borde en cepillo, sin embargo presentan villina (*proteína que, junto con actina, forman el soporte de las microvellosidades*) pero distribuida de manera difusa en el citoplasma incapaz de ejercer su efecto morfogénico para la formación de las microvellosidades y expresan filamentos intermedios que no se encuentran en otras células intestinales por ejemplo la vimentina y citoqueratinas 8 y 18, reportadas en conejos, ratas y cerdos. (Neutra 1996, Kraehenbuhl 2000, Junqueira 2005, Lelouard 2001, Ogra 1998)

En el conejo el incremento de la vimentina en las células M es característico de la especie, mientras que en las células M de los porcinos predomina la citoqueratina 18 y en el ratón la citoqueratina 8 es la de mayor concentración. (Ogra 1998)

Además es de notarse la falta de una capa gruesa de glicocalix. Las células M tienen su lámina basal discontinua (*presenta numerosos orificios*) lo que facilita el tránsito a través de ella; además presentan una invaginación que forma una bolsa la cual contiene linfocitos epiteliales, esta misma invaginación hace que se disminuya la distancia a cruzar en la barrera epitelial. (Neutra 1996, Kraehenbuhl 2000, Junqueira 2005, Lelouard 2001)

Tienen un bajo contenido de lisosomas lo cual les permite el transporte de antígenos desde el lumen intestinal, con una mínima degradación enzimática. (Ogra 1998)

Las células M toman y transportan gran variedad de tipos y tallas de microorganismos y antígenos intestinales. Este proceso es único y depende en parte de factores que incluyen mediadores relacionados con células inmunocompetentes, factores hormonales y control nervioso. (Ogra 1998)

Sin embargo, las células M por un lado favorecen la respuesta inmune, pero por el otro pueden ser una vía de entrada para los patógenos. La explicación de la arquitectura molecular de las células M es importante para la comprensión de las estrategias que utilizan los patógenos para explotar esta vía y para utilizar a las células M como transporte para la entrega de antígenos al GALT. (Kraehenbuhl 2000)

1.5.1 Teorías sobre el origen de las células M.

1. Las células M se desarrollaron de células epiteliales columnares sobre los linfonódulos agregados.
2. Las células M provienen directamente de células indiferenciadas en las criptas situadas junto a los domos linfoides.
3. El tercer camino posible es que se generaron de un sistema de células indiferenciadas capaces de formar enterocitos o células M en la superficie del domo. (Ogra 1998)

Sin embargo ninguna de las 3 teorías ha sido aceptada, por lo que su origen aun es controversial.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la localización de las células M en el epitelio intestinal de conejo, utilizando diferentes marcadores celulares.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Reconocer a nivel histológico los diferentes tipos de células que conforman el epitelio intestinal.

- Demostrar la presencia de células M mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta e inmunoperoxidasa, en cortes histológicos de intestino utilizando anticuerpos dirigidos contra vimentina y citoqueratinas 8/18.

- Evaluar si vimentina y citoqueratinas 8/18 marcan de manera específica a las células M.

- Reconocer las regiones de intestino en donde se localizan las células M.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental.



3.2 Material biológico.

Se trabajó sobre muestras de tejidos intestinales de 3 conejos clínicamente sanos de 2 meses de edad, raza Nueva Zelanda, procesados mediante el método de inclusión de parafina. ^(Diaz 2008)

3.3 Obtención de muestras.

En un trabajo de tesis previo, (Diaz 2008), se realizó el estudio histológico del intestino delgado y grueso del conejo en el cual se obtuvieron cortes de distintas regiones de

tracto intestinal de 4 micras de grosor con el microtomo Leica RM 2125 RT. Las muestras colectadas se conservan en bloques de parafina y son las que se utilizaron para este trabajo.

Las secciones de tejidos que se trabajaron fueron las siguientes:

- Unión gastroduodenal
- Duodeno descendente
- Flexura duodenal caudal
- Duodeno ascendente parte media
- Unión duodeno yeyunal
- Yeyuno primer cuarto
- Yeyuno segundo cuarto
- Yeyuno tercer cuarto
- Yeyuno ultimo cuarto
- Unión yeyuno íleon
- Flexura del íleon
- Ámpula del íleon
- Parte media del ciego
- Unión ciego apéndice vermiforme
- Apéndice parte media
- Unión cecocolica
- Colon ascendente
- Colon descendente
- Recto
- Ano

3.3.1 Técnica de desparafinado.

Posteriormente las secciones de tejido embebido en parafina se sometieron al proceso de desparafinado mediante la siguiente serie de pasos y reactivos en los que se sumergieron.

- 10 minutos en solución de Xileno I.
- 10 minutos en solución de Xileno II.
- 10 minutos en alcohol absoluto I.

- 10 minutos en alcohol absoluto II.
- 10 minutos en alcohol 90 %. I
- 10 minutos en alcohol 90 %. II
- 10 minutos en alcohol 80 %.
- 10 minutos en alcohol 70 %.
- Enjuague en agua destilada.

Una vez desparafinadas las laminillas con los tejidos, se trasportan para su proceso en agua destilada.

Concluido el desparafinado se corrieron las pruebas de inmunomarcaje, ya sea utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta o bien la técnica de inmunoperoxidasa, en ambas pruebas se desafiaron 2 tipos de anticuerpos uno dirigido contra vimentina y otro contra citoqueratinas 8/18.

3.3.2 Reactivos utilizados.

Para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, se utilizaron los siguientes marcadores:

- Vimentina (V9) (Santa cruz de biotecnología, Inc *California. USA*)
- Mouse cytokeratin 8 & 18 (*Zymed -S. San Francisco, California. USA*)
- FITC- Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) (*Zymed -S. San Francisco, California. USA*)

3.4 Técnica de inmunofluorescencia.

3.4.1 Procedimiento.

Se realizó en la siguiente secuencia:

- 1) Las laminillas se colocan en solución buffer de fosfatos (PBS, *por sus siglas en inglés*).
- 2) Posteriormente se permeabilizaron las células por medio de una incubación con tritón al 0.5% en PBS, durante 20 minutos.
- 3) El tritón se retiró por lavado con solución de PBS.
- 4) Posteriormente se bloquearon proteínas utilizando albúmina sérica bovina (BSA, *por sus siglas en inglés*) al 1% en PBS, durante 20 minutos.
- 5) Se realizó otro lavado con PBS.

6) Se retiró el exceso de PBS alrededor de la muestra con papel absorbente, esto con la finalidad de no diluir el conjugado que se va a aplicar, siempre teniendo cuidado de no tocar la muestra.

7) Se aplicaron 30 microlitros de anticuerpo contra vimentina o citoqueratina 8/18 sobre la muestra y se incubaron en cámara húmeda durante 24 horas a 4 °C.

El anticuerpo contra vimentina se aplica a la concentración comercial y el anticuerpo contra citoqueratinas 8/18 se usa en dilución 1:20.

8) Pasado el tiempo se realizaron dos lavados con PBS.

9) El siguiente paso fue la aplicación del anticuerpo secundario a la muestra, se colocaron 30 microlitros del anticuerpo FITC-Rabbit Anti-Mouse IgG, diluido 1:20 en PBS, y las muestras se incubaron 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda, cubriendo perfectamente las muestras para evitar el paso de luz.

10) Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS.

11) Para retirar el exceso de solución de PBS se realizó un lavado final con agua desionizada.

13) Para realizar el montaje de las muestras se secó el exceso de agua del portaobjetos y se aplicó una gota de medio de montaje especial para fluorescencia con DAPI para marcar los núcleos (UltracruzTM sc-24941).

14) Se cubrió el área de la muestra con un cubreobjeto y se sellaron las orillas con esmalte para uñas.

15) Se almacenaron en refrigeración perfectamente cubiertas para evitar la entrada de luz la cual afectaría la fluorescencia.

Se observaron las diferentes secciones en el microscopio de fluorescencia y se procedió a la captura de imágenes.

3.5 Técnica de inmunoperoxidasa.

3.5.1 Procedimiento.

La técnica de inmunoperoxidasa se llevó a cabo con el kit Mouse ABC Staining Systems de Santa Cruz Biotechnology sc-2017. Todos los pasos se realizaron en cámara húmeda.

1. Las laminillas con las secciones de tejido fueron incubadas durante 10 minutos con solución de peróxido de hidrógeno al 5% con el fin de eliminar reacciones endógenas a la peroxidasa que pudieran afectar los resultados, se retiró la solución de peróxido por lavado con PBS durante 5 minutos.
2. Posteriormente se incubaron las secciones durante una hora en solución bloqueadora al 1.5%, transcurrido el tiempo se retiró el exceso.
3. Se colocaron 30 microlitros de los anticuerpos contra vimentina o contra citoqueratinas 8/18 sobre sus respectivos cortes y se incubaron toda la noche a 4°C. Se usaron las mismas concentraciones que las descritas para inmunofluorescencia. Pasado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con solución PBS durante 5 minutos.
4. La incubación con el anticuerpo secundario biotinilado se hizo durante 30 minutos con su posterior lavado con solución PBS.
5. Se incubó durante 30 minutos con la enzima reactiva AB (*avidina-biotinilado* HRP), transcurrido el tiempo se lavó durante 5 minutos con solución PBS.
6. El sustrato peroxidasa se aplicó en 1 o 2 gotas a cada laminilla durante 1 a 3 minutos dependiendo del grado de intensidad deseada. Se lavaron las secciones con agua desionizada.
7. Posteriormente se hizo la contratinción con hematoxilina y se hizo el montaje con resina.

Se observaron al microscopio óptico para realizar la captura de imágenes de los campos más representativos.

4. RESULTADOS

En el presente estudio se realizó la localización de las células M en el intestino delgado y grueso del conejo. Díaz Ferrer (2008) en un estudio previo realizó la caracterización histológica del intestino delgado y grueso del conejo a partir de donde se obtuvieron las muestras que fueron utilizadas en este trabajo. En la *Fig. 1* se muestra la localización de los epitelocitos con microvellosidades y los exocrinocitos caliciformes característicos del epitelio intestinal. A través de las tinciones histológicas utilizadas no es posible observar las células M por lo que su localización se basó en el uso de marcadores específicos de las mismas.

De acuerdo a la literatura, se utilizaron como marcadores de células M, un anticuerpo contra vimentina y otro dirigido contra citoqueratinas 8/18.

Se trabajaron las 20 muestras y para el caso de la marca con vimentina, las células positivas a las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa se presentaron en la unión yeyuno-ileal, ámpula, la unión del ciego con el apéndice vermiforme y en ano, de las cuales se presentan las imágenes.

Las *Figuras 2, 3 y 4* muestran células positivas a vimentina. La marca se observa a nivel del citoplasma de las células. Estas células están localizadas en el epitelio con amplia relación con la luz intestinal (*Fig. 5*). La *Fig.6.* muestra una región del ámpula con marcaje positivo relacionada a linfonódulos localizados debajo de la túnica mucosa.

Con el fin de corroborar los resultados se corrieron pruebas de los mismos cortes de tejido pero utilizando la técnica de inmunoperoxidasa con los mismos anticuerpos monoclonales, encontrándose congruencia con los resultados de la prueba de inmunofluorescencia como se muestra en las imágenes comparativas *Fig.7 y 8* así como *Fig.9 y 10* respectivamente.

En la región de la unión del ciego con el apéndice vermiforme también se observaron resultados similares con células positivas a la expresión de vimentina en el epitelio intestinal. Estas células representaban minoría en los campos observados y las células

que las rodeaban no presentaron sensibilidad al marcaje con este anticuerpo (*Figs.11 y 12*).

Las células M encontradas presentaron marcajes muy fuertes en ambas técnicas, lo que hizo fácil de evidenciar las diferencias con los enterocitos y exocrinocitos caliciformes que las rodeaban, (*Figs.13, 14 y 15*).

Como hallazgos se observaron células que presentaron reacción positiva al anticuerpo monoclonal contra vimentina, estas células corresponden a células de la serosa; reacción que se presentó de manera constante en todas las regiones que conforman el epitelio intestinal, en esta misma figura se muestra la marca de los núcleos con DAPI con el fin de ubicar a las células del mesotelio de la túnica serosa (*Fig. 16 A y B*).

En la zona anal se observaron células que expresan vimentina, la ubicación de estas células es por debajo del epitelio intestinal, (*Fig.17*).

En cuanto al marcaje con el anticuerpo monoclonal contra citoqueratinas 8/18, no se observó reacción positiva que pudiera sugerir el marcaje de células M, lo que si se notó es que en algunas zonas había células positivas cuya morfología correspondía a exocrinocitos caliciformes, *Figs.18 y 19*. También se observó marca en toda la vellosidad, (*Fig. 20*).

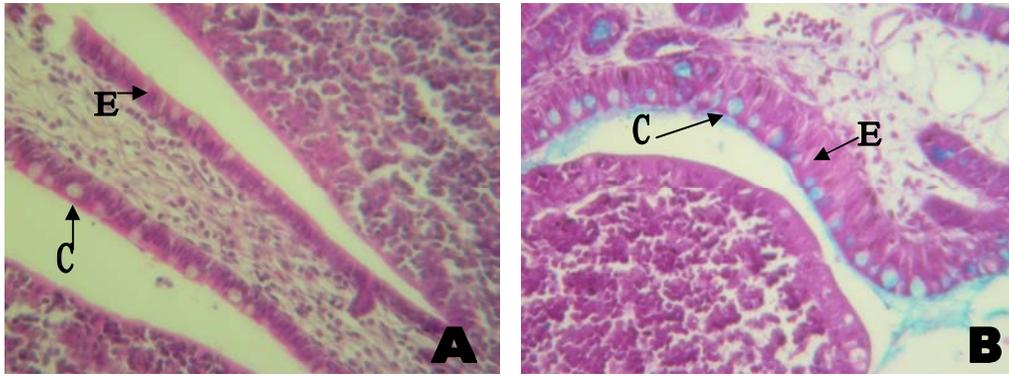


Fig. 1. Corte de íleon, A) Tinción HE, B) Tinción Azul de alciano.
Enterocitos (E) y Exocrinocitos caliciformes (C).

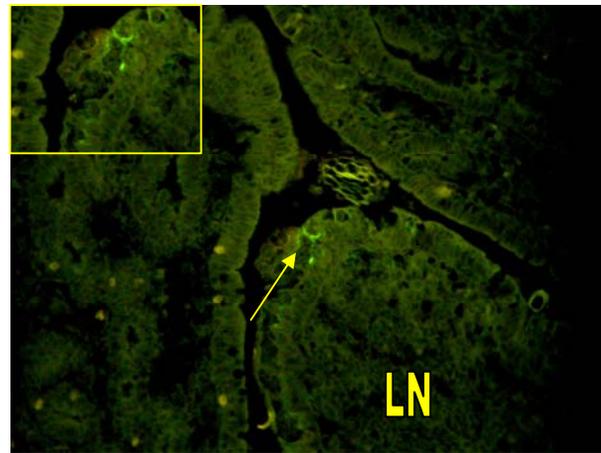


Fig.2. Unión yeyuno-íleon en el cual se destaca una célula positiva a vimentina (flecha). En el recuadro se visualiza el área marcada. Técnica de inmunofluorescencia indirecta, 40X.

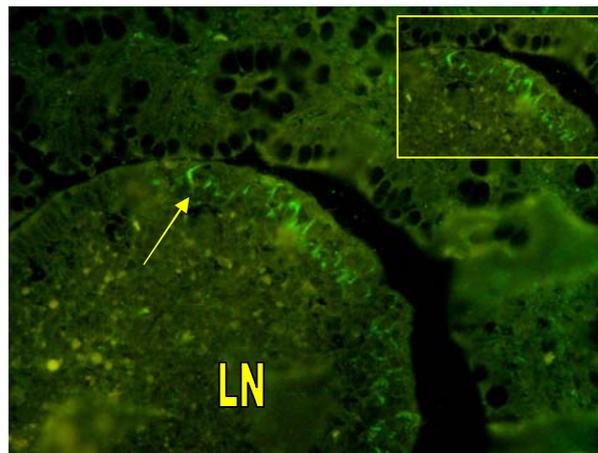
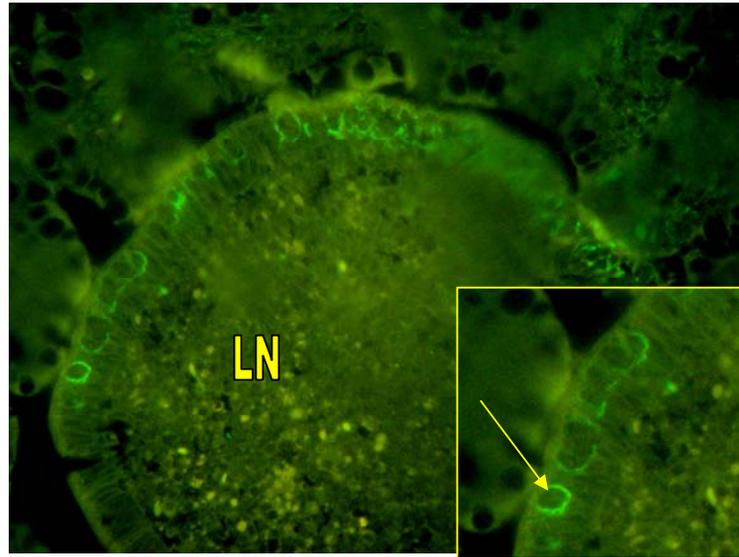
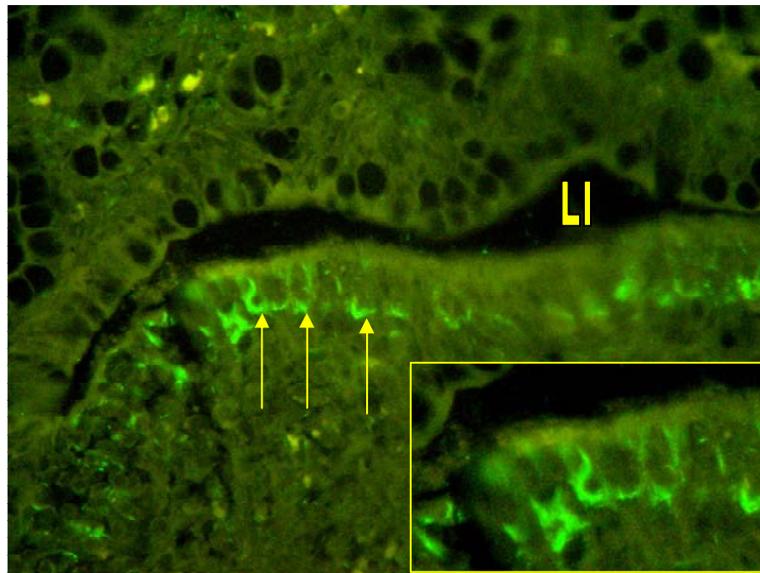


Fig. 3. Ámpula del íleon, seleccionando una zona con células con marca positiva a vimentina (flecha).
Linfonódulo (LN). Técnica de inmunofluorescencia indirecta, 40X.



*Fig. 4. Ámpula del íleon, seleccionando una zona con células con marca positiva a vimentina (flecha).
Linfonódulo (LN). Técnica de inmunofluorescencia indirecta, 40X.*



*Fig. 5. Ámpula del íleon con células positivas a vimentina (flecha) en relación a la luz intestinal (LI).
Técnica de inmunofluorescencia indirecta, 40X.*

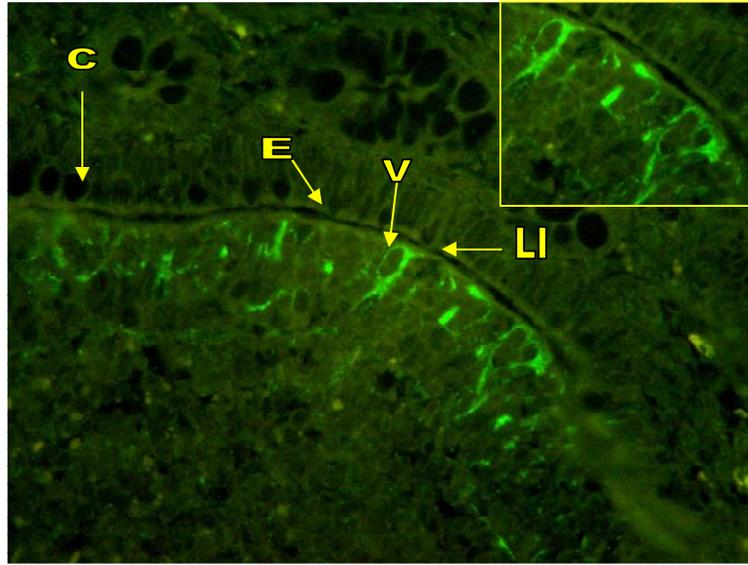
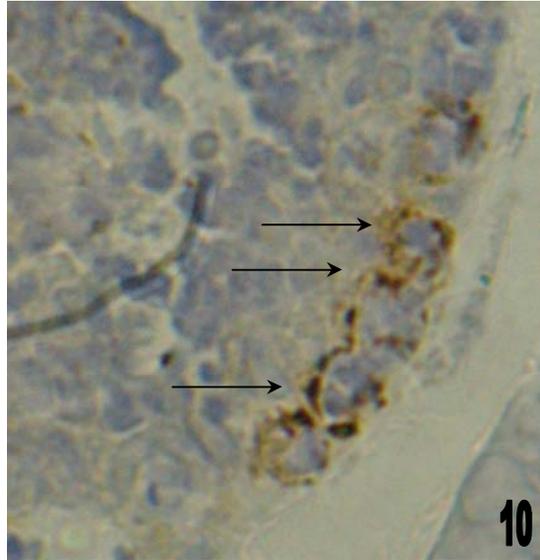
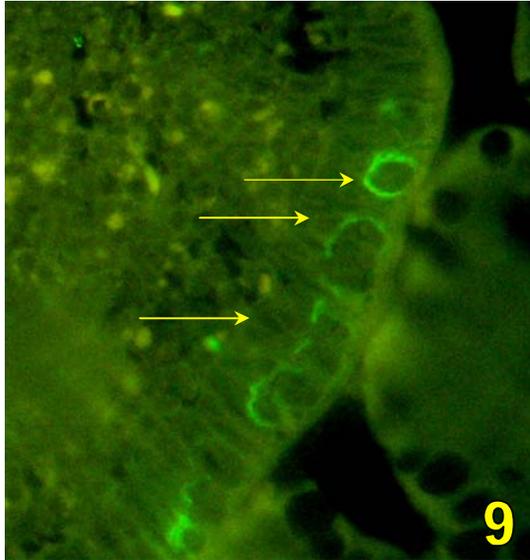


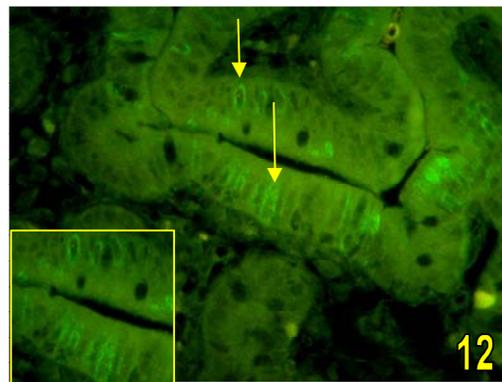
Fig. 6. Ámpula del íleon en donde se observan células positivas a vimentina (V), enterocitos (E), exocrinocitos caliciformes (C), luz intestinal (LI). Técnica de inmunofluorescencia indirecta, 40X.



Figs. 7 y 8. Íleon, células positivas (flechas), en ambas técnicas de inmunomarcaje, con anticuerpo dirigido a vimentina. Técnicas de inmunofluorescencia (Fig. 7) e inmunoperoxidasa (Fig. 8), 40X.



Figs. 9 y 10. Ámpula del íleon , células positivas (flechas), en ambas técnicas de inmunomarcaje se utilizó un anticuerpo dirigido contra vimentina. Técnicas de inmunofluorescencia (Fig. 9) e inmunoperoxidasa (Fig. 10), 40X.



Figs. 11 y 12, Región unión ciego apéndice vermiforme, células positivas a vimentina (flechas) en el epitelio intestinal rodeadas por células no marcadas. Técnica de inmunofluorescencia indirecta, 40X.



Fig. 13. Parte media del ciego. Célula con reacción positiva a vimentina (flecha), rodeada por enterocitos (E). Técnica inmunoperoxidasa, 40X.

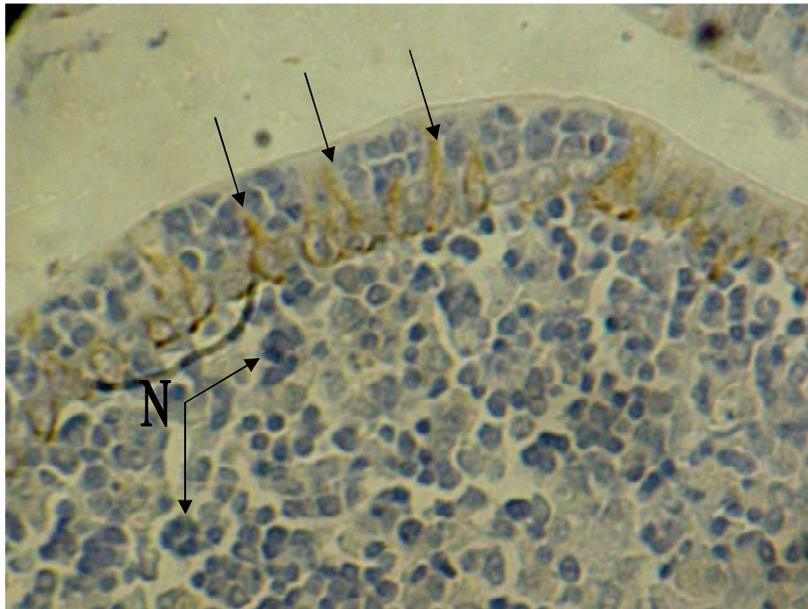
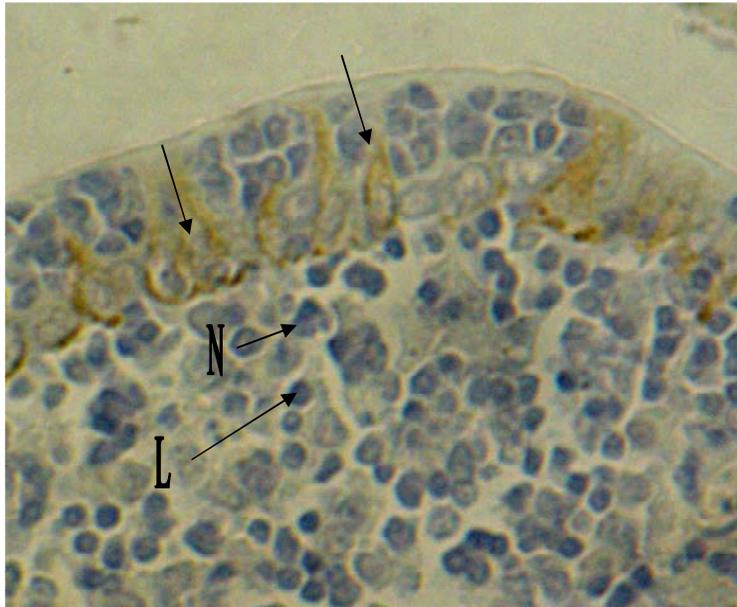


Fig. 14. Ámpula del íleon con células positivas a vimentina (flechas) y neutrófilos (N). Técnica inmunoperoxidasa, 40X.



*Fig. 15. Àmpula del íleon, células positivas a vimentina (flechas), linfocitos (L) y neutrófilos (N).
Técnica de inmunoperoxidasa, 40X.*

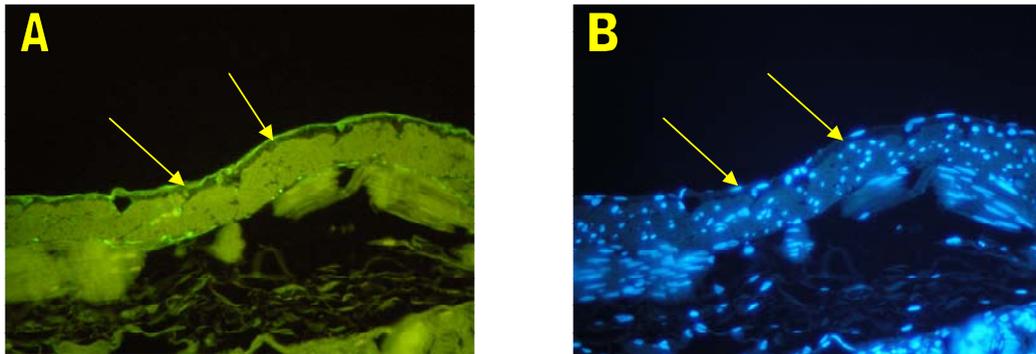


Fig. 16. A) Células positivas a Ac. antivimentina (flechas), correspondientes a la serosa del colon ascendente., B) Mismo campo observado con el filtro para núcleos marcados con DAPI. Técnica de inmunofluorescencia indirecta, 40X.

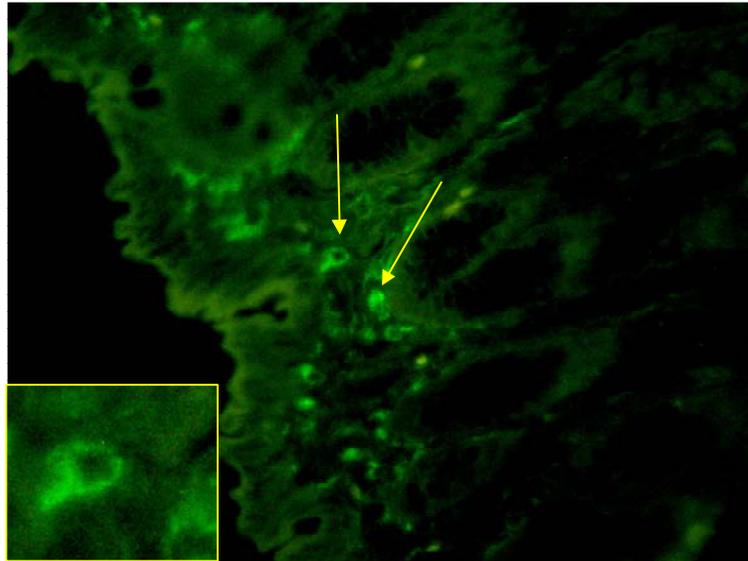
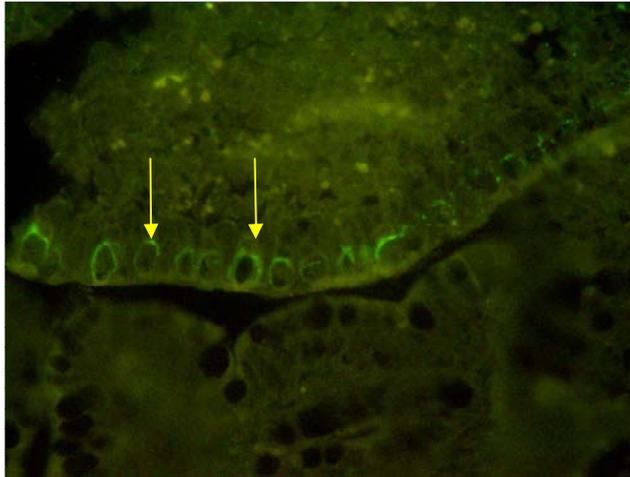


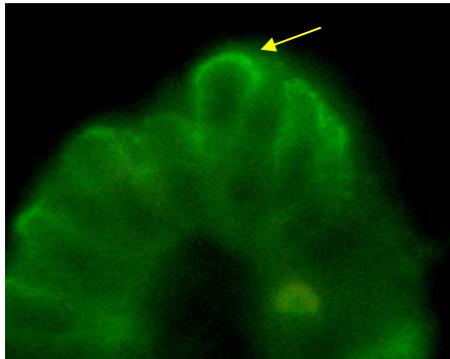
Fig. 17. Ano. Células positivas a vimentina (flecha). Técnica de inmunofluorescencia indirecta, 40X.



Fig. 18. Parte media del ciego, epitelios intestinales y exocinocitos caliciformes (flechas) con marca positiva a citoquetatinas 8/18. Técnica inmunofluorescencia indirecta, 40X.



*Fig. 19. Colon descendente con exocrinocitos caliciformes (flechas) positivos a citoqueratinas 8/18.
Técnica inmunofluorescencia indirecta, 40X.*



*Fig. 20. Íleon con marca de citoqueratinas 8/18 en enterocitos de las vellosidades intestinales (flecha).
Técnica de inmunofluorescencia indirecta, amplificación de una imagen 40X.*

5. DISCUSIÓN

En el epitelio intestinal del conejo hay filamentos intermedios de vimentina que son expresados de forma selecta en las células M del Epitelio Asociado al Folículo Linfático (FAE, *por sus siglas en inglés*). En este trabajo se encontraron células epiteliales intestinales positivas a esta proteína que por su localización y basados en los reportes previos podemos concluir que se trata de las células M. La vimentina expresada por estas células pudo ser detectada mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, tanto en intestino delgado como intestino grueso. Lelouard et al., 2001; Gebert et al., 1992, realizaron experimentos similares con resultados congruentes con los obtenidos en este trabajo.

Autores como Kraehenbuhl y Neutra, 2000, han reportado otros marcadores específicos de células M como son las citoqueratinas 8/18. Con relación a estas últimas, los anticuerpos contra citoqueratinas 8/18 desafiados en la fase experimental de esta tesis no arrojaron resultados congruentes con la localización, número y características morfológicas de las células M, por lo que las citoqueratinas 8/18 no son marcadores específicos de células M en el tejido intestinal del conejo. Ogra et al., 1998; Lügering et al., 2004, los reportan como marcadores específicos de células M en otras especies, citoqueratina 8 en ratas y citoqueratina 18 en cerdos, esto podría explicar las diferencias de nuestros resultados con aquellos obtenidos por ellos.

Aunque algunos autores reportan que alrededor del 50% de la superficie del epitelio asociado al folículo linfático en el conejo está ocupado por células M (Ogra et al., 1998), se debe destacar que la distribución de estas células no es constante a lo largo de toda la superficie intestinal, sino que se encuentra predominando en zonas específicas antes mencionadas en las que existe una mayor distribución de linfonódulos agregados en los cuales predominan linfocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, que permiten al organismo responder de forma óptima a los antígenos ingeridos, lo cual es congruente con su función de facilitador del transporte de patógenos hacia las células de defensa, este proceso es indispensable para la iniciación de una respuesta inmune capaz de atacar, controlar y detener la infección así como generar una memoria inmunológica duradera y específica. Nuestros resultados concuerdan con estos ya que nosotros observamos la presencia de las células M en íleon, unión íleocecal, apéndice

vermiforme y ano, regiones en las que se localiza en forma abundante, en el tejido linfoide asociado al intestino, formando estructuras descritas como domos (Diaz Ferrer, 2008). Por otro lado la bibliografía describe que anatómicamente los linfonódulos agregados están localizados en el lado antimesentérico del intestino delgado y son más prominentes en el íleon (Abbas *et al.*, 2001; Ogra *et al.*, 1998), por lo que apoya los resultados obtenidos en la localización de células positivas a M en esta región intestinal.

Sin embargo, también se obtuvo marca positiva a vimentina en células mesoteliales de la serosa intestinal, pero debido a su localización y características morfológicas pueden ser descartadas como células M.

En este trabajo y con el fin de descartar algún posible efecto del método en nuestros resultados, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica utilizando un kit comercial y los resultados fueron similares a los obtenidos por inmunofluorescencia lo que nos permite concluir la especificidad de los mismos. Hirohiko *et al.*, 2002, realizó experimentos similares con inmunoperoxidasa y sus resultados concuerdan con lo obtenido por nosotros.

6. CONCLUSIONES

1. Se realizaron los cortes de las diferentes regiones del intestino delgado y grueso de conejo, en las cuales se identificaron en la lámina epitelial a los epitelocitos con microvellosidades y exocrinocitos caliciformes, mediante las tinciones de HE y azul de alciano.
2. Se demostró la presencia de células M positivas a vimentina en el epitelio intestinal mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta.
3. Se identificaron células M en las regiones intestinales de la unión yeyuno-ileal, ámpula, la unión del ciego con el apéndice vermiforme y en ano, mediante el estudio de los campos por microscopía de fluorescencia.
4. Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta se corroboraron utilizando el método de inmunoperoxidasa.
5. Se observó también que células mesoteliales de la túnica serosa dieron marca positiva al anticuerpo anti-vimentina, por lo que esta proteína no es un marcador específico de células M en toda la pared intestinal como lo reportan algunos autores, sino únicamente a nivel del epitelio intestinal.
6. Se encontró que con el anticuerpo anti-citoqueratinas 8/18 se marcaban todas las células del epitelio intestinal localizadas en la vellosidad, por lo que se descarta esta proteína como un marcador específico de las células M en la lámina epitelial intestinal en esta especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S. Inmunología celular y molecular. 4ta Edición. España. McGraw-Hill-Interamericana. 2001. Pág. 280-302.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. US, Garland Publishing Inc, 2008.
3. Catalogo, Research Antibodies. Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2002
4. Chávez, Adams, Mercado, Torres, López, Martínez. Manual de Laboratorio de Histología Veterinaria. UNAM- CUAUTITLAN. México 2000.
5. Coronato S, Laguens G E, Spinelli O M, Salas M A, Di Girolamo W. Células dendríticas y su papel en patología. 1998. Cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires; Vol. 58. Pág. 209-218.
6. García T C G. Localización celular y subcelular de la distrofina de 71 kDa “founder sequense” (Dp71f) en encéfalo de rata. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-IPN, 2001.
7. Díaz F.P. Histología del intestino delgado e intestino grueso del conejo (*Oryctolagus cuniculos*). (Tesis de Licenciatura), Cuautitlán (Estado de México): FES-Cuautitlán UNAM, 2008.
8. Gebert A, Hach G, Bartels H. Co localization of vimentin and citokeratins in M-cells of rabbit gut-associated lymphoid tissue (GALT). 1992. Cells Tissue Res. 289. Pág 331-340.
9. Hirohiko I, Chizuru O, Masumi S. Vimentin-positive cells in the villus epithelium of the rabbit small intestine. 2002. Histochem Cell Biol 117. Pág. 363–370.

10. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. 6th Edición, Garland Science, 2005.
11. Junqueira L.C y Carneiro J. Histología básica. 6ta Edición, España. Masson, 2005 Pág. 299-302.
12. Kraehenbuhl JP y Neutra MR. Epithelial M cells: differentiation and function. 2000. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 16. Pag. 301-322.
13. Laso Borrego M. T., Inmunidad y prevención de la alergia a alimentos. 2001. Alergol Inmunol Clin; 16. Pág.58-75.
14. Lelouard H, Sahuquet A, Reggio H, Montcourrier P. Rabbit M cells and dome enterocytes are distinct cell lineages P. 2001. Journal of Cell Science 114, Pág. 2077-2083.
15. Lügering A, Floer M, Lügering C, Cichon MA, Schmidt W, Domschke T. Characterization of M cell formation and associated mononuclear cells during indomethacin-induced intestinal inflammation. 2004. Clin Exp Immunol. 136. Pág. 232-238.
16. Mayer, Gene. Microbiology and immunology On-Line Textbook. Immunology - Chapter Two: Complement *USC School of Medicine*. 2006. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/IgStruct2000.htm>
17. Montaña Hirose JA. Temas selectos de inmunología veterinaria. México. Manual Moderno. 2005 Pág. 71-77.
18. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl J P. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. 1996. Cell Press, vol. 86. Pág. 345-348.
19. Ogra PL, Bienenstock J, Mestecky J. Mucosal Immunology. 2 ed. U.S. Academic Press Inc. 1998.

20. Roitt I M, Delves P J. Inmunología. Fundamentos.10a edición. España. Panamericana. 2003.
21. Rus H, Cudrici C, Niculescu F. The role of the complement system in innate immunity. 2005. Immunol Res. Pág. 103-120.
22. Valdivia G, Cortés N, Alba F, Martínez H, Tórtora J, Montaraz A. Aspectos morfológicos e inmunológicos del apéndice cecal del conejo. 2007. Veterinaria México. 38 (3). Pág. 319-330.
23. Vega, M.A., Arenas G, Bailey M, González S, Stokes C R, Ortega M G, Mondragón R. Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. 2001. Developmental Immunology. 8(2). Pág.147-158.