

CÉLULAS MEMBRANOSAS INTESTINALES CUNICULARES

Origen, diferenciación e importancia médica

FERNANDO ADRIÁN PÉREZ,¹ ALBERTO ENRIQUE D'OTTAVIO,² STELLA MARIS ROMA M.D. PH.D³

1- Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario

2- Facultad de Ciencias Médicas y Consejo de Investigaciones, Universidad Nacional de Rosario

3- Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas y Consejo de Investigaciones, Universidad Nacional de Rosario

Resumen

Utilizando microscopía confocal, anticuerpos monoclonales Ki-67 y anti-vimentina, este artículo aporta datos sobre el origen y la diferenciación de las células membranosas, recurriendo a un modelo aún no utilizado: el apéndice cecal del conejo y a partir ello destaca su relevancia médica. En cuanto a su diferenciación, los primeros signos aparecen a nivel de la cripta y coinciden con células en etapa de división más acelerada, mientras que las células que completarán su maduración en el epitelio asociado al folículo y se asociarán con elementos linfoides ya se hallan predeterminadas antes de abandonar la cripta. En lo que atañe a su origen, las células M de conejo se originan a partir de células madre criptales, al igual que otras líneas celulares intestinales (enterocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas). Este estudio no sólo corrobora lo reportado en otros animales sino que resalta la relevancia médica de proseguir estudiando las vías moleculares de la diferenciación de las células M en virtud de que, en la actualidad, sirven como puerta de acceso para las vacunas orales y de que, complementariamente, se consideran útiles para la administración de antígenos en enfermedades autoinmunes.

Palabras clave: origen – diferenciación - conejo- apéndice cecal - células membranosas

CUNICULAR INTESTINAL MEMBRANOUS CELLS

Origin, differentiation and medical importance

Summary

Employing confocal microscopy and Ki-67 and anti-vimentin monoclonal antibodies, this article provides insights into the origin and differentiation of membranous cells resorting to a previously unused model: the rabbit cecal appendix and highlights from this its medical relevance. Regarding their differentiation, the first signs appear in the crypt and match with cells undergoing the most accelerated division stage, while the cells that will complete their maturation in the follicle-associated epithelium and will associate with lymphoid elements are already predetermined before leaving the crypt. Regarding their origin, rabbit M cells originate from cryptal stem cells, as other intestinal cell lines do (enterocytes, goblet cells, and enteroendocrine cells). This study not only corroborates what has been reported in other animals but also highlights the medical importance of continuing to study the molecular pathways of M cell differentiation, given that they currently serve as a gateway for oral vaccines and, additionally, are considered useful for the administration of antigens in autoimmune diseases.

Keywords: origin – differentiation – rabbit - cecal appendix - membranous cells

* Dirección de correo electrónico: aedottavio@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento inmunohomeostático digestivo requiere la monitorización del contenido luminal y el paso de pequeñas cantidades del mismo a través de la barrera epitelial así como su posterior contacto con el tejido linfoide subyacente. Tres tipos principales de células participan en este transporte: (a) células dendríticas, (b) células caliciformes y (c) células membranosas (M). Estas últimas abundan sobremanera (40-50 %) en el epitelio asociado a folículos (FAE) del conejo.¹

Las células M, al mantener intacta la barrera mucosa, constituyen la estructura más importante para la endocitosis y el transporte selectivo de antígenos luminale, principalmente particulados. Los antígenos, rodeados por una membrana que impide el ataque lisosomal, mantienen sus epítomos inalterados y son exocitados al espacio intercelular, donde las células inmunocompetentes inician la respuesta inmunitaria. Este proceso acorta significativamente la transcitosis.²

Tales células presentan pliegues ultraestructurales cortos e irregulares en su membrana apical, un glucocáliz delgado y escaso moco superficial. La porción citoplasmática cercana al lumen presenta abundantes vesículas endocíticas y pinocíticas, mientras que sus membranas basales laterales plegadas forman bolsas que albergan linfocitos intraepiteliales (LIE) de tamaño mediano o grande (linfoblastos y plasmoblastos). La profusión de ciertos organoides (RER, complejo de Golgi, mitocondrias), sus uniones oclusivas y adherentes, y la morfología nuclear evidencian una célula bien diferenciada, mientras que la abundancia vesicular y la ausencia de una red terminal revelan su función de transporte.³ Además, evidencian una actividad enzimática baja o nula (ATPasa, peroxidasa, fosfatasas ácidas y alcalinas) y un diseño ingenieril sugestivo, ya que la ausencia de microvellosidades adecuadas disminuye los residuos glucosídicos del glucocáliz (ácidos siálico, aspártico y glutámico, entre los principales) y los grupos aniónicos superficiales. Esto conlleva una disminución de las fuerzas electrostáticas negativas de repulsión y facilita la aproximación, adhesión y endocitosis de partículas. En resumen, las células M podrían actuar como una especie de aspiradora que captura partículas repelidas por los enterocitos con carga electronegativa, lo que explica su capacidad para atraer antígenos luminale.⁴

Morfológicamente, se han descrito tres subtipos de células M: (a) las canónicas, básicas o constitutivas, asociadas al tejido linfoide organizado, lo que permitiría la

captura eficiente de micropartículas; (b) las transdiferenciadas, ubicadas y agrupadas en los ápices de las vellosidades, que carecen de tejido linfático subyacente y serían más captadoras que transportadoras; y (c) las inducibles, relacionadas con el tejido linfoide terciario desorganizado y que surgen tras la estimulación con citoquinas como el TNF- α y la linfoxina. Estas células no están completamente maduras y podrían transferir el contenido luminal en exceso, aumentando así el estado inflamatorio.^{2, 5}

Finalmente, su origen y diferenciación han generado controversia, ya que algunos autores centran su origen en enterocitos maduros o mediante el contacto con células inmunitarias o con mediadores solubles,⁶⁻¹² mientras que otros lo hacen a partir de células madre ubicadas en la base de las criptas, lo que favorece su diferenciación a medida que ascienden hacia el ápice.¹³⁻¹⁸

En ese contexto, este artículo aporta datos sobre el origen y la diferenciación de las células membranosas, recurriendo a un modelo aún no utilizado: el apéndice cecal del conejo, y a partir de ello destaca su relevancia médica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron estudiados treinta conejos adultos de Nueva Zelanda de ambos sexos (con un peso entre 2,5 y 3 kg). Dos animales por jaula de alambre (50 cm de alto, 80 cm de largo y 60 cm de ancho, bajo una caseta de chapa de zinc aluminada) fueron alojados y expuestos a una ventilación adecuada, una temperatura entre 18 y 22 °C, una humedad relativa ambiental entre el 50 y el 70 % y un promedio de 15 horas de luz natural.

Los animales recibieron una dieta balanceada especial para conejos (máximo 17 % de proteína, mínimo 12 % de fibra y libre de albúmina) y agua potable *ad libitum*.

La eutanasia se realizó mediante inyección de pentobarbital sódico en la vena marginal de la oreja, seguida de desangrado mediante punción cardíaca.

El manejo de los animales durante todo el experimento se realizó de acuerdo con las normas bioéticas internacionales vigentes, exigidas por el Comité homónimo de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Rosario).

Fueron extraídas muestras de apéndice cecal de cada animal, sumergidas de inmediato en crioprotector (OCT) y congeladas rápidamente en nitrógeno líquido para su posterior conservación en un congelador a -70 °C. Se obtuvieron láminas de 40 μ m en un crióstomo y se inmunomarcaron simultáneamente con: (a) anticuerpos

monoclonales Ki-67 (clon MIB-1. DAKO) con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (Alexa Fluor 488 – BD Biosciences) para el recuento de células Ki-67 positivas (determinación del ciclo proliferativo de las células epiteliales de las criptas ligadas al folículo), y (b) anticuerpos monoclonales anti-vimentina (clon V9 – conjugado con fluorocromo 555 – SIGMA) para la diferenciación de células M mediante la reactividad positiva de sus filamentos intermedios intracitoplasmáticos.

Los núcleos se resaltaron con un colorante fluorescente para ADN (HOESCHT).

Las criptas fueron visualizadas en su totalidad. Se seleccionaron aquellas que incluían la base, el lumen y su unión con la cúpula, analizándose cinco criptas/órgano/conejo mediante el microscopio confocal de barrido láser (LSCM) equipado con el software correspondiente

proporcionado por el fabricante (NIKON), ubicado en el Instituto de Anatomía de la Universidad de Lübeck, Alemania.

Como se observa en la Figura 1, se trazó una línea imaginaria en el eje del lumen tubular, asignando el número 0 al núcleo situado en su extremo basal. Posteriormente, los núcleos celulares fueron numerados en orden creciente, consecutivo y ascendente desde allí hasta la unión con el FAE.^{19, 20}

Teniendo esto en cuenta, se consideró la posición del primer y último núcleo positivo en dirección ascendente para la proliferación celular (Figura 1, color verde); la ubicación de la primera célula positiva a vimentina para las células M (Figura 1, color rojo), y la posición de las células donde se superpusieron la proliferación y la diferenciación.

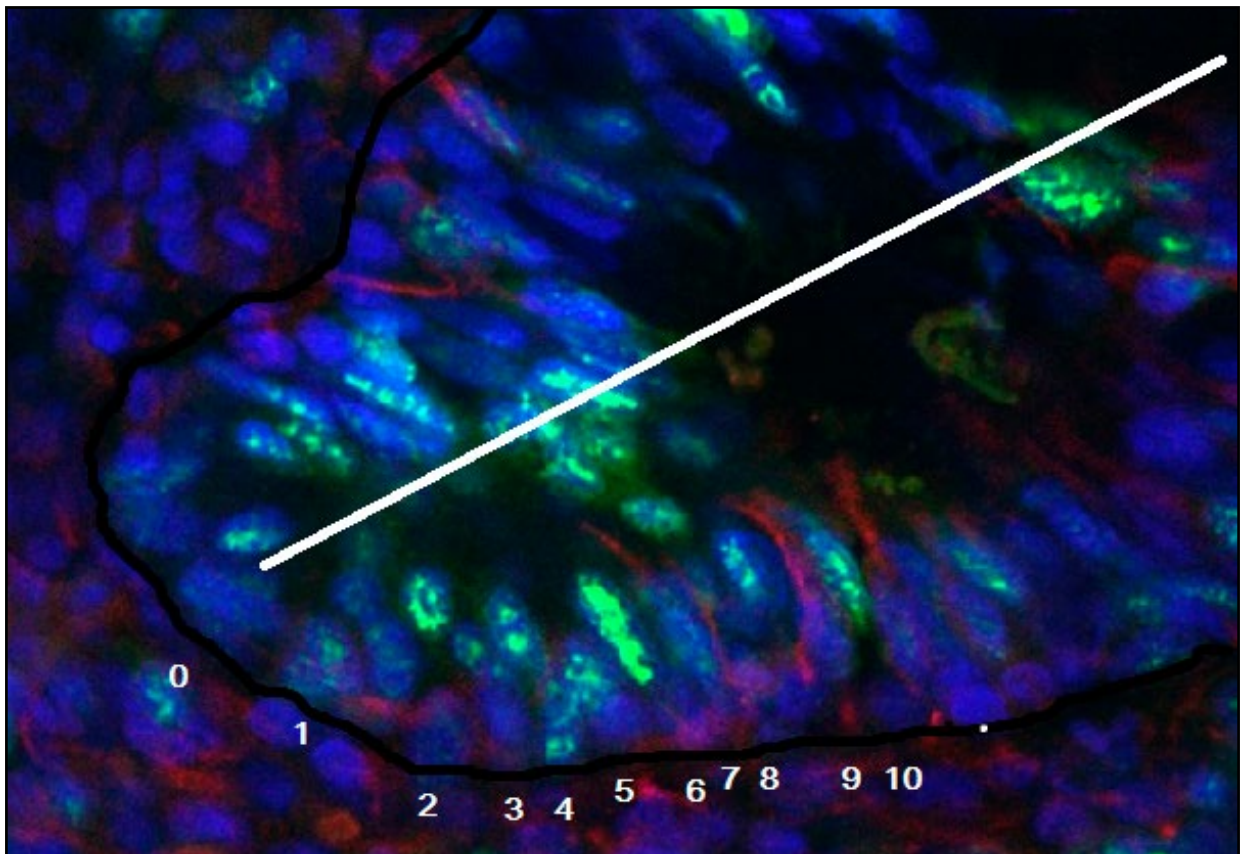


Figura 1. Cripta del apéndice cecal de conejo mediante microscopía confocal de barrido láser.

La línea negra separa la cripta del estroma adyacente y la bisectriz blanca indica su centro. Los números arábigos indican, de forma creciente, consecutiva y ascendente, la posición de los núcleos desde la base (extremo inferior de la bisectriz, posición 0) hasta la desembocadura en la FAE. Los núcleos en reposo se tiñeron de azul, los proliferantes de verde (Ki-67) y los filamentos de vimentina de rojo (clon V9).

RESULTADOS

La Tabla I muestra que en el apéndice cecal de conejo, la longitud de las criptas mostró una mediana de 16 células, con un rango extendido entre 12 y 20. Las células localizadas en los tercios inferior y medio, y en una parte limitada del tercio superior, fueron positivas para Ki-67. La actividad mitótica en el sector medio fue tan intensa que los núcleos se observaron agrupados y protruyendo hacia el lumen (Figura 2a). La última posición celular que mostró proliferación fue una mediana de 14, con un rango de 11 a 18.

Las células presentaron vimentina citoplasmática como un delgado filamento vertical yuxtannuclear desde la posición 7 (rango entre 4 y 9) (Figura 2b).

Además, las células criptales ubicadas cerca de la cúpula evidenciaron una mayor expresión de vimentina que las del lado opuesto; es decir, aproximadamente 8 células en división, revelando, simultáneamente, los primeros signos de diferenciación citoesquelética (superposición entre proliferación y diferenciación celular).

Parte de las células madre o indiferenciadas de la cripta intestinal proliferaron y, tras varios ciclos mitóticos, se diferenciaron hacia la línea M, de tal manera que, al alejarse de la cripta mencionada, algunas de ellas ya estaban predeterminadas hacia dicho linaje.

En la base de la cúpula y sobre la apertura criptal de todos los animales fueron detectadas células positivas para vimentina, columnares y sin pliegues en sus mem-

Tabla I. Longitud criptal, proliferación, diferenciación y superposición en apéndice cecal del conejo según LCSM

Longitud criptal (Número de núcleos)	Proliferación (Ki67- clon MIB1)	Diferenciación (Vimentina)	Superposición
Mediana/Rango	Mediana/Rango	Median/Range	Median/Rang
16	14	7	8,5
12 - 20	11 – 18	4 - 9	4 – 13

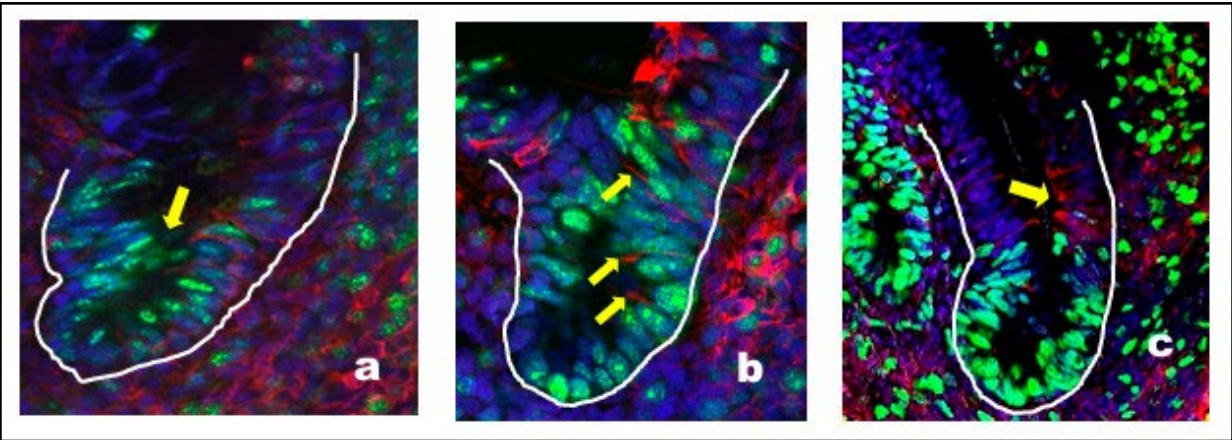


Figura 2. Imágenes de criptas del apéndice cecal de conejo obtenidas mediante LCSM.

La vimentina se observa en rojo; la proliferación de Ki67 en verde y los núcleos en azul. Los bordes de las criptas se muestran en blanco, donde se encuentra la membrana basal. (a) Los núcleos tienden a localizarse en el centro de las criptas y hacia el lumen, coincidiendo con la zona de mayor proliferación (flecha); (b) Antes de salir de la cripta y seguir proliferando, algunas células expresan Vimentina en su citoplasma como filamentos delgados, más notorios en el lado cóncavo, y (c) Las células M inmaduras y columnares aparecen con abundante Vimentina en su citoplasma y sin linfocitos.

branas; vale decir, sin bolsas con células inmunocompetentes alojadas en su interior. Estas células inmaduras solo pueden apreciarse en el apéndice cecal utilizando LSCM (Figura 2c).

En sentido ascendente, las células M albergaban numerosos linfocitos, distribuidos de forma difusa, en las porciones inferiores de la cúpula, donde el lumen intestinal se dispone en una hendidura. En el sector inmediatamente superior, cuyo lumen luce infundibular, las células M presentaban bolsas superficiales más definidas, albergando un menor número de células inmunocompetentes, principalmente blastos.

Por último, en el ápice, donde el lumen alcanza mayores dimensiones, hubo ausencia de células M.

DISCUSIÓN

El conejo es un lagomorfo herbívoro estricto, clasificado como fermentador y selector de concentrados. Dado que filogenéticamente está más emparentado con los primates que con los roedores, ofrece ventajas como animal de experimentación por sus similitudes anatómicas y fisiológicas con los humanos. En este sentido, el conejo también deviene modelo útil para ciertas enfermedades humanas.²¹

Según ya se señalara, el conejo aún no se ha empleado en este tipo de estudio, y su apéndice cecal es un órgano adecuado debido a la abundancia de células M.

Poniendo el acento en los resultados obtenidos, la proliferación de criptas ha sido investigada en el ciego y el intestino grueso del conejo, pero no en el órgano aquí analizado ni en las criptas asociadas al folículo.²²

Esta contribución reside en que el sector proliferativo se localiza en los dos tercios inferiores de las criptas, ya que los núcleos Ki-67 fueron positivos en la base misma de estas o en sus proximidades (esto es, en la posición 0 o inmediatamente a ella).

Considerar las células según su posición criptal y en dirección ascendente desde la base criptal hasta la unión cripto-dómica no sólo indica su ubicación sino que revela, asimismo, su edad y diferenciación. En cuanto a su edad, las células más antiguas son las más profundas y las más jóvenes se encuentran en dirección ascendente. En lo atinente a su diferenciación, las inferiores son las más indiferenciadas y adquieren diferenciación hacia un linaje determinado a medida de que ganan altura.

Cuando las células se dividen, las del compartimento proliferativo orientan su aparato mitótico paralelo al lumen, de modo que se añaden nuevas células siguiendo

la columna de núcleos preexistentes. Tras dos o tres rondas de divisiones celulares, coincidiendo con el sector medio de la cripta, la actividad mitótica se acelera, como lo refleja morfológicamente la acumulación nuclear que protruye hacia el lumen. Como se ha mencionado, la mediana del último núcleo que registra proliferación corresponde a la situada en la posición 14.

Pequeños rastros filamentosos de vimentina aparecen inicialmente en el citoplasma de células en rápida división, paralelas al eje nuclear mayor. Su mayor notoriedad en la vertiente folicular de la cripta equivale a decir que, coincidiendo con una mayor proliferación celular, pueden reconocerse los primeros signos de predeterminación hacia la línea M.

La diferencia con los autores que apoyan esta hipótesis radica en que emplearon técnicas indirectas únicamente en ratas y ratones.^{13-18, 23-27}

Por lo tanto, estos resultados contradicen la diferenciación a partir de enterocitos maduros, debida al contacto con células inmunitarias o con mediadores solubles, apoyada oportunamente por otros investigadores.⁶⁻¹² Además, existe una alta improbabilidad de que una célula madura, como el enterocito, pueda desdiferenciarse para luego rediferenciarse en otra línea celular, como M.

Cabe señalar, por su trascendencia médica futura, que a partir de 2014, hay autores que han comenzado a escudriñar las vías moleculares de esta diferenciación.²⁸⁻³⁰

CONCLUSIÓN

Los primeros signos de diferenciación, hacia la línea M coinciden a nivel de la cripta con las células en la etapa de división más acelerada.

Las células, que completarán su maduración en la FAE y se asociarán con elementos linfoides, ya están predeterminadas hacia la línea M antes de abandonar la cripta.

Las células M de conejo no se originarían a partir de enterocitos diferenciados, sino de células madre criptales, al igual que ocurre con las otras líneas celulares intestinales (enterocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas).

En síntesis, este estudio no sólo corrobora lo reportado en otros animales sino que resalta la relevancia médica de proseguir estudiando las vías moleculares de la diferenciación de las células M en virtud de que, en la actualidad, sirven como puerta de acceso para las vacu-

nas orales y de que, complementariamente, se consideran útiles para la administración de antígenos en enfermedades autoinmunes.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen profundamente al Dr. An-

dreas Gebert por su asistencia permanente y apoyo técnico (LCSM), especialmente a Stella Maris Roma y Fernando Adrián Pérez durante sus prácticas en su laboratorio (Centro de Biología Estructural y Celular en Medicina, Instituto de Anatomía, Universidad de Lübeck, Lübeck, Alemania).

BIBLIOGRAFÍA

- McDole J, Wheeler L, McDonald K, Wang B, Konjufca V y col. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*. 483(7389):345-349, 2012. <https://doi.org/10.1038/nature10863>
- Dillon A, Lo D. M cells: intelligent engineering of the mucosal immune surveillance. *Front Immunol*. 10(1):1499, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01499>
- 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*. 24(8):797-814, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(00\)00033-1](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(00)00033-1)
- Sneller M, Strober W. M cells and host defense. *J Infect Dis*. 154(5):737-741, 1986. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.5.737>
- Bennett K, Walker S, Lo D. Epithelial microvilli establish and electrostatic barrier to microbial adhesion. *Infect Immun*. 82(7):2860-2871, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01681-14>
- Smith M, Peacock M. M cell distribution in follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patch. *Am J Anat*. 159(2):167-175, 1980. <https://doi.org/10.1002/aja.1001590205>
- Bhalla D, Owen R. Cell renewal and migration in lymphoid follicles of Peyer's patches and cecum-An autoradiographic study in mice. *Gastroenterology*. 82(2): 232-242, 1982. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7054025/>
- Savidge T, Smith M, James P, Aldred P. Salmonella induces M-cell formation in germ free mouse Peyer's patch tissue. *Am J Pathol*. 139(1):177-184, 1991. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1886127/>
- Smith M, Peacock M. Microvillus growth and M cells formation in mouse Peyer's patch follicle associated epithelial tissue. *Exp Physiol*. 77(2):389-392, 1992. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1992.sp003600>
- Kernéis S, Bogdanova A, Kaehenbuhl J, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Sci*. 277(5328):949-952, 1997. <https://doi.org/10.1126/science.277.5328.949>
- 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*. 79(11):1393-1401, 1999. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10576210/>
- Nicoletti C. Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut*. 47 (5):735-739, 2000. <https://doi.org/10.1136/gut.47.5.735>
- Bye W, Allan C, Trier J. Structure, distribution and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology*. 86(5 Pt 1):789-801, 1984. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6706062/>
- Roy M. Precocious development of lectin (Ulex europaeus agglutinin I) receptors in dome epithelium of gut-associated lymphoid tissues. *Cell Tissue Res*. 248(3):483-489, 1987. <https://doi.org/10.1007/BF00216473>
- 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*. 269 (2): 331 - 340, 1992.. <https://doi.org/10.1007/BF00319625>
- 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*. 273(2):127-136, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00304619>
- Gebert A, Posselt W. Glycoconjugate expression defines the origin and differentiation pathway of intestinal M-cells. *J Histochem Cytochem*. 45(10):1341-1350, 1997. <https://doi.org/10.1177/002215549704501003>

18. 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* 154(5):1573-1582, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65410-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65410-7)
19. Marshman E, Booth C, Potten C. The intestinal epithelial stem cell. *BIOEEJ*. 24(1):91-98, 2002. <https://doi.org/10.1002/bies.10028>
20. Potten C, Booth C, Hargreaves D. The small intestine as a model for evaluating adult tissue stem cell drug targets. *Cell Prolif*. 36(3):115-129, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00264.x>.
21. Haines R, Urbiztondo R, Haynes R, Simpson E, Niewiesk S y col. haracterization of New Zealand white rabbit Gut-associated lymphoid tissues and use as viral oncology animal model. *ILAR J*. 57(1): 34-43, 2016. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw004>
22. Grant T, Specian R. Epithelial cell dynamics in rabbit cecum and proximal colon P1. *Anat Rec*. 26 (4):427-437, 2001. <https://doi.org/10.1002/ar.1161>
23. Lügering A, Floer M, Westphal S, Maaser C, Spahn T y col. Absence of CCR6 inhibits CD4+ regulatory T-Cell development and MCell formation inside Peyer's patch. *Am J Pathol*, 166(6):1647-1654,2005. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62475-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62475-3)
24. Westphal S, Luger A, von Wedel J, von Eiff Ch y col. Resistance of chemokine receptor 6-deficient mice to *Yersinia enterocolitica* infection. *Am J Pathol*. 172(3):671-680, 2008. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070393>
25. Knoop K, Kumar N, Butler B, Sakthivel S, Taylor R y col. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol*. 183(9):5738-5747, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901563>
26. Hsieh E, Fernández X, Wang J, Hamer M, Calvillo S y col. CD137 is required for M cell functional maturation but not lineage commitment. *Am J Pathol*. 177(2):666-676, 2010. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090811>
27. Ebisawa M, Hase K, Takahashi D, Kitamura H, Knoop K y col. CCR6hiCD11int B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. *Int Immunol*. 23(4):261-269, 2011. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq478>
28. Kanaya T, Ohno H. The mechanisms of M-cell differentiation. *BMFH*. 33(3):91-97, 2014. <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.91>
29. Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H y col.. Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of the maturation in cecal patches. *Mucosal Immunol*. 8(3):650-660, 2015. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.99>
30. Kimura S. Molecular insights into the mechanisms of M-cells differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anat Sci Int*. 93(1):23-34, 2018 <https://doi.org/10.1007/s12565-017-0418-6>