

Aspectos morfológicos e inmunológicos del apéndice cecal del conejo.

Morphological and immunologic aspects of the cecal appendix of the rabbit

Guillermo Valdivia Anda* Norhan Cortés Fernández de Arcipreste* Fernando Alba Hurtado*
Humberto Alejandro Martínez Rodríguez* Jorge Luis Tórtora Pérez* Juan Antonio Montaraz Crespo**

Abstract

For many years, the rabbit has been used as a laboratory animal; however, up until now, little is known about the precise function of some of his organs, like the cecal appendix. The objective of the present study was to describe some aspects related to the lymphocyte composition, in order to understand some immunologic answers of the organ in animal models. An anatomical, histological and immunohistological study of the cecal appendix was carried out on New Zealand rabbit from its fetus stage until three years old, by conventional techniques of dissection, microscopy with paraffin cuts stained with hematoxylin and eosin, as well as immunoperoxidase techniques, for markers of lymphocytes' differentiation CD4, CD43, CD25 and CD5; as well as histochemical techniques to look for plasmatic cells, in this way, the marked lymphocytes were counted by optic microscopy coupled to an analyser of images. Changes in the mucosal and the submucosal layers were observed with two types of projections, villus and dome, with epithelium that suggests an absorption/secretion function in the villi and antigen exchange in the dome. The lymphocytes population was bigger and more defined in the dome ($P < 0.05$) and it is constituted by two lymphoid nodules, the superficial ones in the mucous layers with predominance of T active and responsive lymphocytes, marked with CD43, in comparison to the deepest ones in the submucosal layers with CD4 lymphocytes and plasmatic cells ($P < 0.05$). The full structural appendix development is acquired from 30 days of age, in animals of 60 days, the nodule of the mucous layer has characteristics of secondary lymphoid area, resembling jejunal Peyer's patches; while the deep one maintains characteristics of primary lymphoid area, resembling the Fabricius bursa, developing since birth and persisting a lifetime.

Key words: CECAL APPENDIX, RABBITS, IMMUNOLOGIC DEVELOPMENT, LYMPHOCYTES'

Resumen

El conejo se ha utilizado durante muchos años como animal de laboratorio; sin embargo, a la fecha se conoce poco del funcionamiento preciso de algunos de sus órganos, como el apéndice cecal. El objetivo del presente trabajo fue describir algunos aspectos relacionados con la composición de linfocitos para entender ciertas respuestas inmunológicas de ese órgano en modelos animales. Se realizó un estudio anatómico, histológico e inmunohistológico del apéndice cecal del conejo de la raza Nueva Zelanda, desde el feto hasta los tres años, mediante técnicas convencionales de disección, microscopía con cortes en parafina teñidos por hematoxilina y eosina, así como técnicas de inmunoperoxidasa para marcadores de diferenciación de linfocitos CD4, CD43, CD25 y CD5; para buscar células plasmáticas se usaron técnicas de histoquímica. De este modo, los linfocitos marcados se contaron mediante microscopía óptica acoplada a un analizador de imágenes. Se observaron cambios en la mucosa y en la submucosa con dos tipos de proyecciones, vellosidad y domo, con un epitelio que sugiere una función de absorción/secretión en la vellosidad, y de intercambio antigénico en el domo. La población de linfocitos fue mayor y más definida en el domo ($P < 0.05$) y está constituida por dos nódulos linfoides, el superficial en la mucosa con predominio de linfocitos T activos y de respuesta, marcados con CD43, y el más profundo en la submucosa con linfocitos CD4 y células plasmáticas ($P < 0.05$). Se adquiere el desarrollo estructural pleno del apéndice a los 30 días de edad; en los animales de 60 días se observó que el nódulo de la mucosa tiene características de zona linfoide secundaria, semejando una placa de Peyer yeyunal; mientras el profundo mantiene características de área linfoide primaria, semejando la Bolsa de Fabricio, que se desarrolla desde el nacimiento y persiste toda la vida.

Palabras clave: APÉNDICE CECAL, CONEJOS, DESARROLLO INMUNOLÓGICO, MARCAJE DE LINFOCITOS.

Recibido el 15 de diciembre de 2005 y aceptado el 21 de septiembre de 2006.

*Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal Departamento de Ciencias Biológicas, km 2.5, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, 55714, Estado de México, México.

**Laboratorio de Inmunología, Coordinación de Posgrado, km 2.5, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, s/n, Cuautitlán- Izcalli, 55714, Estado de México, México.

Nota: Los resultados parciales de este trabajo corresponden a la tesis de maestría de Guillermo Valdivia Anda y con la tesis de licenciatura de Norhan Cortés Fernández de Arcipreste.

Autor responsable y solicitud de sobretiros: Guillermo Valdivia Anda, Ciprés 53, Fraccionamiento Los Morales, Cuautitlán, Estado de México, México, Tel. 58701025, correo electrónico: valdivag@servidor.unam.mx

El trabajo fue financiado por los proyectos: PAPIIT IN220599, PAPIIT IN 216005, Cátedra de Investigación 5.21 "Mecanismos de Patogenicidad Microbianos" de la FES-Cuautitlán-UNAM.

Introduction

The large intestine extends from the ileocecal union through the anus, it includes the cecum, cecal appendix, colon, rectum and anal canal. In the rabbit, the cecum constitutes a large blind pouch that continues to the proximal colon. In its distal portion, the cecum continues with the cecal appendix, from which it is anatomically distinguished.¹

The wall of the digestive tube is formed by four principle layers: mucosa, submucosa, muscular and serous. The mucosa is integrated by column epithelium, the connective tissue in the propria lamina and the muscular mucosa; in the propria lamina numerous blood and lymphatic vessels are found that project up to the basal epithelium, this forms projections (villus) inwards the lumen, they have microvilli in the striated border (brush rivet) and originate by mitotic division in the basal portion of the crypts, migrate to the surface to end peeling into the intestinal lumen. The mucosa of the large intestine has no villi, the lamina propria is thicker than in the small intestine, the Lieberkühn crypts are deeper, have no Paneth cells and present more caliciform cells than in the small intestine.²

The vermiform or cecal appendix is embryologically originated in the same place as the cecum, but without suffering its characteristic dilatation; the mucosa of the epithelium resembles the one of the large intestine, but in the lamina propria abundant lymphatic tissue is observed organized in nodules with germinal centers. In human and all species, the number of lymphatic nodules in the mucosa and submucosa of the intestine diminishes with age. The muscular layer of the mucosa may be absent in some places of the cecal appendix.²

There is some evidence of the cecal's appendix role in the immune response, like the one observed when an appendectomy is done at the first week of age in the rabbit, producing deficiency in the humoral response of the intestinal mucosa.³

For his anatomical characteristics, abundance of lymphoid tissue and apparent immune importance, the cecal appendix of the rabbit is useful as a biological model when trying to evaluate the response of the lymphoid tissue associated with the intestine and its immune capacity. For example, in the studies of Valdivia *et al.*,⁴ where a reduction in quantity of lymphocytes after inoculating the cecal appendix with strains of *E. coli* producer of verotoxins was observed, also, a reduction of cellular and humoral immunity has been detected in a model as the previous, but developed in a chronic way.⁵

In this work the microscopic morphology of the

Introducción

El intestino grueso se extiende desde la unión ileocecal al ano, comprende al ciego, el apéndice cecal, el colon, el recto y el canal anal. En el conejo, el ciego constituye un gran fondo de saco que se continúa con el colon proximal. En su porción distal, el ciego se continúa con el apéndice cecal, del que se distingue anatómicamente.¹

La pared del tubo digestivo la forman cuatro capas principales: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa la integran un epitelio columnar, el tejido conectivo en la lámina propia y la muscular de la mucosa; en la lámina propia se encuentran muchos capilares sanguíneos y linfáticos que se proyectan hasta la basal del epitelio, éste forma proyecciones (vellosidades) hacia la luz, tienen microvellosidades en el borde estriado (ribete en cepillo) y se originan por división mitótica en la porción basal de las criptas, migran hacia la superficie para terminar descamando hacia la luz intestinal. La mucosa del intestino grueso no tiene vellosidades, la lámina propia es más gruesa que la del intestino delgado, las criptas de Lieberkühn son más profundas, no tienen células de Paneth y presentan más células caliciformes que las del intestino delgado.²

El apéndice vermiforme o cecal se origina embriológicamente en el mismo lugar que el ciego, pero sin sufrir su dilatación característica; el epitelio de la mucosa es parecido al del intestino grueso, pero en la lámina propia se observa abundante tejido linfático organizado en nódulos con centros germinativos. En el humano y en todas las especies, el número de nódulos linfáticos en la mucosa y submucosa del intestino disminuye con la edad. La capa muscular de la mucosa puede faltar en algunos lugares del apéndice cecal.²

Existen algunas evidencias del papel del apéndice cecal en la respuesta inmune, como la observación de que la apendicectomía en la primera semana de edad en el conejo produjo deficiencias en la respuesta humoral de la mucosa intestinal.³

Por sus características anatómicas, abundancia de tejido linfoide y aparente importancia inmune, el apéndice cecal del conejo es útil como modelo biológico cuando se trata de evaluar la respuesta del tejido linfoide asociado con intestino y su capacidad inmune. Por ejemplo, en los trabajos de Valdivia *et al.*,⁴ donde se observó disminución de la cantidad de linfocitos después de la inoculación del apéndice cecal con cepas de *E. coli* productora de verotoxinas, también se ha detectado disminución de la inmunidad celular y humoral en un modelo como el anterior, pero desarrollado en forma crónica.⁵

En este trabajo se describe la morfología micros-

rabbits' cecal appendix is described, as well as its lymphoid population.

Material and methods

Twenty-two rabbits of New Zealand breed were used, obtained from the agriculture and animal production module of the Faculty of Superior Studies-Cuautitlan (FESC) of the National Autonomous University of Mexico, two animals of different ages were selected, including pregnancy, apparently healthy, without considering gender, which were euthanized at 17 and 20 days of pregnancy, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 300 days and three years old.

The rabbits were euthanized using chloroform to induce insensibility, and immediately necropsy was performed to extract the cecal appendix (CA), this was measured and weighted; also the total weight of the animal was noted. The appendix was placed in buffered formaline at 10% for 24 h, then cut transversally and longitudinally and kept for 48 h more. The fragments were included in paraffin, cut to 4 μ m; the cuts were stained by hematoxilin and eosin technique⁶ for its microscopic evaluation. Photographs were taken with several amplifications and a morphological sketch of the cecal appendix was done.

For the evaluation of the type of lymphocytes present, four rabbits of 60 days of age were used, paraffin inclusion cuts of the CA were done, they were de-paraffinated and treated with monoclonal antibodies against cluster differentiation (CD) as markers CD4 (cooperators and T lymphocytes), CD43 (T cells, lymphocytes, monocytes, macrophages), CD5 (T lymphocytes) and CD25 (T and B activated cells, activated macrophages, IL-2 receptor)*, developing with immunoperoxidase biotine,** using the manufacturer's recommendation as follows: the cuts were rehydrated in TrisPBS at 7.6 pH, the endogen peroxidase was inhibited by methanol and hydrogen peroxide (0.6%) for seven minutes, normal rabbit diluted serum 1:5 was added, it was washed and then the monoclonal antibody against the CD used, diluted in 1 200 and incubated at 37°C during 1 hour, was added. The secondary antibody (biotinylated antimouse diluted 1:200), incubated for 1 h, washed and StreptABComplex/HRP was added, it was incubated for 45 minutes and the development was done with DAB counter staining with Harris's hematoxiline.

Besides, methylpyronine green stain was used for plasmatic cells;^{6,7} after hydrating the cuts, a pyronine solution (0.5%) was added for 30 minutes and fast green (0.5%) in buffered solution at pH 4.8, for 10 minutes, then washing, dehydrating and including the cuts in resin, finally a slide was placed over.

Readings and count of marked cells were done in

cópica del apéndice cecal del conejo, así como la distribución de las poblaciones linfoides en él.

Material y métodos

Se utilizaron 22 conejos de la raza Nueva Zelanda, obtenidos del módulo de producción agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (FESC) de la Universidad Nacional Autónoma de México, se seleccionaron dos animales a diferentes edades, incluyendo la gestación, aparentemente sanos, sin considerar el sexo, que fueron sacrificados a los 17 y 20 días de gestación, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 300 días y tres años de edad.

Los conejos fueron sacrificados mediante insensibilización con cloroformo, e inmediatamente se les realizó la necropsia para revisar el cadáver y extraer el apéndice cecal (AC), éste se midió y se pesó; también se tomaron los datos del peso total del animal. El apéndice se colocó durante 24 h en formalina amortiguadora al 10%, luego se seccionó en forma transversal y longitudinal y se mantuvo en la formalina durante 48 h más. Los fragmentos se incluyeron en parafina, cortados a 4 μ m; los cortes se tiñeron por la técnica de hematoxilina y eosina⁶ para su evaluación en el microscopio. Se tomaron fotografías con diversas amplificaciones y se realizó un esquema de la morfología del apéndice cecal.

Para la evaluación del tipo de linfocitos presentes se utilizaron cuatro conejos de 60 días de edad, se realizaron cortes por inclusión en parafina del AC, se desparafinaron y se trataron con anticuerpos monoclonales contra los cluster de diferenciación (CD) como marcadores CD4 (T cooperadores y timocitos), CD43 (células T, timocitos, monocitos, macrófagos), CD5 (linfocitos T) y CD25 (células T y B activadas, macrófagos activados, receptor de IL-2)*, revelando con biotina inmunoperoxidasa,** utilizando la metodología recomendada por el fabricante de la manera siguiente: los cortes se rehidrataron en TrisPBS a pH de 7.6, se inhibió la peroxidasa endógena mediante metanol y peróxido de hidrógeno (0.6%) durante siete minutos, se agregó suero normal de conejo diluido 1:5, se lavó y después se adicionó el anticuerpo monoclonal contra los CD empleados, diluido 1:200 y se incubó a 37°C durante 1 h. Se agregó el anticuerpo secundario (anti-ratón biotinilado, diluido 1:200), se incubó por 1 h, se lavó y se agregó el StreptABComplex/HRP, se incubó por 45 min y el revelado se realizó con DAB contratiñendo con hematoxilina de Harris.

Además, se utilizó la tinción de verde metilpironina para células plasmáticas;^{6,7} así, después de hidratar los

*Serotec, Reino Unido.

**Dako, Reino Unido.

all cases , of four cuts obtained form the cecal appendix of different rabbits: the dome areas and the villus were divided in base, intermediate and surface; five fields in each area were revised with the microscope, for which dry strong objective (400 X) was used (Figure 1).

Statistic program (Windows®) was used for the statistical analysis of the data, to establish the ranges considering a normal distribution and $\pm$ two standard deviations; for the comparison between means Student's t test was used.

Results

The results showed that the CA increases its size with age, going from 0.5 cm to 13.4 cm of length in average with a weight of 3.0 to 160 g (Table 1), with proportional growth of the organ up to 300 days and stabi-

cortes, se agregó durante 30 minutos una solución de pironina (0.5%) y verde rápido (0.5%) en solución amortiguadora a pH 4.8, durante 10 min, para después lavar, deshidratar e incluir los cortes en resina, finalmente se les colocó un cubreobjetos.

En todos los casos se realizaron lecturas y conteo de las células marcadas, de cuatro cortes obtenidos del apéndice cecal de diferentes conejos: las áreas del domo y la vellosidad se dividieron en base, intermedia y superficie; se revisaron con el microscopio cinco campos en cada área, para lo cual se usó el objetivo seco fuerte (400 X) (Figura 1).

Se utilizó el programa Statistic (Windows®) para el análisis estadístico de los datos, para establecer los rangos considerando una distribución normal y $\pm$ dos desviaciones estándar; para la comparación entre medias se usó la prueba t de Student.

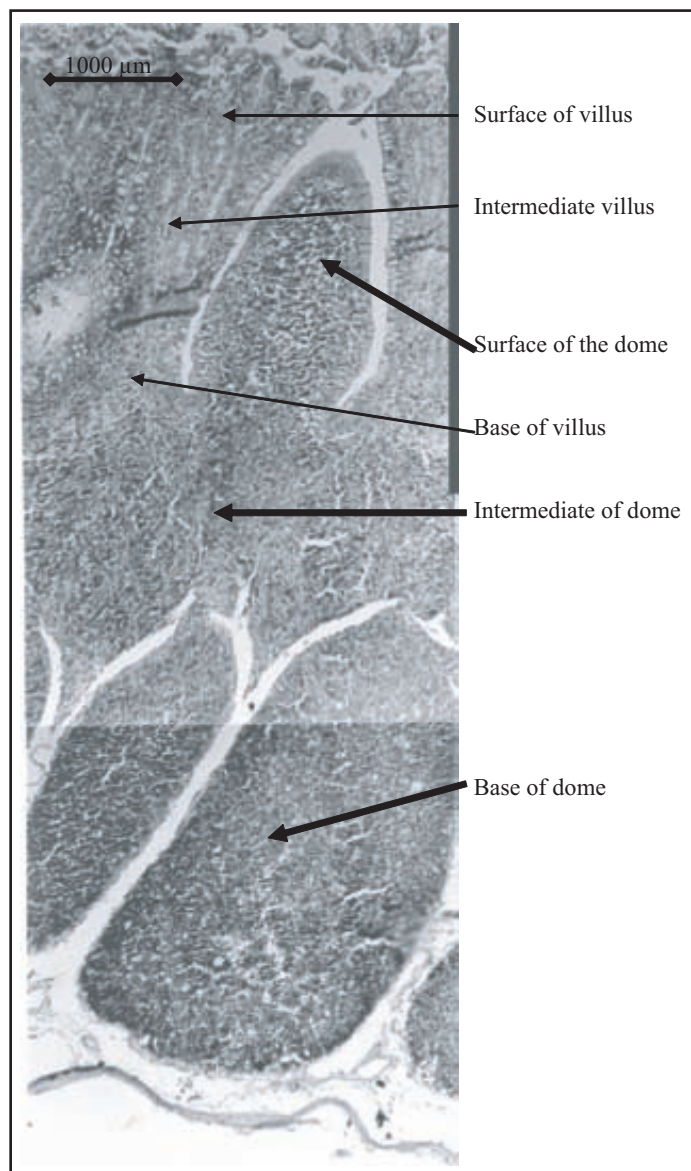


Figura 1: Descripción de las áreas empleadas para la evaluación microscópica.

Figure 1: Description of the areas used for microscopic evaluation.

lization in the growth of the appendix with respect to the rabbit's weight until three years of age.

Before birth, the CA showed a simple cubic epithelium that tends to slightly project towards the lumen (Figure 2a). Five days after birth, long projections by the protruding mucosa were observed, within a shorter projection which is partially covered; likewise, the lamina propria's connective tissue was observed with high cellular density, while the rest of the connective, without mucosa or submucosa distinction, appeared with lax mesenchymal aspect: the smooth muscular cells presented a discontinued pattern and the serosa was thin (Figure 2b).

Between 15 and 30 days of age, the epithelium in the short projections was found smooth, but maintaining the cuboid shape in the long projections. The short projection at this age acquires a pyramidal shape, while the long projections adopt an umbrella shape partially covering the short projections (Figure 2c). At 30 days, the epithelium in the long projections maintains its cuboid shape at the base and low columnar is observed at the point with the appearance of calciform cells, resembling the characteristic image of the intestinal epithelium⁸ (Figure 2d). The shape and distribution that the long and short vilus presented at 30 days of age, were consistent in all the cecal appen-

Resultados

Los resultados demostraron que el AC incrementa su tamaño con la edad, pasando de 0.5 cm a 13.4 cm de longitud en promedio con peso de 3.0 hasta 160 g (Cuadro 1), con crecimiento proporcional del órgano hasta los 300 días y estabilización en el crecimiento del apéndice con respecto al peso del conejo hacia los tres años.

Antes del nacimiento, el AC presentó un epitelio cúbico simple, que tiende a proyectarse levemente hacia la luz (Figura 2a). Cinco días después del nacimiento, se observaron proyecciones largas por elevación de la mucosa, junto a una proyección más corta que está cubierta parcialmente; asimismo, el tejido conectivo de la lámina propia se observó con densidad celular alta, mientras el resto del conectivo, sin distinción de mucosa y submucosa, se presentó con aspecto mesenquimático laxo: las células musculares lisas presentaban aún un patrón discontinuo y la serosa se observó delgada (Figura 2b).

Entre los 15 y 30 días de edad, el epitelio en las proyecciones cortas se encontró aplanado, pero manteniéndose la forma cuboidal en las proyecciones largas. La proyección corta en esta edad adquiere forma piramidal, mientras las proyecciones largas

Cuadro 1
HALLAZGOS DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL DESARROLLO DEL APÉNDICE CECAL EN
CONEJOS DE RAZA NUEVA ZELANDA, BLANCO
FINDINGS OF THE CHARACTERISTICS OF THE CECAL APPENDIX DEVELOPMENT IN NEW
ZEALAND WHITE BREED RABBIT.

<i>Age *</i> <i>(days)</i>	<i>Total weight of</i> <i>the rabbit **</i> <i>(g)</i>	<i>Length of the appendix</i> <i>(cm)</i>	<i>Weight of the</i> <i>appendix</i> <i>(g)</i>	<i>Relation:</i> <i>total weight / appendix weight</i>
- 14	52	0.5	3.0	17.33
- 11	61	0.6	3.6	16.94
5	190	1.2	8.4	22.62
10	350	1.5	10.5	33.33
15	450	3.4	27.2	16.54
30	1 200	5.7	47.0	25.53
60	1 800	6.8	61.4	29.31
90	2 500	7.5	67.5	37.03
120	3 400	9.0	85.0	40.00
300	4 200	10.9	100.0	42.00
1 000	4 700	13.4	160.0	29.34

* The age was taken from the registers or given by the person in charge.

** Average weights of the sampled animals in each age . Gestation average in this breed is 31 days and weaning is performed between 15 and 20 days.

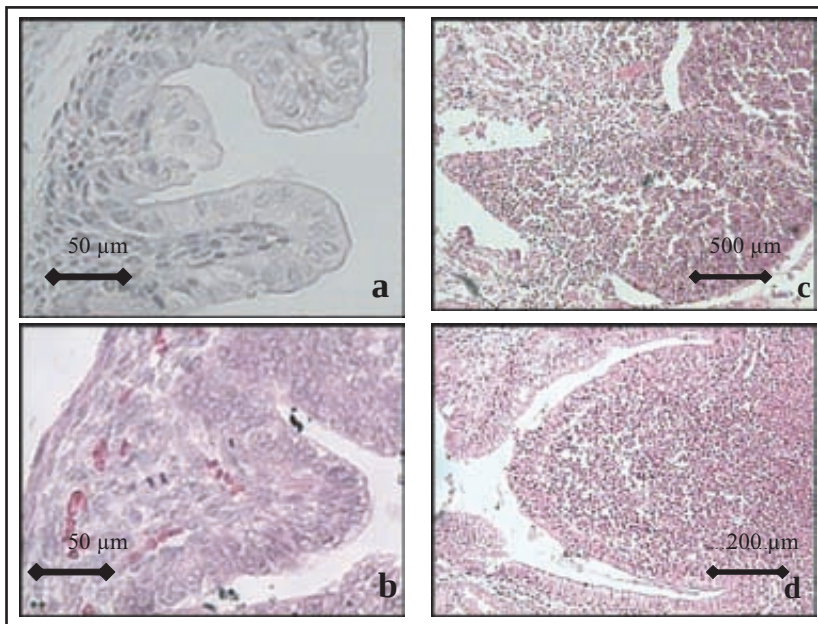


Figura 2: Imágenes histológicas del apéndice cecal del conejo nueva zelanda a diferentes edades. *a)* Al nacimiento (HE, 320x), *b)* 15 días (HE, 320x), *c)* 30 días (HE, 80x) y *d)* 60 días (HE, 80x). La estructura piramidal corresponde al domo, a los lados se aprecian las vellosidades

Figure 2: Histological images of the cecal appendix of New Zealand rabbit at different ages. *a)* At birth (HE, 320x), *b)* 15 days (HE, 320x), *c)* 30 days (HE, 80x) and *d)* 60 days (HE, 80x). Pyramid structure corresponds to the dome, villi are seen on the sides.

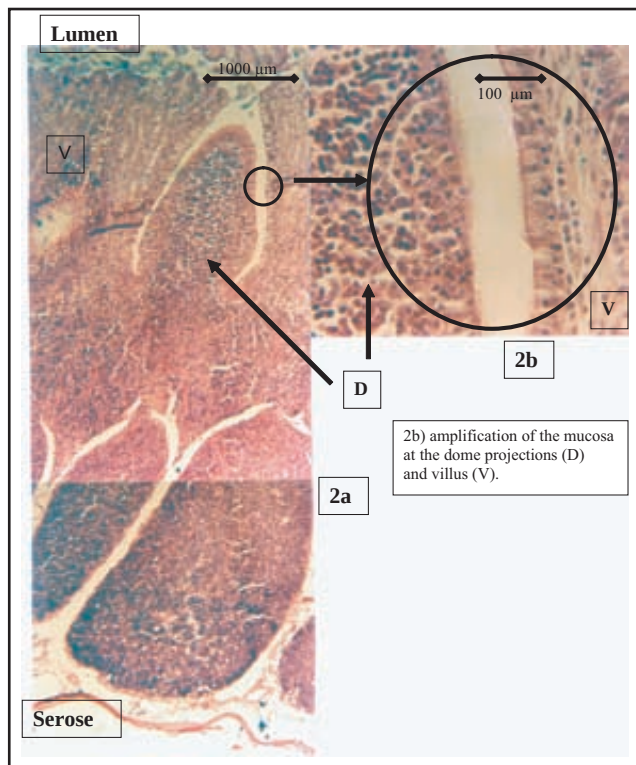


Figura 3: Fotomicrografía del apéndice cecal del conejo a los dos meses de edad. *2a)* Microfotografía de la pared del apéndice cecal, Tinción H.E., 40X. *2b)* Detalle de la estructura, tinción H.E., 400 X

Figure 3: Photomicrography of rabbit cecal appendix at two months of age. *2a)* Microphotography of the wall of the cecal appendix, H.E. stain, 40X. *2b)* Structure's detail, H.E. stain, 400 X.

dix cuts, up to the three years old animals (Figure 3); so that analyzing the longitudinal and transversal cuts done to the CA it was possible to reconstruct the structure of the villi some short, of smooth epithelium, conic shape, that are totally covered by long villi forming “umbrellas” that leave small pores of communication to the lumen with the space that surrounds the conical prolongation in the depth(Figure 4).

During gestation and until 15 days, only one zone of connective tissue is identified between the epithe-

adoptan forma de sombrilla cubriendo parcialmente a las proyecciones cortas (Figura 2c). A los 30 días, el epitelio en las proyecciones largas se mantiene cuboidal en la base y se observa columnar bajo en la punta, con la aparición de células caliciformes, recordando la imagen característica del epitelio intestinal⁸ (Figura 2d). La forma y distribución que presentaron las vellosidades largas y cortas a los 30 días de edad, se mantuvieron en todos los cortes del apéndice cecal realizados, hasta los animales de tres años (Figura 3);

lium and the muscular; nevertheless, at 30 days differentiation starts between the muscular and the mucosa; therefore, it is possible to identify mucosa and submucosa (Figure 2 and 3).

Before birth and in the first ten days after, lymphocyte colonization occurs with some of them dispersed in the connective tissue that is found between the epithelium and the thin muscular. Between ten and 15 days of age they start to attach, in small groups, of six to ten lymphocytes, without evident predilection for a particular zone, and continue to increase forming piles by the 30th day, which coincides with the projection of the mucosa towards the lumen in the villi already described (Figure 2c and d).

These piles of lymphocytes, mainly under the pyramidal projections, continue proliferating until two separate germinal centers are formed, one at submucosa level and the other one in the mucosa, separated by the muscular of the mucosa (Figure 3). In these germinal centers it is notorious the presence of abundant macrophages. Before birth and during the first 15 days of age, the lymphocytes show chromatin nucleus attached in peripheral patterns, apparent nucleus and clear basophile cytoplasm; after 15 days; in the lymphocyte population the ones with dispersed chromatin nucleus predominate, showing nucleolus and accentuated cytoplasmic basophilia, smaller than the ones described before.

By the shape, epithelium and lamina propria, the long projection corresponds to the description of a villus, as referred to during the study. In the other hand, the conic projection, shorter, with different epithelium and lamina propria populated with lymphocytes, corresponds to the structure called "dome", name used in this study.

Of the two types of projections, the dome presented

de manera que analizando los cortes longitudinales y transversales realizados en el AC fue posible reconstruir la estructura de las vellosidades en unas cortas, de epitelio plano, de forma cónica, que son cubiertas totalmente por las vellosidades altas formando "sombrillas" que dejan pequeños poros de comunicación de la luz con el espacio que rodea a la prolongación cónica en la profundidad (Figura 4).

Durante la gestación y hasta los 15 días, sólo se identifica una zona de tejido conectivo entre el epitelio y la muscular; sin embargo, a los 30 días empieza a diferenciarse la muscular de la mucosa, por lo que ya es posible identificar mucosa y submucosa (Figuras 2 y 3).

Antes del nacimiento y en los primeros diez días después de éste, ocurre la colonización de linfocitos con algunos de ellos dispersos en el tejido conjuntivo que se encuentra entre el epitelio y la muscular delgada. Entre los diez y 15 días de edad se empiezan a agregar, en pequeños grupos, de seis a diez linfocitos, sin aparente predilección por alguna zona, y continúan en aumento hasta formar cúmulos a los 30 días, lo cual coincide con la proyección de la mucosa hacia la luz en las vellosidades ya descritas (Figura 2c y d).

Estos cúmulos de linfocitos, principalmente bajo las proyecciones piramidales, continúan poblándose hasta formar dos centros germinativos separados, uno a nivel de la submucosa y el otro en la mucosa, separados por la muscular de la mucosa (Figura 3). En estos centros germinativos es notoria la presencia de abundante cantidad de macrófagos. Antes del nacimiento y durante los primeros 15 días de edad, los linfocitos presentan núcleo de cromatina agregada en patrones periféricos, nucleolo aparente y citoplasma basófilo claro; después de los 15 días; en la población de linfocitos predominan los que se observan con núcleos de

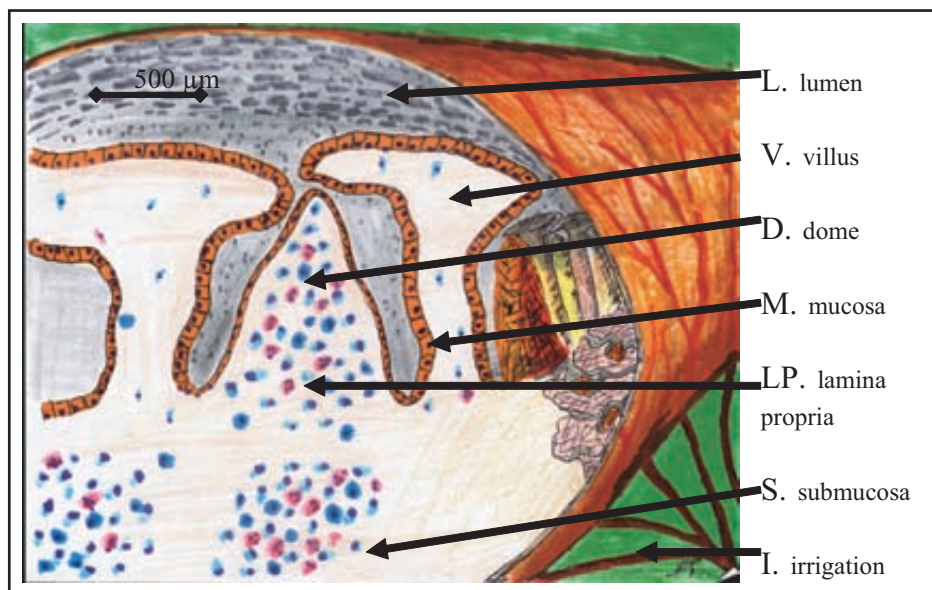


Figura 4: Esquema del aéndice cecal del conejo a los 60 días de edad

Figure 4: Sketch of rabbit cecal appendix at 60 days of age.

in its interior, greater proportion of marked cells with the CD used, than the observed for the long villi ($P < 0.05$) (Tables 2 and 3), without statistically significant differences for the diverse types of cells present in the dome. In this, the CD25 was found in greater proportion in the base ($P < 0.05$) than in the intermediate portion and surface. In the villus there is less average proportion of CD5 and CD4 ($P < 0.05$). On the base the marked cells with CD25 and CD43 predominated over the CD4 and CD5.

Considering the marked cells with CD4, CD25, CD5 or CD43 and the bibliographic reference of the distribution by the cell of these markers in the rabbit, as well as by the results showed on Tables 2 and 3, its inferred that: *a*) the base of the villus is abundant in monocytes/macrophages and there is less proportion of T lymphocytes, with predominance of cells not marked with the CD used.; *b*) the greater part of the cells of the lamina propria in the villus are activated monocytes/macrophages since they were marked predominantly with CD25 and CD43; *c*) in the dome's base activated T and B cells and activated macrophages predominated, since more than half were marked with CD25; *d*) on the intermediate part and in the dome surface CD4/CD5/CD43 cells were evident; which correspond to inactivated T cells and macrophages/monocytes; *e*) the surface of the dome resulted the zone of greater positive reaction to the staining with methylpyronine green.

Discussion

The cecal appendix of the rabbit is an eminent lymphoid organ, histological changes occur there associated with its development, with increase and modification of the lymphocyte population (Figure 2), this suggests that it is a secondary lymphoid organ. Certain authors propose that CA could be an antigen presentation area,⁹ a site of nutriment absorption and substance secretion.^{10,11}

The mucosa presented two types of epithelium, a short cylindrical with presence of calciform cells in the elongated projections, umbrella like villus, and another short cuboid, almost smooth, at the level of the short conic projections or dome (Figure 3b). The villus' epithelium may have digestive functions of absorption and secretion, while the second, with smooth cells, similar to "M" cells, described for Peyer's patches, could be antigen receiver and presenter cells.^{12,13} Similar findings have been described in rabbits by Lelouard *et al.*,¹⁴ in 2001, who named the short projections (conic or pyramidal) "domes" of lymphocytes (or Peyer patches), and long projections "villi", differentiating in regards to their possible functions.

cromatina dispersa, sin nucleolo y basofilia citoplasmática acentuada, más pequeños que los descritos antes.

Por la forma, epitelio y lámina propia, la proyección larga corresponde a la descripción de una vellosidad, que se denominó así durante el trabajo. En cambio, la proyección cónica, más corta, con epitelio diferente y lámina propia poblada de linfocitos, corresponde a la descripción de la estructura llamada "domo", nombre utilizado posteriormente en el trabajo.

De los dos tipos de proyecciones, el domo presentó en su interior, mayor proporción de células marcadas con los CD empleados, que lo observado para las vellosidades largas ($P < 0.05$) (Cuadros 2 y 3), sin diferencias estadísticamente significativas para los diversos tipos de células presentes en el domo. En éste, el CD25 se encontró en mayor proporción en la base ($P < 0.05$) que en la porción intermedia y la superficie. En la vellosidad existe menor proporción promedio de CD5 y CD4 ($P < 0.05$). En la base predominaron más las células marcadas con CD25 y CD43 que las CD4 y CD5.

Considerando las células marcadas con CD4, CD25, CD5 o CD43 y la referencia bibliográfica de la distribución por célula de estos marcadores en el conejo, así como por los resultados mostrados en los cuadros 2 y 3, se infiere que: *a*) la base de la vellosidad es abundante en monocitos/macrófagos y existe menor proporción de linfocitos T, con predominio de células no marcadas con los CD usados; *b*) la mayor parte de las células de la lámina propia en la vellosidad son monocitos/macrófagos activados, ya que se marcaron predominantemente con CD25 y CD43; *c*) en la base del domo predominan las células T y B activadas y macrófagos activados, pues más de la mitad fueron marcadas con CD25; *d*) en la parte intermedia y en la superficie del domo fueron evidentes las células CD4/CD5/CD43, que corresponden a células T inactivas y macrófagos/monocitos; *e*) la superficie del domo resultó la zona de mayor reacción positiva a la tinción de verde metil pironina.

Discusión

El apéndice cecal del conejo es un órgano eminentemente linfoide, ahí ocurren cambios histológicos asociados con su desarrollo, con aumento y modificación de las poblaciones linfocitarias (Figura 2), ello sugiere que es un órgano linfoide secundario. Algunos autores proponen que el AC sería un área de presentación de antígenos,⁹ un sitio de absorción de nutrimentos y de secreción de sustancias.^{10,11}

La mucosa presentó dos tipos de epitelio, uno cilíndrico bajo con presencia de células caliciformes en las proyecciones alargadas, vellosidad a manera de som-

Cuadro 2

DISTRIBUCIÓN DE LOS LINFOCITOS EN LA SUBMUCOSA DEL APÉNDICE CECAL DEL CONEJO
A LOS 60 DÍAS DE EDAD.

DISTRIBUTION OF LYMPHOCYTES IN THE SUBMUCOSA OF RABBIT CECAL APPENDIX
AT 60 DAYS OF AGE.

<i>Marker</i>	<i>Area</i>	<i>Mean (%)</i> <i>(sd)</i>	<i>Average</i> <i>(%)</i>
CD4	Base of the dome	58.5 (8.2)	48.9
T lymphocytes	Intermediate dome	45.2 (11.2)	
Thymocytes	Surface of dome	41.4 (15.1)	
	Base of villus	28.4 (7.5)	
	Intermediate villus	17.8 (6.4)	
	Surface of villus	14.8 (3.2)	
CD5	Base of dome	41.5 (17.4)	42.6
T lymphocytes	Intermediate dome	41.7 (7.6)	
	Surface of dome	42.2 (13.3)	
	Base of villus	25.8 (11.4)	
	Intermediate villus	16.4 (5.4)	
	Surface of villus	13.8 (3.3)	
CD 25	Base of dome	59.4 (6.6)	40.6
T and B active cells	Intermediate dome	28.4 (4.3)	
Activated macrophages	Surface of dome	33.8 (9.1)	
	Base of villus	44.9 (13.3)	
	Intermediate villus	29.9 (9.1)	
	Surface of villus	19.8 (4.0)	
CD43	Base of dome	55.2 (12.0)	48.9
T lymphocytes	Intermediate dome	49.1 (12.1)	
Thymocytes	Surface of dome	44.3 (8.5)	
Monocytes	Base of villus	42.9 (7.8)	
Macrophages	Intermediate villus	17.1 (2.9)	
	Surface of villus	23.4 (7.4)	

The lymphocytes present an organized distribution in two germinal centers separated by the muscular of the mucosa, conformation which is more apparent in the dome; among the lymphocytes great quantities of macrophages are found, conditions in which the smooth cells in the epithelium, suggest an antigen interchange area with the lumen of the organ and presentation of the mucosa and submucosa lymphoid cells,^{12,15} similar distribution to the Peyer's patch.

In spite of the CA weight decrease in proportion of the corporal weight, over the total weight of 6% to 3%, the fact of not reflecting the activity decrement, since the zootechny finality of the used breed is to obtain meat, it is better to evaluate the growth, con-

brillas, y otro cuboidal bajo, casi aplanado, a nivel de las proyecciones cónicas cortas o domo (Figura 3b). El epitelio de la vellosidad puede tener funciones digestivas de absorción y secreción, mientras que el segundo, con células aplanadas, semejantes a las células "M", descritas para las placas de Peyer, podría tratarse de células captadoras y presentadoras de antígeno.^{12,13} Hallazgos semejantes han sido descritos en los conejos por Lelouard *et al.*,¹⁴ en 2001, quienes denominan a las proyecciones cortas (cónicas o piramidales) "domos" de linfocitos (o placas de Peyer), y a las proyecciones largas "vellosidades", haciendo diferenciación en cuanto a sus posibles funciones.

Los linfocitos presentan distribución organizada en dos centros germinativos separados por la muscu-

Cuadro 3

RANGOS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS ENCONTRADOS EN LOS CONEJOS DE RAZA
NUEVA ZELANDA CON LA TINCIÓN DE VERDE RÁPIDO - PIRONINA Y.
RANGES OF PLASMATIC CELLS FOUND IN NEW ZEALAND BREED RABBITS WITH
FAST GREEN-PYRONINE Y STAIN

<i>Structure</i>	<i>Region</i>	<i>Normal range</i>	<i>X*</i>	<i>S*</i>
Nodule	Base	0-4	1.10	1.66
	Intermediate	0-2	1.00	0.67
	Point	0-0	0.00	0.00
Villus	Base	0-0	0.00	0.00
	Intermediate	0-1	0.20	0.18
	Point	0-2	0.60	0.71

* X refers to the mean, S indicates the variance.

Statistic program (windows®) was used to calculate the normal ranges based on a normal distribution.

sidering its histological aspect. Besides, it has been described that CA increases in size by the administration of an easily fermented carbohydrate rich diet, for which it may be short or long, depending on the diet;¹¹ this variable was controlled in this study, for all rabbits were maintained by the same nutritional conditions since weaning. As it is reported,^{8,16} the CA was comparatively larger than the cecum, before and during birth, condition that is inverted in the adult.

By the histological characteristics of the epythelium type in the dome, the increment of lymphocytes of the submucosa and propria lamina during the development, besides previous studies in which high lymphatic vascularity was found,^{10,11,17,18} it is probable that it fulfills a function of a secondary lymphoid organ, being an important zone of antigen capture and presentation.¹⁹ The mucosa modifies from a tall cuboid epithelium in all its extension, to a smooth in the conical projections of the dome, coinciding with the apparition and accumulation of lymphocytes and macrophages in the mucosa, with activated lymphocytes near the surface and abundant T lymphocytes in the lamina propria and submucosa, as indicated for Peyer's patches.

Although it has been proposed that CA behaves like a primary lymphoid organ, attributing development functions of primary antibody receptors,²⁰ in this proposal CA could have an equivalent to the Fabricius bursa.²¹ It is possible that this function is present during birth until 30 days of age, since, in this study, lymphocytes with nuclear immature characteristics from fetus until 15 days of age were observed. The fact could be defined marking lymphocytes from the fetus until 60 days, at the same time using preT, preB and B markers. In approval to this proposal it is believed that the appendectomy during the first days

lar de la mucosa, conformación que es más aparente en el domo; entre los linfocitos se encuentra gran cantidad de macrófagos, situación que junto a la presencia de células planas en el epitelio, sugieren un área de intercambio de antígenos con la luz del órgano y presentación a las células linfoides de la mucosa y submucosa,^{12,15} distribución parecida a la placa de Peyer

A pesar de que el peso del AC disminuye en proporción del peso corporal, pasando de 6% a 3 % del peso total, el hecho de no reflejar la disminución de su actividad, debido a que la raza de conejos trabajada tiene como finalidad zootécnica la obtención de conejos para abasto (engorda), por ello se considera mejor evaluar el desarrollo, considerando su aspecto histológico. Además, se ha descrito que el AC aumenta de tamaño por la administración de una dieta rica en carbohidratos fácilmente fermentables, por lo que puede observarse más corto o más largo, dependiendo de la dieta;¹¹ esta variable estuvo controlada en este trabajo, ya que todos los conejos fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de alimentación desde el destete. Como se refiere en la literatura,^{8,16} el AC se observó más largo comparativamente al ciego, antes y al nacimiento, situación que se invierte en el adulto

Por las características histológicas del tipo de epitelio en el domo, el aumento de linfocitos en la lámina propia y submucosa durante el desarrollo, además de estudios anteriores en los que se encontró alta vascularidad linfática,^{10,11,17,18} es probable que cumpla una función de órgano linfoide secundario, siendo una zona importante de captación y presentación de antígenos.¹⁹ La mucosa se modifica de un epitelio cuboidal alto en toda su extensión, a un epitelio plano en las proyecciones cónicas del domo, coincidiendo con la aparición y acumulación de linfocitos y macrófagos en la mucosa, con linfocitos activados cercanos a

of age dropped the humoral response of the rabbits.³ Likewise in a previous study, in which microbiological mechanisms were used to selectively destroy lymphocytes of spleen and cecal appendix by means of verotoxins, lower humoral and cellular response were observed in treated rabbits.⁵

The greater part of the lymphoid cells of the lamina propria on the villus were activated T lymphocytes, because they were predominantly marked by CD25 and were not marked with methylpyronine green (Table 2), characteristic that was previously described for the surface and intermediate part of the villus.²²

On the base of the dome, activated T and B cells predominate and activated macrophages (greater marking with CD25) (Table 2), but T CD4 cells, were important in the intermediate part and the surface of the dome, this suggests that there is a region of immune response to elements present in the lumen of the appendix; this possible response towards the lumen of the organ is sustained by the observation of greater lymphatic vascularity in the base of the villus and between the nodules.^{4,10} Likewise, the point of the dome contains low cells, without apparent brush rivet, that may correspond to "M" cells or dendritic cells.¹²

Of the two lymphoid areas of the dome, the deepest has relatively few marked lymphocytes with CD used in this study or with the methylgreen. Since at the moment of performing this study, no commercial CD markers were available, it was not possible to evaluate other lymphocytes, for instance preT, preB or lymphoblasts, for it is suggested that by not being active T or B cells, maybe it refers to any of these other lymphocytic mature phase and it is supposed that the activity as lymphocytic capacity organ could reside in this part of the organ.²³ Apparently, this function is maintained until 60 days of age, as the previous studies report.⁵

Likewise, the zone of greater positive reaction to the methylpyronine green was the surface of the dome, that in conjunction with greater proportion of CD4+ cells, suggests that the region could be relevant in the clonal selection and expansion of B cells,^{9,21,24}

The results suggest that CA represents a secondary lymphoid organ at 60 days of age, with capacity of high antigenic interchange and capacity of local response, that could have primary lymphoid organ in the depth of the dome since birth and until 60 days of age, or maybe later.

Acknowledgements

Thanks to PhD Marco Antonio Vega Lopez from the research and Advanced Studios Center, of the National Polytechnique Institute, for the review of the manuscript and comments.

la superficie y abundantes linfocitos T en la lámina propia y submucosa, como lo indicado para las placas de Peyer.

Aunque también se ha propuesto que el AC se comporta como un órgano linfóide primario, atribuyéndole funciones de desarrollo de repertorios de anticuerpos primarios,²⁰ en esta propuesta el AC podría tener algún equivalente a la bolsa de Fabricio.²¹ Es posible que esta función se presente desde el nacimiento hasta los 30 días de edad, puesto que en este trabajo se observaron linfocitos con características de inmadurez nuclear desde el feto y hasta los 15 días de edad. El hecho pudiera ser definido marcando linfocitos desde el feto hasta los 60 días, a la par de usar marcadores para linfocitos preT, preB y B. En apoyo a esta propuesta, se cree que el trabajo de apendicectomía en los primeros días de edad abatió la respuesta humoral de los conejos.³ Asimismo, en un trabajo desarrollado previamente, en el que se usaron mecanismos microbiológicos para destruir selectivamente linfocitos del bazo y del apéndice cecal por medio de verotoxinas, se observó menor respuesta humoral y celular en los conejos tratados.⁵

La mayor parte de las células linfoides de la lámina propia en la vellosidad fueron linfocitos T activados, porque fueron marcados predominantemente por CD25 y no se marcaron con verde metil pironina (Cuadro 2), característica que fue previamente descrita para la superficie y la parte intermedia de la vellosidad.²²

En la base del domo predominan las células T y B activadas y los macrófagos activados (mayor marcaje con CD25) (Cuadro 2), pero las células T CD4, fueron importantes en la parte intermedia y en la superficie del domo, ello sugiere que hay una región de respuesta inmune a elementos presentes en la luz del apéndice; esta posible respuesta hacia la luz del órgano se apoya en la observación de mayor vascularidad linfática en la base de la vellosidad y entre los nódulos.^{4,10} Asimismo, la punta del domo contiene células bajas, sin ribete en cepillo aparente, que pueden corresponder a células "M" o células dendríticas.¹²

De las dos áreas linfoides del domo, la más profunda tiene relativamente pocos linfocitos marcados con los CD empleados en este estudio o con la tinción de verde metil. Debido a que en el momento de realizar este trabajo no se contaba con otros marcadores CD comerciales, no fue posible evaluar otros linfocitos, por ejemplo preT, preB o linfoblastos, por lo que se sugiere que al no tratarse de células T o B activas, quizá se refiere a cualesquiera de estos otros estadios de maduración linfocítica y hace suponer que la actividad como órgano de capacitación linfocítica pudiera residir en esta parte del órgano.²³ Aparentemente, esta función se mantiene hasta los 60 días de edad, como

Referencias

1. Sandford P A. Fisiología del Aparato Digestivo. En: Ardí R N, Hobsley M, Saunders K B, editores. Principios de Fisiología Médica. México (DF): El Manual Moderno, 1985: 155-180.
2. Ham, A.W. Tratado de Histología, 6ª ed, México (DF): Ed Interamericana, 1975.
3. Dasso J F, Mark D H. Neonatal Appendectomy Impairs Mucosal Immunity in Rabbits. *Cell Immunol* 1997;182: 29-37.
4. Valdivia-Anda G, Montaraz Crespo JA, Tortora-Perez J. Lymphotoxic Effect of Verocytotoxinproducing *Escherichia coli* in Rabbit Caecum. 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections; 1997 June 22-26 Baltimore, Maryland, USA. Washington DC: ASM press, 1997:70.
5. Pérez Ortiz M I. Efecto sobre la respuesta inmune provocada por las cepas verocitotóxicas de *Escherichia coli* inoculadas en el apéndice cecal del conejo . (Tesis de licenciatura). México (DF) UNAM, 2002.
6. Estrada F E, Peralta L P Rivas R R. Manual de Técnicas Histológicas. (DF) México. AGT Editor SA ,1982.
7. Luna L G. General References in Histopathologic Techniques. In: Smith B.H. editor. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. Washington, DC: Mc Graw Hill Inc book Co, 1968.
8. Ross M H, Reith E J, Romrell L J. Histología Texto y Atlas Color. 5ª ed. México (DF): Ed. Médica Panamericana, S.A. de C.V.,1992.
9. Pospisil R, Young-Cooper G O, R G Mage RG. Superantigen-like unconventional Ag-Ab interaction: "positive" selection of rabbit appendix B-cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 54: 21-22
10. Monroy C M L. Consideraciones Anatómicas Macro y Microscópicas del Apéndice cecal del conejo (tesis de licenciatura). México (DF): UNAM, 1973
11. Cheeke P R. Alimentación y nutrición del conejo. 2ª ed. Zaragoza España: Ed. Acribia S A, 1987.
12. Shreedhar V K, Brian L K, Marian R N. Cholera Toxin Induce Migration of Dendritic Cells from the Subepithelial Dome Region to T- and B- Cell Areas of Peyer's Patches. *Infect Immun* 2003, 71:1 504-509.
13. Montcourrter P, Hugues L, Maury J, Mangeat P, Reggio H. Apical membranes from M-cells and enterocytes have different carbohydrate expression and are recognized by different monoclonal antibodies in rabbit appendix and Peyer's patches. *Biol Cell* 1996, 88: 1,78.
14. Lelouard H, Reggio H, Roy C, Sahuquet A, Mangeat P, Montcourrier P. Glycocalyx on Rabbit Intestinal M Cells Displays Carbohydrate Epitopes from Muc2. *Infect Immun* 2001; 69: 1061-1071.
15. Tomohiro K, Owen R L. Structure and function of Intestinum a Mucosal Epithelium. In: Ogra P L, Lamm M E, Bienemstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee J R, lo señalan los trabajos realizados previamente.⁵

lo señalan los trabajos realizados previamente.⁵

Asimismo, la zona de mayor reacción positiva a la tinción de verde metil pironina fue la superficie del domo, que, en conjunto con la mayor proporción de células CD4+, sugiere que la región pudiera ser relevante en la selección y expansión clonal de las células B.^{9,21,24}

Los resultados sugieren que el AC representa un órgano linfóide secundario a los 60 días de edad, con capacidad de intercambio antigénico alto y capacidad de respuesta local, que podría tener actividad de órgano linfóide primario en la profundidad del domo desde el nacimiento y hasta los 60 días de edad, o quizá posteriormente.

Agradecimientos

Se agradece al PhD Marco Antonio Vega López, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, del Instituto Politécnico Nacional, la revisión crítica del manuscrito y sus comentarios.

editors. *Mucosal Immunology*. 3rd ed. San Diego: Academic Press, Harcourt Brace & Co, 2000:115-132.

16. Keith L M. Embriología Clínica. 3ª ed. México (DF): Interamericana, 1988.
17. Archer O K, Pierce J C. The developmental biology of the lymphoid tissue in the rabbit. *Lab Invest* 1954; 13: 259.
18. Cripps A W, Gleeson M. Ontogeny of mucosal Immunity and Aging. In: Ogra P L, Lamm M E, Bienemstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee J R, editors. *Mucosal Immunology*. 3rd ed. San Diego: Academic Press, Harcourt Brace & Co, 2000,:253-266.
19. Hughes R A, Widdicombe J. The output of lymphocytes from the lymphatic system of the rabbit. *J Physiol (London)* 1962; 132: 384.
20. Roitt I M, Brostoff J, Male D K. *Immunology*. Philadelphia: JB Lippincott Company,1989: 9.1-11.1
21. Dasso JF, Harold O, Hanh B, Arthur O A, Rose G, Mage A. Morphological and immunohistological study of human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Dev Comp Immunol* 2000; 24: 797-814.
22. Abbas A K, Lichtman H L A, Pober J S. *Inmunología Celular y Molecular*. 2da ed. México (DF): Interamericana,1995.
23. Rajesh K S, Mage R G. Developing neonatal rabbit appendix, a primary lymphoid organ, is seeded by immature blood-borne B cells: evidence for roles for CD62L/PNAd, CCR7/CCL21, $\alpha 4\beta 1$ and LFA-1, *Dev Comp Immunol*, 2004; 28, 7-8, 829-841.
24. Pospisil R, Mage R G. B cell Superantigens May Play a Role in B-Cell Development and Selection in the Young Rabbit Appendix . *Cell Immunol* 1998; 185: 93-100.