

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" Respuesta Inmune de ratones lactantes (Cepa Balb/c AnN) a la
administración por vía oral de inmunoglobulinas heterólogas".

T E S I S

Que para obtener el Título de Biólogo

P r e s e n t a

PATRICIA AMALIA ALCANTARA PEREZ

México, D.F. 1986.

2 ej
3



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
GENERALIDADES	4
ANATOMIA, EMBRIOLOGIA E HISTOLOGIA DEL INTESTINO DELGADO	4
FISIOLOGIA DEL INTESTINO DELGADO	6
INMUNIDAD INTESTINAL	8
MATERIALES Y METODOS	11
RESULTADOS	19
DISCUSION	23
CONCLUSION	26
APENDICE	27
REFERENCIAS	31

RESUMEN

Como parte de un Programa de Investigación sobre Inmunidad Intestinal Pasi va, se estudió la respuesta inmune de ratones lactante a la administración por vía oral de inmunoglobulinas de cerdo, en comparación con un grupo de animales que las recibió por vía subcutánea y un control sin inmunoglobulinas.

Se utilizaron 44 camadas de ratones Balb/c AnN, los cuales recibieron desde el nacimiento diferentes dosis de inmunoglobulinas por vía oral ó subcutánea, cada tercer día hasta un total de 10 dosis. Se estudió la respuesta inmune por medio de la Técnica de Transformación Blastóide y Hema - glutinación Indirecta. No se encontraron linfocitos sensibilizados a las inmunoglobulinas de cerdo en los bazo de los ratones inmunizados. En Hema - maglutinación Indirecta se encontraron anticuerpos específicos en el 13.86% de los animales inmunizados por vía subcutánea y en el 4.91% de los inmuni zados por vía oral. Sin embargo debido a los valores bajos que mostraron, se concluye que no hay diferencias significativas al compararlos con los grupos testigo.

INTRODUCCION

Las infecciones entéricas en México, constituyen un grave problema de salud pública ya que causan un alto número de muertes dentro de la población infantil; principalmente en niños lactantes así como en recién nacidos de otras especies de importancia pecuaria como lo son el ganado porcino, vacuno, caprino y ovino (1, 2 y 3).

La alta incidencia de estas enfermedades en recién nacidos puede relacionarse de manera directa con la contaminación ambiental, la desnutrición y con el período de relativa inmadurez inmunológica por la que atraviezan. Como se sabe, en el recién nacido el sistema inmune aunque completo, no es capaz de resistir un reto con algún antígeno de una manera rápida y eficaz, debido muy probablemente a que en la vida intrauterina, no tenía contacto con ningún tipo de agente extraño (4).

Debido a la gran importancia que estas enfermedades representan para la salud, es de interés conocer la etiología de las mismas así como la inmunología del tracto intestinal. Con respecto a la etiología, se conocen algunas bacterias enteropatógenas (Salmonella, Escherichia coli, Shigela, etcétera), algunos virus (Rotavirus, etcétera) y protozoarios (Entamoeba histolytica, Giardia lamblia) como causantes principales (1, 5, 6 y 7). En cuanto a la inmunología del tracto gastrointestinal, se conoce que en animales adultos, incluso el hombre, existen en el lumen intestinal anticuerpos principalmente de la clase IgA y linfocitos T que se encuentran en el epitelio de la lámina propia, que participan de una manera muy importante en la eliminación de bacterias, virus y otros parásitos.

El recién nacido adquiere anticuerpos de la madre en forma pasiva a partir de la placenta y/o el calostro (3, 4, 8, 9, 10 y 11) Sin embargo, muchas veces se ha visto que estos anticuerpos no son suficientes para eliminar a los agentes infecciosos; por lo que se ha tratado de incrementar la protección mediante el empleo de anticuerpos o suero hiperinmune administrado por vía oral. Sin embargo, en ocasiones, la utilización de anticuerpos y sueros hiperinmunes heterólogos por esta vía de administración puede producir reacciones desfavorables en el individuo, sobre todo si se

ha establecido en ellos una sensibilización previa (12, 13, 14, 15 y 16). De acuerdo con lo anterior, se pretende estudiar la respuesta inmune de ra tones lactantes Balb/c AnN a la administración por vía oral de inmunoglobu linas de cerdo.

GENERALIDADES

Las enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso son frecuentes en los países en vías de desarrollo y atacan principalmente a los grupos humanos más pobres y marginados; siendo la causa principal de esta situación, el deficiente saneamiento ambiental y los malos hábitos de higiene. Desde hace muchos y aún en la actualidad, las enfermedades diarreicas son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Constituyen, por su alta morbilidad y sus características epidemiológicas, un grave problema de salud pública; ya que causan un alto número de muertes dentro de la población infantil principalmente en niños lactantes y recién nacidos de otras especies de importancia pecuaria (1, 2 y 3).

En 1975 hubo aproximadamente 500 millones de casos de diarrea en niños en el mundo, causando la muerte de 5 a 18 millones de ellos. En 1980 se calculó que solamente en Africa, Asia (excluyendo a China) y Latinoamérica, hubo 1, 000 millones de casos de diarrea por año en menores de 5 años de los cuales, 4.6 millones murieron; el 80% de los casos ocurrieron en menores de 2 años (17, 18 y 19).

En México, las enfermedades gastrointestinales son endémicas, aumentan en las épocas calurosas y son más frecuentes dentro de las comunidades con mayores defectos sanitarios. Se calcula que hay más de 500, 000 muertes por año, que representa aproximadamente el 15% de todas las defunciones registradas en el país, afectando principalmente a los niños menores de 1 año y constituyen el 85% en el grupo de 0 a 4 años. Como la frecuencia disminuye a partir de los 3 años de edad, el alto porcentaje de incidencia de éstas en recién nacidos, puede relacionarse de manera directa con el periodo de inmadurez inmunológica que presentan (4, 6 y 7).

ANATOMIA, EMBRIOLOGIA E HISTOLOGIA DEL INTESTINO DELGADO.

El intestino delgado es la región más importante del tubo digestivo, pues ahí tiene lugar la mayor parte de la digestión (gracias a gran cantidad

de glándulas y enzimas) y la absorción.

Se encuentra dividido en 3 secciones : el duodeno que es la porción proximal al estómago, el yeyuno que ocupa la parte media y el ileon que es el segmento final. Está compuesto por 4 capas concéntricas (Figura 1) que de afuera hacia la luz son:

Serosa o adventicia. Está compuesta por varias capas de tejido conectivo laxo, alternada con colágeno y elástico.

Muscular. Está formada por tejido muscular liso dispuesto en dos capas. En la interna se disponen fibras circulares alrededor del tubo y en la externa fibras longitudinales.

Submucosa. Está compuesta por tejido conjuntivo o areolar; por medio de ésta, la mucosa se comunica con las demás capas; en ella se encuentran gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos.

Mucosa. Es la parte más importante para la digestión y absorción. Es una membrana de revestimiento blando que contiene las glándulas que secretan líquidos digestivos. Esta capa posee 3 componentes que son: un epitelio superficial, un estroma constituido por tejido conectivo reticular vascularizado muy celular llamado lámina propia y una capa de músculo liso delgado llamada muscular de la mucosa (30).

El desarrollo del aparato digestivo en el humano se inicia desde el décimo cuarto día de vida embrionaria a partir del ectodermo y mesodermo. El epitelio y mesénquima se alternan formando una estructura tubular, semejante a lo que será el tubo digestivo. Al décimo octavo día, el intestino primitivo se encuentra alineado y con células cuboides no diferenciadas, que proliferan rápidamente y cierran la luz. El primer indicio de formación de vellosidades se presenta alrededor de la semana 7 y las criptas es tan bien desarrolladas a la semana 10, tiempo en el cual se encuentra ya capacitado para transportar activamente aminoácidos a través de un mecanismo selectivo; también se encuentran ya enzimas capaces de funcionar en la digestión.

En la vida extrauterina, la superficie de la luz intestinal está integrada por varias estructuras anatómicas. Primeramente una multitud de pliegues, los cuales están recubiertos de millones de vellosidades de aproxima

damente 1 mm de altura; además cada célula que constituye el epitelio intestinal tiene un borde libre que se conoce como "borde en cepillo", por estar formado por microvellosidades de 1 micrómetro de alto. Todas estas estructuras aumentan hasta 300 veces más la superficie de absorción intestinal. Histológicamente las vellosidades y las criptas constituyen la unidad funcional del intestino delgado. Las vellosidades están formadas por una capa de células epiteliales separadas por una membrana basal de la lámina propia, ésta es el centro vital de la vellosidad; en su interior están los vasos sanguíneos y quilíferos, las fibras musculares y nerviosas, las células cebadas, eosinófilos, linfocitos y las células plasmáticas (Figura 1). Las células que constituyen las vellosidades están bien diferenciadas y son sustituidas en forma rápida cuando son descamadas al llegar al vértice de la vellosidad; su capacidad de absorción disminuye también a medida que dejan de ser jóvenes. Estas células se originan en las criptas, emigran sobre la superficie de la vellosidad y sufren cambios que las capacitan para la absorción. Las criptas son la continuidad de la mucosa por debajo de la base de las vellosidades, y están formadas por diferentes grupos celulares, tales como las células de Paneth, las células argentófilas, las células caliciformes, etcétera. Se considera que las criptas tienen actividad de proliferación epitelial, que se detiene hasta la tercera parte de la altura de la cripta, se diferencia en su camino en células con capacidad de absorción, para llegar a la altura de la vellosidad, donde son descamadas entre 48 y 72 h después y dejan en libertad las enzimas que contienen (21).

FISIOLOGIA DEL INTESTINO DELGADO

El revestimiento mucoso del intestino delgado es uno de los tejidos más notables del organismo. Secreta diversas hormonas que contribuyen a regular la secreción y motilidad gástrica, la secreción del páncreas, la del propio intestino, las contracciones de la vesícula biliar y de las vellosidades intestinales. Durante la digestión, las células de la mucosa realizan

diferentes funciones hidrolíticas y sintéticas sobre las sustancias alimenticias que pasan por ellas y modifican en gran medida el carácter del material absorbido. Aún mientras están produciendo sus propias secreciones, las células epiteliales transfieren agua y sustancias en solución desde la luz del intestino hacia el líquido intersticial para ser captadas por la sangre. Esta actividad es altamente selectiva y requiere de un gasto de energía considerable. Es probable que en ningún otro sitio un tejido realice una variedad tan grande de funciones (22).

Como se conoce, una de las funciones principales del intestino delgado es la absorción. Los productos de la digestión como vitaminas, minerales, proteínas y agua, atraviesan la mucosa del intestino, entran a la circulación por difusión, transporte activo, en situaciones especiales por pinocitosis. Las sustancias no se acumulan en las células de la mucosa intestinal porque difunden hacia la sangre o linfa y son llevadas al hígado y resto del cuerpo (23).

En los recién nacidos la absorción de proteínas, con excepción de los vestigios de pepsina y las lactasas utilizadas para la digestión de la leche, no existen proteasas en la secreción intestinal ni en las células mucosas con acción conocida para atacar a las proteínas naturales, por lo que algunas macromoléculas se absorben por el intestino delgado en un proceso análogo a la fagocitosis, conocido como endocitosis (22). Este tipo de absorción ha podido ser demostrado en neonatos de muchas especies de mamíferos; los cuales pueden absorber grandes cantidades de macromoléculas como gammaglobulinas y otras proteínas del calostro como un fenómeno de inmunidad pasiva adquirida (25). Sin embargo, la facilidad de la mucosa intestinal de absorber proteínas de esta manera desaparece unos pocos días a unas semanas después del nacimiento según la especie. Este mecanismo es útil especialmente en las especies que no reciben inmunidad pasiva de la madre a través de la placenta (4, 22, 31, 32, 33 y 34).

Por otra parte, el tracto gastrointestinal del adulto, es una barrera impermeable e impenetrable a la absorción y transporte de macromoléculas debido a que los procesos digestivos intraluminales actúan eficientemente sobre las sustancias de alto peso molecular y con esto disminuye el contac

to macromolecular con la superficie mucosa. A pesar de ésto, se sabe que el intestino es capaz de absorber por un proceso pinocítico muy similar al que presentan los neonatos, ciertas macromoléculas en cantidades insuficientes para tener importancia nutricional pero en cantidades que pueden ser antigénicas o biológicamente activas (22, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30).

El proceso pinocítico mencionado, se inicia con la interacción entre moléculas grandes dentro del lumen intestinal y componentes de la membrana microvellosa de las células intestinales absorptivas. Cuando se pone en contacto con la membrana celular una concentración suficiente de moléculas se forman invaginaciones que se transforman en pequeñas vesículas. Después, los antígenos migran dentro de estas vesículas conocida como fagosomas a la región supranuclear de la célula donde los fagosomas se unen a lisosomas para formar vesículas más grandes denominadas fagolisosomas. Dentro de estas estructuras se lleva a cabo la digestión intracelular. Sin embargo, cantidades pequeñas de moléculas ingeridas escapan a la degradación y migran hacia la superficie basal de la célula para ser depositadas en el espacio intersticial por un proceso pinocítico en reverso conocido como exocitosis (Figura 2). Por último todo este material tiene que pasar por el hígado donde los macrófagos y las células de Kupffer, retienen todavía más las macromoléculas que logran atravesar la barrera intestinal (12, 25, 26, 29, 30 y 35).

INMUNIDAD INTESTINAL

El tejido linfóide del tracto gastrointestinal del adulto es un componente central del sistema inmune del organismo. Es el sitio principal de exposición a material antigénico extraño. En él se encuentran en gran proporción linfocitos dispersos a todo lo largo de la lámina propia y epitelio, con agregaciones que se forman en las placas de Peyer. Debajo del epitelio se encuentra la lámina propia que contiene una gran cantidad de linfocitos T; ésta cubre un área de tráfico de células tales como macrófagos y linfocitos.

cidos B. La proliferación de los linfocitos T y B se lleva a cabo fuera y dentro de las placas, toman su lugar en la circulación de los nodos linfáticos y el bazo. Cuando se inicia una respuesta inmune en el intestino se presentan cambios importantes en él, dentro de los que se encuentran: una producción luminal de anticuerpos, infiltración celular de la mucosa, desarrollo de células productoras de inmunoglobulinas en la lámina propia y puede interferir con la presencia de patógenos. Algunas veces, de manera patológica, hay anticuerpos circulantes a proteínas alimenticias, reacciones anafilácticas, activación del complemento, etcétera.

Desde 1919 Basračka y Daves mostraron que el intestino era capaz de producir anticuerpos en contra de la disentería bacilar (10 y 14). 40 años después se descubre que en las secreciones externas y en la lámina propia se pueden encontrar IgG, IgM, IgA e IgE; y se reconoce que la IgG e IgM pueden jugar papeles importantes en términos de producción local de anticuerpos. La IgE se sintetiza localmente en particular en la mucosa (10). La IgA es la inmunoglobulina que predomina en el lumen intestinal y por tanto es la que tiene el papel principal en cuanto a la defensa del tracto, ya que actúa en contra de bacterias, virus, autoantígenos, toxinas y una gran variedad de antígenos usados experimentalmente para inmunizar animales. También previene la adherencia bacteriana y la colonización a la mucosa, al inhibir su crecimiento; actúa como anticuerpo bloqueador en términos de reacciones alérgicas, previene la absorción de algunos antígenos ó macromoléculas después de una inmunización oral, etcétera. Por todo lo anterior la IgA controla casi en su totalidad el acceso de antígenos al organismo (10).

Por otra parte, aunque ha sido difícil estudiar la participación de los linfocitos T, existen evidencias directas de su funcionalidad, pues se ha visto que hay producción de linfocinas y en un caso particular, cuando hay alguna infección por Nippostrongylus brasiliensis hay producción principalmente de IgE, lo cual indica que para que haya este tipo de respuesta, fue necesaria una interacción celular entre linfocitos T y B (14).

En los neonatos, la capacidad del tejido linfoide intestinal de producir IgA como respuesta local y la capacidad de los linfocitos T para me -

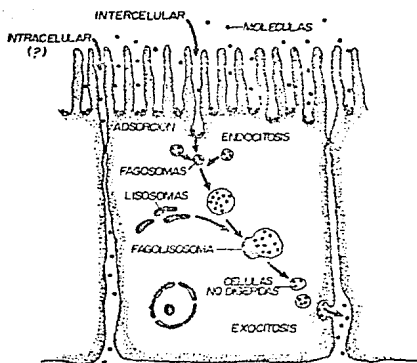


Fig. 2. Mecanismo de absorción y transporte de macromoléculas en el intestino delgado.

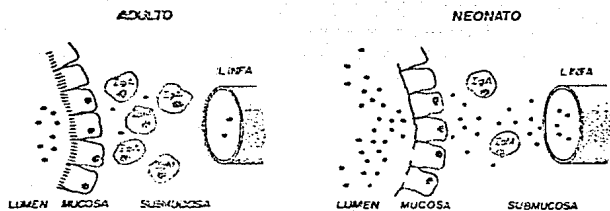


Fig. 3. Transporte de antígenos de la mucosa intestinal hacia la circulación sistémica en adultos y neonatos.

diar cualquier respuesta, se encuentra disminuida, de tal manera que son mucho más propensos a contraer enfermedades de origen infeccioso. Sin embargo, los recién nacidos reciben de la madre a partir de la placenta IgG y/o IgA, IgG, IgM y células mononucleares a través del calostro, que contribuyen a la defensa del tracto gastrointestinal en contra de tales infecciones. Por otra parte, aún cuando esto es de mucha ayuda para el neonato, muchas veces estos anticuerpos no son suficientes para eliminar a los agentes infecciosos (4).

Por esta razón muchos investigadores se han interesado en tratar de aumentar la inmunidad pasiva para lograr una mejor protección, mediante la utilización de sueros hiperinmunes ó anticuerpos específicos. Sin embargo, con el uso extenso de antisueros heterólogos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, pronto se encontró que la respuesta inmune algunas veces era una desventaja para el individuo. Por lo general, el suero dado para proporcionar inmunidad pasivamente, es de caballo, el cual a su vez actúa como antígeno e induce la formación de anticuerpos en el sujeto. La combinación de estos anticuerpos con el suero heterólogo en inyecciones subsiguientes causa hipersensibilidad tipo III ó IV en el individuo (11, 12 y 36).

Asimismo, cuando se inmunizan neonatos con anticuerpos heterólogos por vía oral, debido a la alta permeabilidad de la mucosa y a la escasez de IgA, un gran número de macromoléculas entran a la sangre (Figura 3), y aunque generalmente no hay una respuesta en contra de ellas, a veces provocan la formación de anticuerpos. La reacción antígeno-anticuerpo que ocurre con la subsiguiente entrada de más cantidad de la misma proteína puede causar reacciones alérgicas (12 y 33).

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se pretende estudiar la respuesta inmune de ratones lactantes de la cepa Balb/c AnN cuando se les administra por vía oral inmunoglobulinas de cerdo. Para hacer evidente la respuesta inmune y dar apoyo al trabajo, se administró a un grupo de ratones inmunoglobulinas de cerdo por vía subcutánea.

MATERIALES Y METODOS

Se realizaron ensayos preliminares con ratones adultos y lactantes de la cepa CD1 para conocer si las inmunoglobulinas de cerdo son inmunogénicas.

Ratones Adultos.

Se utilizaron 30 ratones adultos que fueron inmunizados 10 veces con 20 μ g de inmunoglobulinas de cerdo cada tercer día por 3 vías diferentes: 10 se inmunizaron por vía subcutánea, 10 por vía intraperitoneal y 10 por vía intramuscular, en este caso los 2 primeros estímulos se administraron con Adyuvante Completo de Freund (ACF) por vía subcutánea. Una semana después del quinto estímulo, se sangraron por el ojo con la finalidad de buscar en su suero anticuerpos circulantes anti-cerdo por medio de la técnica de Double Immunodifusión (DID). También 8 días después de la décima estimulación se sangraron nuevamente para realizar la DID; y a la vez se realizaron pruebas de hipersensibilidad cutánea para estudiar su respuesta. Cada ratón recibió 4 inyecciones: 2 inyecciones con 5 μ g de inmunoglobulinas de cerdo; una en la porción izquierda del abdomen y la otra en el cojinete plantar inferior izquierdo. Las 2 inyecciones restantes con 20 μ l de PBS estéril en la porción derecha del abdomen y en el cojinete plantar inferior derecho. Los resultados de la prueba se leyeron después de 48 a 72 h y constituyen los antecedentes básicos del resto del trabajo.

El 100% de los ratones inmunizados por vía intramuscular, el 100% de los inmunizados por vía intraperitoneal y el 57.14% de los inmunizados por vía subcutánea respondieron con la producción de anticuerpos circulantes anti-cerdo determinado por la prueba de DID (Figura 4). De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos afirmar que las inmunoglobulinas de cerdo son inmunogénicas ya que provocan una respuesta inmune en los ratones adultos de la cepa CD1.



Fig. 4. Doble Inmunodifusión. En las DID superiores realizadas con sueros de ratones neonatos puede observarse que no respondieron a las inmunoglobulinas de cerdo. En las DID inferiores realizadas con sueros de ratones adultos puede observarse que sí respondieron a las inmunoglobulinas de cerdo. En el pozo central se colocaron los anticuerpos de cerdo, en el pozo No. 1 se colocó un suero de conejo anti-cerdo y en los pozos restantes los sueros de los ratones.

Por otra parte, el 30% de los ratones inmunizados por vía intramuscular, el 71.42% de los inmunizados por vía intraperitoneal y el 14.28% de los inmunizados por vía subcutánea presentaron en la porción izquierda del abdomen un granuloma. Cabe hacer notar que la hipersensibilidad en el cojín plantar no fue evidente ya que no se encontraron diferencias significativas.

Con base a estos resultados se procedió a trabajar con ratones lactantes de la misma cepa para averiguar si respondían también a las inmunoglobulinas de cerdo.

Ratones Lactantes.

Se emplearon 32 camadas de ratones las cuales se inmunizaron 10 veces cada tercer día desde el nacimiento con concentraciones de 0, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 127, 254, 375, 750, 1 125, 1 500, 2 250 y 3 000 μ g de inmunoglobulinas de cerdo por ratón por vía subcutánea en la parte dorsal de las patas posteriores. 5 días después de la última inmunización, se realizó la prueba de hipersensibilidad cutánea en abdomen con 0.2 μ g de inmunoglobulinas de cerdo en la porción izquierda y 15 μ l de PBS en la porción derecha. Las lecturas se hicieron después de 48 a 72 h; tiempo en el cual, se sanaron por la axila a blanco para buscar anticuerpos anti-cerdo circulantes por medio de DID.

Los ratones lactantes de esta cepa, no respondieron a las gamaglobulinas de cerdo, ya que todos los sueros fueron negativos y en ninguno se presentó granuloma (Figura 4).

Con el objeto de evaluar la respuesta inmune de una manera más cuantitativa, se emplearon las Técnicas de Hemaglutinación Indirecta y la de Transformación Blastoide. Como la Transformación Blastoide podía implicar el cultivo de linfocitos de 1 ó más individuos, se realizó el trabajo con la cepa de ratones Balb/c AnN, la cual dada su singenicidad permite el cultivar mezclas de linfocitos de varios individuos sin el problema de estimulación alogénica.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 44 camadas de ratones recién nacidos de la cepa Balb/c AnN; a 22 camadas se les administró cada tercer día por 10 veces, desde el nacimiento, diferentes dosis de inmunoglobulinas de cerdo por vía oral; las 22 camadas restantes tuvieron el mismo tratamiento sólo que por vía subcutánea. En ambos grupos hubo 5 camadas controles que recibieron PBS (Cuadro 1). Una semana después de la última administración, todos los ratones se sacrificaron, previa anestesia con éter, se sangraron a blanco por la axila para la utilización del suero y se obtuvo el bazo de cada uno de ellos para la realización de cultivos celulares.

La evaluación de la respuesta inmune de los ratones recién nacidos a la administración de inmunoglobulinas de cerdo, se realizó buscando células linfocitos sensibilizadas y anticuerpos circulantes empleando la Técnica de Transformación Elastoide y Hemaglutinación Indirecta respectivamente.

Obtención de Inmunoglobulinas.

Se utilizaron 3 cerdos híbridos Hampshire-Duroc de la Granja Experimental Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para la obtención de suero. Estos animales se sacrificaron en el rastro y la sangre fue recolectada; se dejó coagular a temperatura ambiente por 1 h, se renovó el coágulo y se dejó durante 24 h a 4°C para tener la máxima retracción del mismo. Después se decantó el suero y se centrifugó a 345 g durante 15' a 4°C.

Las inmunoglobulinas se obtuvieron del suero por precipitación con una solución saturada de sulfato de amonio a pH 8 (37) que en volumen representa la mitad del volumen del suero. El sulfato de amonio se agregó por goteo lento agitiéndose lentamente a 4°C, se alcanzó de esta manera una concentración final de 18%. Al término del goteo, la mezcla se dejó en agitación por espacio de 30', se centrifugó a 15 300 g durante 30', se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió lentamente, para no ha-

CUADRO 1

vía	I.1	0	1.5	7.5	15	75	150	300	600	1 200	2 400	4 500
I.C.A.	0											
	Ig bovina											
	Ig cerdo											
	Con. A											
S.C.	0											
	Ig bovina											
	Ig cerdo											
	Con. A											

I.1 concentración de inmunoglobulinas de cerdo/ratón.
 Ig inmunoglobulinas.
 S.C. subcutáneas.

cer espuma, en una solución de NaCl 0.15 M. Esta operación se realizó las veces necesarias hasta que se eliminó la hemoglobina. Por último, se dializó contra PBS (solución salina isotónica amortiguada con fosfatos 0.01 M a pH 7.4) para eliminar el sulfato de amonio con agitación continua durante una semana, haciendo cambios de PBS diariamente.

La cuantificación de inmunoglobulinas se hizo por medio de la técnica de Lowry (38). Esta técnica se basa en una reacción colorimétrica que depende del contenido de tirosina y triptofano en la proteína. Por último, las inmunoglobulinas de cerdo se esterilizaron por filtración con un filtro MILLIPORE con membrana de 0.22 μ m, se repartieron en muestras de 1 ml y se prepararon las diferentes diluciones a utilizar en PBS estéril, se conservaron congeladas a - 20°C hasta el momento de su uso.

Inmunización de ratones.

A partir del nacimiento y cada tercer día hasta completar 10 dosis, se inmunizaron 44 camadas de ratones Balb/c AnN con concentraciones de 1.5, 7.5, 15, 75, 150, 300, 600, 1 200, 2 400 y 4 500 μ g de inmunoglobulinas de cerdo; 22 camadas se inmunizaron por vía oral y 22 por vía subcutánea. Ambos grupos tuvieron 5 camadas controles, a las que se les administró PBS.

La administración por vía oral se hizo mediante la introducción, hasta el estómago, de un catéter de plástico de 1 mm de diámetro por 20 cm de longitud recubierto de vaselina y conectado a una jeringa desechable de 1 ml. El catéter se mantuvo en basal y al momento de usarse, se lavó varias veces con PBS estéril. El volumen de inmunoglobulinas administrado fue de 50 μ l por ratón. A los animales controles se les dió el mismo volumen pero de PBS estéril.

La inmunización de los ratones por vía subcutánea se realizó por medio de una microjeringa metálica HAMILTON; el émbolo y la aguja se mantuvieron y lavaron de la misma forma que el catéter. La inoculación se hizo en el dorso, arriba de las patas posteriores de cada ratón. El volumen administrado de inmunoglobulinas de cerdo en este grupo y el de PBS para los

animales controles, fue de 15 μ l por ratón.

Cinética, Dosis-respuesta de Concanavalina A (Con A C-2010 SIGMA).

Esta cinética se realizó para conocer la concentración óptima de Con A que produjera una respuesta máxima de los linfocitos de los bazo de 3 ratones Balb/c AnN de tres semanas de edad (1×10^5 células en 100 μ l de medio RPMI 1640 Gibco) con concentraciones de 0.25, 1, 2, 5, 10, 15, 25 y 50 μ g /ml; estas diluciones se hicieron a partir de una solución de Con A de 1 mg/ml en medio RPMI. Las células se mantuvieron en cultivo en una microplaca de 96 pozos de fondo plano (Costar No. 3590) durante 72 h a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los linfocitos se marcaron con 10 μ l de Timidina ³H con una actividad específica (AE) de 6.7 Ci/nmol (NET - 027X New England Nuclear) diluida 1:10 en medio RPMI 1640 Gibco sin suero bovino fetal (SBF), 18 a 24 h antes de ser cosechados. Las células con ADN marcado al cosechar, se recuperaron en tiras de papel de fibra de vidrio (Whatman No. 1827-808, 2 X 12 cm) usando un cosechador Brandel Modelo 24V. Las tiras de papel se dejaron secar y los fragmentos que contenían cada muestra se colocaron en frascos con 5 ml de líquido de centelleo. La respuesta de los linfocitos hacia las diferentes concentraciones de Con A se midieron por medio de cuentas por minuto (cpm) emitidas, en un contador de centelleo para líquidos TRI-CARB Packard 300.

Obtención de células linfoides de bazo.

Se obtuvieron de manera estéril los bazo de los ratones de una camada, se colocaron en una caja petri que contenía 10 ml de solución salina balanceada de Hank (SSB de Hank) pH 7.3 estéril y se homogeneizaron con unas pinzas. El sobrenadante se colocó en un tubo de centrifuga de 50 ml estéril (Costar No. 3250) se dejó de 10 a 15' en hielo para permitir que las partículas más grandes se sedimentaran. El contenido del tubo se decantó a un

segundo tubo y se centrifugó a 24 g por espacio de 10' a temperatura ambiente. Posteriormente el sobrenadante se eliminó y el botón celular se resuspendió en el mismo volumen de SSB de Hank; esta operación de lavado se hizo 2 ó 3 veces para eliminar la hemoglobina presente en el sobrenadante. En seguida del último lavado, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 Gibco suplementado con 10% de SBF inactivado; se tomaron 10 μ l de células haciendo una dilución 1:20 con una solución de azul tripano al 0.4% en una solución de NaCl 0.15 M, para conocer el número de células, la viabilidad de las mismas y poder ajustar su número a 1×10^6 /ml. Las muestras en las que se observó más del 20% de células muertas no se utilizaron.

Transformación Blastoide.

Esta técnica se basa en una reacción entre el antígeno y las células linfoides específicamente sensibilizadas a él. Mide la capacidad funcional de los linfocitos para proliferar después de la provocación antigénica específica o ante la estimulación con mitógenos inespecíficos, mide la síntesis de ADN mediante la incorporación de Timidina ^3H en cuentas de pulso (cpm) en un contador de centelleo para líquidos (39).

En la práctica, se obtuvieron las células linfoides de los bazo de los ratones de cada camada, con los cuales se hicieron microcultivos por sextuplicado en placas de 96 pozos de fondo plano estériles (Costar No. 3590). Se colocaron en cada pozo 1×10^5 células/ μ l y se formaron 4 grupos de trabajo, tal como lo indica el Cuadro 2. A cada grupo se le agregó con medio RPMI 1640 Gibco suplementado con 10% de SBF.

- A. Grupo control, con 100 μ l de medio RPMI.
- B. Grupo control negativo, con 100 μ l de gamaglobulinas de bovino [1 mg/ml].
- C. Grupo control positivo, con 100 μ l de Con A [5 μ g/ml].
- D. Grupo experimental, con 100 μ l de gamaglobulinas de cerdo [1 mg/ml].

Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 en el

CUADRO 2

	1	2	3	4	5	6
A	100 μ l de 1×10^5 células + 100 μ l de medio RPMI complementado.					
B	"	"	"	+ 100 μ l de gammaglobulinas de bovino [1 mg/ml].		
C	"	"	"	+ 100 μ l de gammaglobulinas de cerdo [1 mg/ml].		
D	"	"	"	+ 100 μ l de Concanavalina A [5 μ g/ml].		

rante 72 h, tiempo en el cual ocurre una estimulación adecuada de los linfocitos por el antígeno ó el mitógeno. Después de 48 h de incubación, los cultivos se marcaron con 10 μ l de Timidina 3 H con AE de 6.7 Ci/mmol (NET-027X New England Nuclear) diluida 1:10 en medio RPMI 1640 Gibco sin suplementar con SBF y después de 18 a 24 h se cosecharon las células en un cosechador Brandel Modelo 24W, con el ADN que ha incorporado Timidina 3 H en tiras de papel de fibra de vidrio (Whatman No. 1827-808, 2 X 12 cm). Las tiras de papel se dejaron secar y los fragmentos que contenían las muestras se colocaron por separado en frascos que contenían 5 ml de líquido de centelleo. Por último, la cantidad de Timidina 3 H incorporada por cada muestra se determinó por medio de cpm por espacio de 1 min. en un contador de centelleo para líquidos TRI-CARE Packard 300.

Obtención y sensibilización de eritrocitos.

Se sangró un borrego de la vena yugular, se obtuvo en forma estéril sangre que se diluyó 1:2 con solución Rissever's (40 y 41), se dejaron a 4°C por espacio de 4 días para permitir la lisis de los eritrocitos viejos. Posteriormente los eritrocitos se lavaron con PBS pH 7.2 frío, se centrifugaron a 850 g durante 10' a 5°C. Esta operación de lavado se realizó las veces necesarias hasta que en el sobrenadante no hubiera hemoglobina. Después de la última centrifugación, 20 ml de eritrocitos se resuspendieron en 50 ml de gamaglobulinas de cerdo [10 mg/ml]; esta solución se mezcló a su vez con 5 ml de glutaraldehído al 2.5% en NaCl 0.15 M, se agitó lentamente a temperatura ambiente. Los eritrocitos sensibilizados se dejaron 1 h a 4°C, se lavaron 3 veces para eliminar el exceso de glutaraldehído y gamaglobulinas de cerdo y por último se resuspendieron al 2.5% con PBS pH 7.2 para su utilización.

Hemaglutinación Indirecta en microplaca.

Esta técnica de aglutinación, se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, en donde se ha fijado por medios químicos, un antígeno a eritrocitos para la detección de anticuerpos específicos (39).

En una placa de microtitulación (Figura 5), se colocó en cada pozo de la primera hilera vertical 25 μ l del suero de cada ratón, se hicieron horizontalmente a partir de esta, diluciones seriadas con PBS hasta una con valor de 1:4096. Se colocó un control negativo formado por 25 μ l de PBS pH 7.2 y un control positivo formado por 25 μ l de suero de conejo anti-cerdo. Después en cada pozo se colocaron 25 μ l de eritrocitos sensibilizados. Las placas se incubaron durante 12 h a 4°C y por último se hicieron las lecturas correspondientes.

RESULTADOS

Cinética Dosis-respuesta de Concanavalina A.

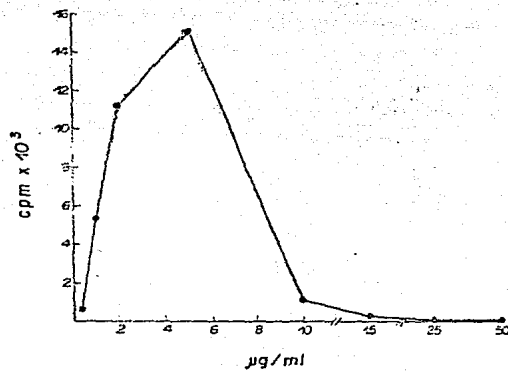
Como se muestra en la Gráfica 1 y Cuadro 3, la respuesta máxima de los linfocitos de bazo en cultivo se obtuvo cuando se utilizó 5 µg/ml de Con A. A concentraciones extremas, la respuesta fue menor. Esta dosis óptima para estimular a los linfocitos se utilizó para los ensayos de Transformación Blastóide.

Transformación Blastóide.

Las cuentas por minuto (cpm) obtenidas del ADN-H³ de los linfocitos de bazo de los grupos de ratones inmunizados, 10⁵ células en 100 µl + 100 µl de medio RPMI completo, Gamaglobulinas de bovino, Gamaglobulinas de cerdo y Concanavalina A pueden observarse en las Gráficas 2, 3 y 4; y en los Cuadros 4, 5, 6 y 7 respectivamente. Se encontró heterogeneidad de las cifras entre las camadas inmunizadas por ambas vías con la misma concentración y entre las camadas tratadas con diferentes concentraciones de inmunoglobulinas de cerdo. Lo más evidente de todo, es que las cpm obtenidas cuando los linfocitos se encontraban en presencia de Con A fueron mucho más altas que las registradas para los otros grupos celulares empleados. En los grupos cultivados en presencia de RPMI, Gamaglobulinas de bovino y Gamaglobulinas de cerdo no puede observarse claramente una diferencia definida debido, como se mencionó anteriormente, a la heterogeneidad de las cpm.

En la Gráfica 5 y Cuadro 8, se muestran los Índices de Transformación (IT*) de los linfocitos en cultivo de cada grupo celular. En ellos se

$$* IT = \frac{\bar{X} \text{ de cpm del ADN-H}^3 \text{ de los linfocitos de un grupo celular}}{\bar{X} \text{ de cpm del ADN-H}^3 \text{ de los linfocitos + medio RPMI}}$$



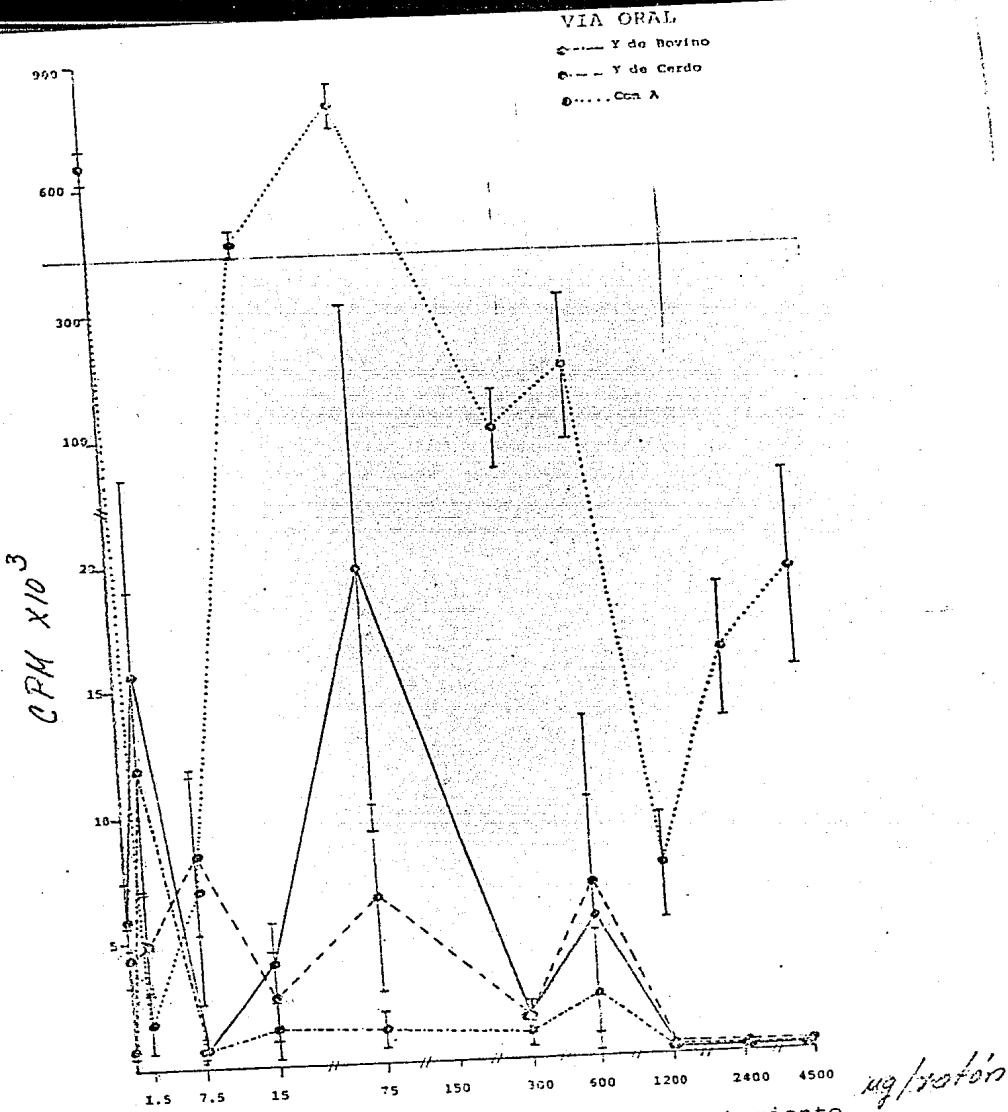
Gráfica 1. Curva Dosis-respuesta de Con A para la estimulación de 1×10^5 linfocitos/ 100 μ l.

CUADRO 3. Cinética Dosis-Respuesta de Con A.

ensayo* \ []	0.25	1	2	5	10	15	25	50
1	1 717	45 855	92 770	249 555	2 196	5 052	1 305	376
2	10 612	59 939	123 357	120 864	2 338	3 306	884	4 012
3	8 646	64 881	122 770	150 804	27 441	2 116	4 679	2 712
4	5 651	47 835	111 635	84 550	13 170	2 057	583	2 060
\bar{X}	6 656	54 627	112 633	151 443	11 286	3 132	1 862	2 290

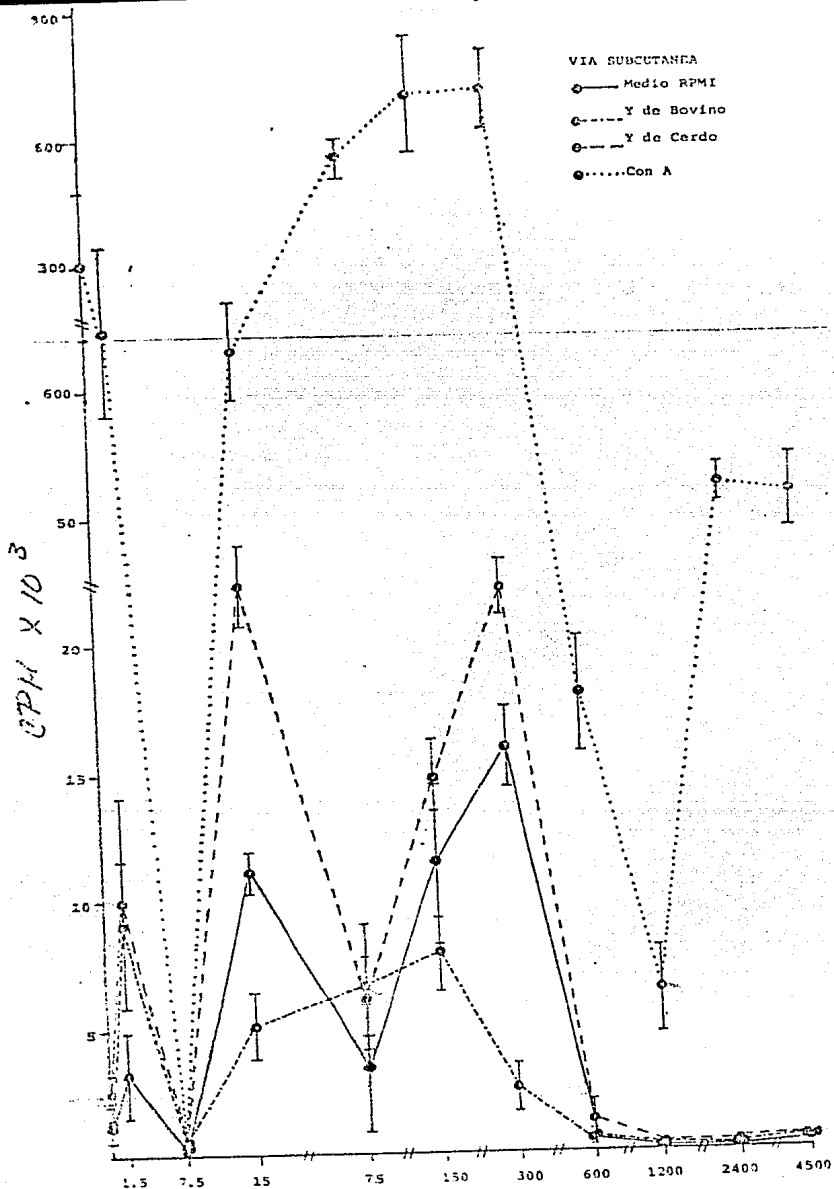
[] $\mu\text{g/ml}$ de Concanavalina A.

* cuentas por minuto (cpm) registradas/ensayo.

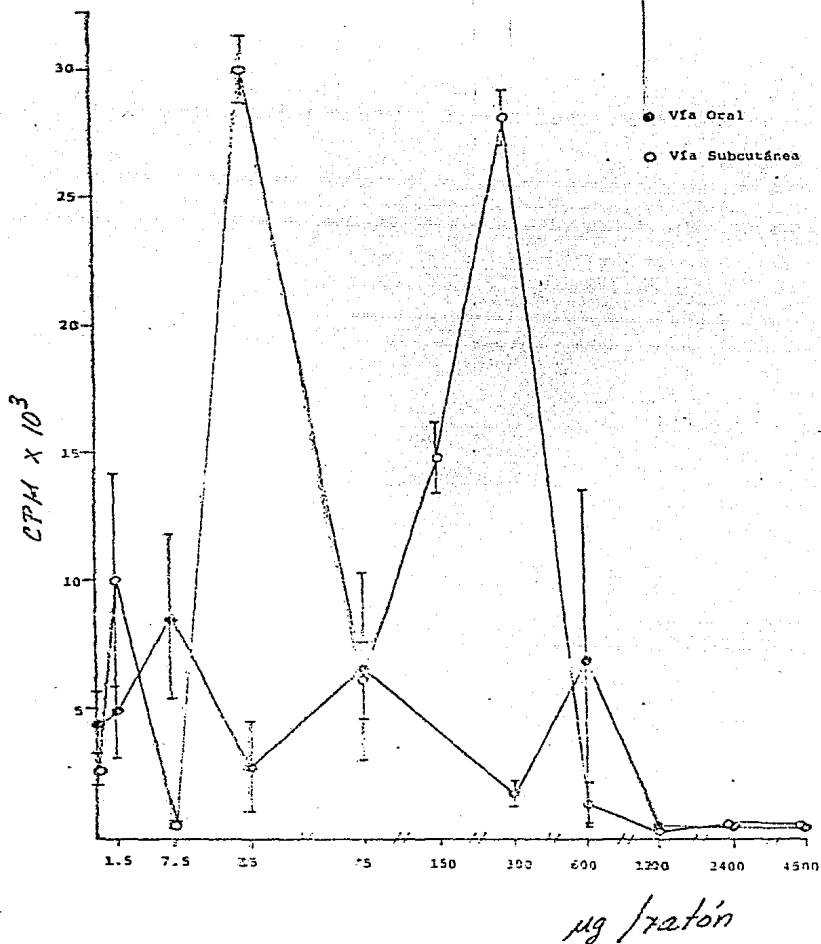


Gráfica 2. Transformación Blastocida. Comportamiento de los linfocitos de bazo de los ratones inmunizados por vía oral, cultivados en presencia de RPMI, Y de Bovino, Y de Cerdo y Con A.

ug/raton



Gráfica 3. Transformación Blastoides. Comportamiento de los linfocitos del bazo de los ratones inmunizados en presencia de RPMI, Y de Bovino, Y de Cerdo y Con A.



Gráfica 4. Transformación Blastocida. Comportamiento de los linfocitos de bazo de los ratones inmunizados por ambas vías, cuando se cultivaron en presencia de Inmunoglobulinas de gusano.

Fig. 4. Cuentas por minuto (cpm) obtenidas del ADN-³H de los linfocitos de bazo + Medio RPMI completo.

vía []	0	1.5	7.5	15	75	150	300	600	1 200	2 400	4 500
Oral	2 655	41 002	104	1 934	4 642	*	2 926	667	53	99	181
	3 318	18 401	66	3 868	5 209		1 675	2 231	89	119	125
	3 518	20 910	105	10 407	6 638		1 296	1 267	73	119	240
	3 363	34 021	61	2 118	30 661		953	19 032	193	85	439
	4 842	25 156	553	4 903	62 006		1 238	4 583	61	85	217
	4 960	38 737	99	2 019	9 878		1 751	1 374	137	89	96
	7 399	8 642	1 336	2 519	*		711	31 633	473	109	357
	7 252	287	1 893	2 498			877	1 729	193	112	269
	7 760	123	547	2 845			558	1 932	214	253	285
	8 425	130	893	2 826			1 747	896	234	128	134
	8 555	166	681	10 551			3 895	1 465	211	80	468
	10 680	863	1 154	1 822			2 931	1 540	298	98	174
	X 6 060	15 703	624	4 025	19 839		1 713	5 695	185	114	248
	S 2 496	15 449	572	3 005	20 871		988	9 199	114	44	115
	S.C.	192	4 057	454	13 674	1 861	10 903	16 315	320	61	266
243		1 657	221	11 438	4 066	14 027	13 668	804	79	265	497
121		1 576	154	11 916	2 170	11 753	17 562	289	54	239	376
299		1 883	558	9 649	1 478	11 716	14 554	562	78	199	272
242		2 186	345	10 518	2 771	15 432	13 357	241	56	259	286
450		1 935	237	10 011	2 597	29 344	16 071	2 154	60	211	370
2 027		4 177	48	*	3 722	5 571	12 387	380	79	298	858
1 781		9 442	47		19 315	7 405	21 698	187	70	352	328
2 041		2 163	54		1 489	7 657	20 768	320	67	298	332
3 067		1 945	64		1 764	5 948	15 286	256	72	645	320
2 247		1 105	50		354	10 671	15 107	320	71	379	858
3 203		10 595	52		943	7 133	16 096	1 373	76	363	286
X 1 326		3 560	190	11 201	3 594	11 463	16 072	600	68	314	477
1 137		3 030	170	1 352	4 833	6 177	2 685	506	3	113	245

[] = µg de inmunoglobulinas de cerdo/ratón.

S.C. = subcutánea.

* = cultivos celulares contaminados.

CUADRO 4. Cuentas por minuto (cpm) obtenidas del ADN-II³ de los linfocitos de bazo + Gamaglobulinas de bovino.

vía \ []	0	1.5	7.5	15	75	150	300	600	1 200	2 400	4 500'	
Oral	770	494	145	1 961	2 620	*	562	1 906	60	92	96	
	525	336	1 645	388	1 031		2 242	476	116	83	286	
	1 544	34 052	53	509	3 246		2 137	1 077	107	76	367	
	1 433	27 030	86	7 255	410		2 329	755	309	96	387	
	389	29 829	188	177	251		978	607	167	117	144	
	695	33 923	88	157	267		1 188	317	106	115	252	
	822	6 326	312	157	*		328	1 286	324	101	128	
	2 501	4 931	53	4 649			390	1 479	213	116	1 343	
	766	1 706	1 397	1 298			90	1 188	229	167	518	
	920	1 882	917	606			907	18 070	177	252	587	
	111	2 309	2 455	874			164	1 080	193	158	231	
	71	1 609	623	361			469	1 147	204	369	595	
	X 878	12 035	680	1 532	1 304		982	2 532	183	145	411	
	S 648	13 758	754	2 108	1 194		788	4 712	76	81	325	
	S.C.	356	5 193	640	5 121	8 454	5 185	2 625	65	48	178	493
		304	8 397	339	2 076	7 246	5 661	1 959	980	56	159	292
		201	6 731	242	9 412	16 959	12 700	1 691	220	58	127	389
217		12 625	275	4 116	11 593	8 975	3 562	1 199	84	129	550	
193		6 487	264	4 029	3 222	9 815	1 265	538	93	95	377	
276		10 496	284	6 554	1 782	4 831	2 517	118	54	103	1 223	
1 072		4 670	891	*	7 215	7 419	1 752	86	96	114	320	
329		4 162	406		10 345	11 004	2 171	796	139	121	383	
364		4 055	301		4 457	11 021	7 409	1 227	215	110	425	
543		21 156	502		5 264	6 334	2 361	225	165	148	664	
647		12 868	416		1 342	7 275	1 454	205	222	124	415	
12 706		12 414	1 201		2 435	5 257	2 174	1 077	128	269	878	
X 1 434		9 104	480	5 218	6 692	7 956	2 578	561	113	139	534	
S 406		4 852	282	2 305	4 438	2 566	1 568	444	58	45	259	

[] = µg de inmunoglobulinas de cerdo/ratón.

S.C. = subcutánea.

* = cultivos celulares contaminados.

CUADRO 6. Cuentas por minuto (cpm) obtenidas del ADN-H³ de los linfocitos de bazo + Gamaglobulina de cerdo.

vía ()	0	1.5	7.5	15	75	150	300	600	1 200	2 400	4 500	
Oral	4 647	1 701	9 022	12 585	2 163	*	650	1 687	254	182	230	
	4 030	4 109	7 472	1 556	2 465		3 375	3 508	234	189	134	
	2 218	11 850	7 376	1 110	3 241		2 429	6 097	236	212	255	
	3 707	3 374	19 856	4 803	20 143		3 106	22 697	256	601	245	
	5 309	6 531	21 451	1 617	3 487		365	45 425	156	1 404	228	
	3 514	5 422	13 443	1 596	16 309		277	711	395	357	236	
	2 975	199	6 911	1 491	*		390	457	364	470	562	
	2 577	339	6 771	1 464			2 161	478	465	463	294	
	8 252	11 950	6 585	1 191			766	096	1 037	214	306	
	9 260	2 138	1 075	1 082			1 193	1 460	201	184	458	
	6 326	6 851	2 488	2 849			3 387	2 434	760	230	503	
	2 286		327	2 009			1 530	345	796	658	660	
	X 4 500	4 990	8 572	2 779	7 968		1 636	7 166	441	462	342	
	S 2 158	3 741	6 388	3 118	7 350		1 157	12 985	262	375	155	
	S.C.	1 675	11 156	239	29 746	1 643	14 725	28 018	114	109	695	350
		1 462	14 667	209	12 109	1 081	18 639	28 815	167	486	594	327
		1 750	15 464	365	33 369	8 243	15 288	30 240	511	265	647	457
2 339		12 275	253	30 715	8 601	17 344	28 904	1 853	673	692	274	
1 643		21 084	520	25 861	12 782	15 725	29 171	3 205	369	864	397	
1 191		15 394	634	12 648	5 481	13 660	27 496	297	293	595	1 089	
3 118		4 708	24	*	5 828	9 850	28 904	4 167	148	588	249	
2 719		4 881	41		4 990	13 567	26 823	641	232	755	374	
3 517		3 534	350		3 676	18 239	25 533	1 005	381	936	564	
3 744		7 585	321		7 951	15 997	23 898	301	465	815	302	
4 613		4 314	453		8 125	13 218	32 701	556	712	712	262	
2 967		4 557	656		2 691	10 985	28 001	2 973	329	1 703	564	
X 2 561		10 084	338	30 741	6 757	14 776	28 208	1 315	371	799	434	
S 1 018		5 606	195	2 490	2 768	2 580	2 137	1 333	179	292	222	

() = concentración de inmunoglobulinas de cerdo/ratón (µg)

S.C. = subcutánea.

* = cultivos celulares contaminados.

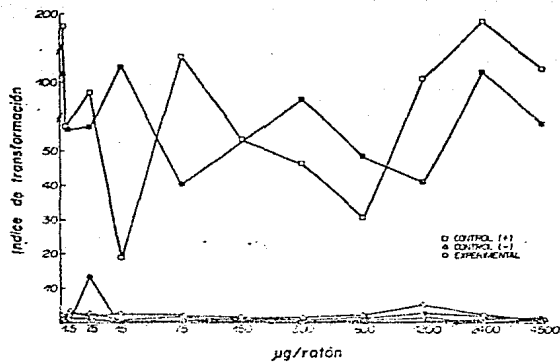
CUADRO 7. Cuentas por minuto (cpm) obtenidas del ADN-II³ de los linfocitos de bazo + Con A.

vía []	0	1.5	7.5	15	75	150	300	600	1 200	2 400	4 500	
Oral	715 057	184	1 026	321 075	714 904	*	36 177	188 794	3 060	12 273	24 932	
	724 447	437	342	457 146	857 908		12 357	253 630	7 094	11 322	17 500	
	742 286	1 860	83	464 902	746 790		45 445	206 584	4 909	20 054	27 598	
	664 073	3 123	1 768	390 703	783 232		17 143	224 055	3 310	12 529	25 230	
	622 695	7 540	3 735	300 835	907 956		39 351	223 746	2 906	21 940	30 969	
	785 089	5 614	512	346 039	859 418		38 693	117 488	2 483	19 068	8 863	
	771 156	1 528	11 940	434 401	*		363 732	311 004	8 325	12 327	29 914	
	512 745	736	10 262	664 133			203 511	403 477	8 090	18 250	13 591	
	660 787	255	5 442	613 928			289 327	467 812	12 256	25 755	17 924	
	674 846	363	5 617	577 999			201 049	384 643	13 764	20 147	9 548	
	686 937	726	12 335	621 206			239 077	353 639	12 248	8 784	16 235	
	556 942	534	32 556	629 323			242 740	185 057	13 412	13 254	10 612	
	X 676 421	1 908	7 134	485 140	811 701		144 050	276 660	7 654	16 308	19 409	
	S 78 199	2 272	8 797	125 655	68 399		119 648	101 588	4 188	4 985	7 697	
	S.C.	4 402	378 210	4 841	279 130	578 113	850 054	659 354	20 716	3 271	61 008	109 420
		595	367 714	792	267 739	579 669	726 451	663 870	16 224	3 937	59 880	70 960
209		476 599	104	189 800	583 649	811 986	919 817	16 794	3 703	62 258	102 802	
356		419 998	357	240 066	636 820	12 604	698 551	19 550	1 090	68 569	72 870	
949		537 533	390	182 893	556 918	815 726	660 774	17 660	5 042	82 304	119 051	
341		414 973	188	111 340	644 875	736 296	737 290	27 369	4 452	78 550	91 050	
722 654		132 146	183	*	563 187	359 351	737 524	15 102	9 396	54 761	34 787	
477 018		99 430	139		539 712	957 715	652 927	12 123	8 293	53 877	15 327	
697 638		93 902	425		590 590	745 000	609 714	14 263	9 296	36 104	17 239	
618 656		61 378	261		552 826	760 624	804 506	17 805	9 173	63 733	21 557	
702 538		66 032	150		470 789	776 339	669 230	16 054	10 741	58 531	18 637	
498 185		88 645	132		455 287	851 292	1059 898	23 990	9 402	61 357	14 622	
X 310 295		261 386	661	215 161	561 869	701 118	741 117	18 132	6 483	61 744	57 360	
S 316 962		176 838	1 273	51 940	52 505	248 824	124 471	4 057	3 073	11 322	41 160	

[] = µg de inmunoglobulinas de cerdo/ratón.

S.C. = subcutánea.

* = cultivos celulares contaminados.



Gráfica 5. Transformación Blastoide. Comportamiento de linfocitos de bazo de los ratones inmunizados por vía oral (figuras negras) y por vía subcutánea (figuras blancas) con diferentes concentraciones de inmunoglobulinas de cerdo en presencia de inmunoglobulinas de bovino Δ , inmunoglobulinas de cerdo \circ y Con A \square .

CUADRO 5. Indices de Transformación celular.

vía []		0	1.5	7.5	15	75	150	300	600	1 200	2 400	4 500
Oral	O	1	1	1	1	1	*	1	1	1	1	1
	Ig bovina	0.19	0.76	1.08	0.38	0.06	*	0.57	0.44	0.98	0.89	1.65
	Ig cerdo	0.78	0.31	13.73	0.69	0.40	*	0.95	1.68	2.37	2.17	1.37
	Con A	112.90	72.17	73.00	120.50	40.91	*	84.05	40.57	41.20	116.79	78.02
S.C.	O	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Ig bovina	0.75	2.55	2.52	0.46	1.86	0.69	0.16	0.03	1.65	0.44	1.11
	Ig cerdo	1.73	2.83	1.77	2.74	1.08	1.20	1.75	2.19	8.42	2.54	0.90
	Con A	185.17	73.41	94.63	19.20	145.77	61.16	46.08	30.19	94.53	196.32	120.02

[] % de inmunoglobulinas de cerdo/ratón.
 Ig. inmunoglobulinas.
 S.C. subcutánea.
 * cultivos celulares contaminados.

puede observar más evidentemente el comportamiento de los linfocitos dentro de cada grupo y entre cada uno de ellos.

Los linfocitos cultivados en presencia de gamaglobulinas de bovino presentaron IT bajos, indicando que el comportamiento de estas células fue similar al de los linfocitos cultivados con medio RPMI. En los linfocitos de los ratones inmunizados por vía subcutánea, los IT fluctuaron entre 0.16 y 2.55; y en los linfocitos de los ratones inmunizados por vía oral entre 0.06 y 1.65.

Los linfocitos cultivados en presencia de gamaglobulinas de cerdo presentaron IT bajos, a excepción del IT obtenido en 7.5 μ g en vía oral, pero mayores que los obtenidos cuando los linfocitos se cultivaron con gamaglobulinas de bovino. También en este caso, los linfocitos tuvieron un comportamiento similar al de las células cultivadas con medio RPMI. Los IT de los linfocitos de los ratones inmunizados por vía subcutánea fluctuaron entre 0.9 y 5.42; y en los linfocitos de los inmunizados por vía oral entre 0.31 y 2.37.

Los linfocitos cultivados en presencia de Con A presentaron IT significativamente mayores que los de los otros grupos celulares. Los IT de los linfocitos de los ratones inmunizados por vía subcutánea oscilaron entre 30.19 y 196.32; y en los linfocitos de los inmunizados por vía oral entre 40.91 y 120.5. Estos datos indican claramente que la funcionalidad de los linfocitos fue la óptima.

Por otra parte, es importante hacer notar, que los IT de los linfocitos de los ratones inmunizados por vía subcutánea fueron casi siempre mayores que los encontrados en los linfocitos de los ratones inmunizados por vía oral.

Estos datos se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de U de Mann-Whitney. Por medio del análisis de varianza, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos celulares con respecto a la dosis administrada y a la vía de inmunización.

	dd	Gl	Ms	F
TOTAL	2.801×10^{16}	719		
ENTRE	7.542×10^{14}	19	3.969×10^{13}	1.019
VIA	3.773×10^{13}	1	3.793×10^{13}	0.973
DOSIS	3.837×10^{14}	9	4.263×10^{13}	1.094
VIA X DOSIS	3.325×10^{14}	9	3.694×10^{13}	0.948
ERROR	2.726×10^{16}	700	3.894×10^{13}	

F crítica para $p = 0.05 = 2.94$

Con la prueba de U de Mann-Whitney no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las células cultivadas en presencia de inmunoglobulinas de cerdo, gamaglobulinas de bovino y medio RPMI completado. Por el contrario, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos mencionados anteriormente y las células cultivadas en presencia de Con A para los linfocitos de los animales tratados por ambas vías como se observa en la Gráfica 5.

Hemaglutinación Indirecta en microplaca.

En la Gráfica 6 y Cuadro 9, puede observarse que los animales tratados por vía subcutánea respondieron en un 75.91% (104/137) en todas las concentraciones a excepción de la de 7.5 $\mu\text{g/ml}$, mostrando títulos desde 1:2 hasta 1:256.

El 19.67% (24/122) de los animales inmunizados por vía oral respondieron, a excepción de las concentraciones de 15 y 75 $\mu\text{g/ml}$. En comparación con los ratones tratados por vía subcutánea, los títulos fueron bajos; de 1:2 a 1:16. Es importante hacer notar que conforme fueron aumentando las dosis de inmunoglobulinas de cerdo, el título de anticuerpos fue aumentando; obteniéndose en 300 $\mu\text{g/ml}$ los títulos más altos a 1:256 en vía subcutánea y 1:8 en vía oral. También puede observarse que algunos de los animales testigos respondieron con títulos bajos de anticuerpos; 1:16 en vía subcutánea y 1:4 en vía oral. Por otra parte, en la Figura 5 se muestra

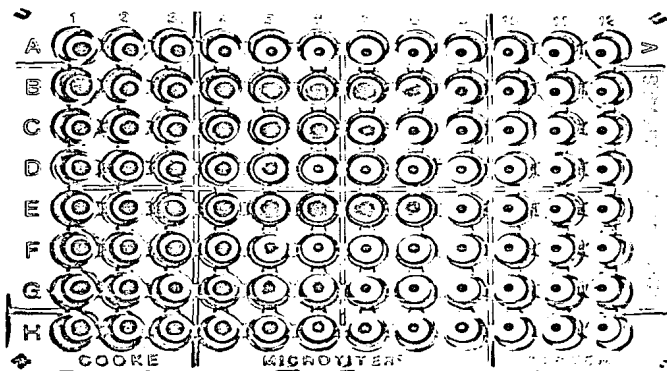
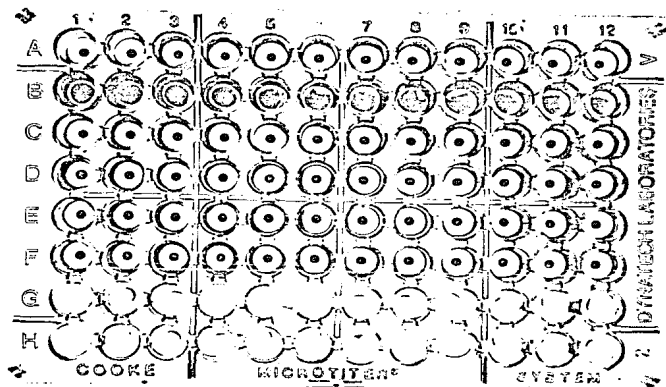
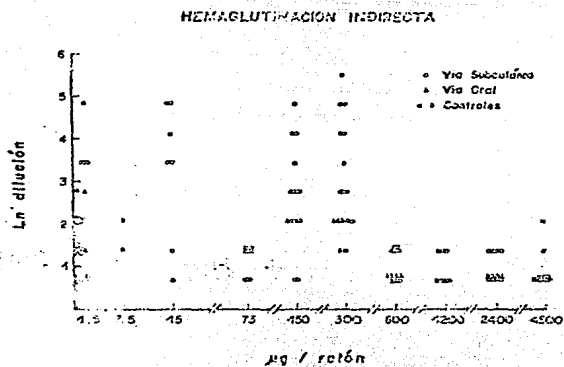


Fig. 5. Hemaglutinación Indirecta. De la placa superior, en la línea A se observa que no existe hemaglutinación (control negativo) a diferencia de la línea B que funcionó como control positivo (suero de conejo anti-cerdo) que presentó aglutinación hasta el pozo número 12; en las demás líneas y en la placa inferior, se observan sueros negativos y positivos de los animales experimentales.

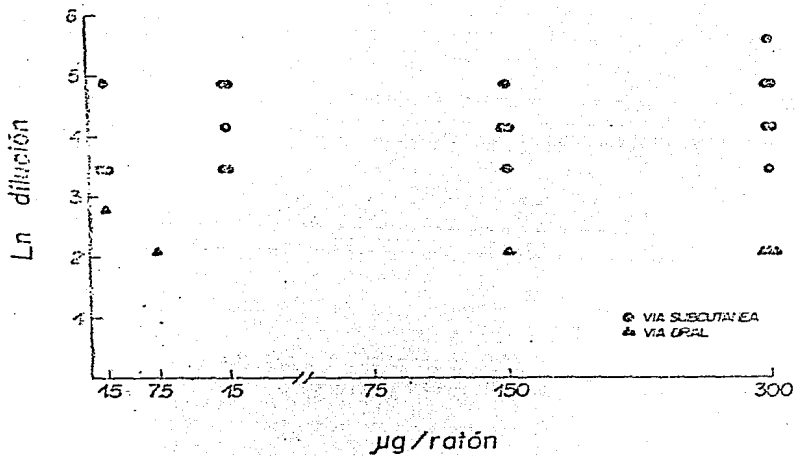


Gráfica 7. Hemaglutinación Indirecta. Sueros positivos de los ratones inmunizados por vía oral y vía subcutánea.

CUADRO 9. Presencia de anticuerpos en calostro lactante (Cepa Balb/c AnN) determinada por medio de la Técnica de Hemaglutinación Indirecta.

µg de IgG/ matón.	n/t*	Vía Subcutánea		n/t*	Vía Oral	
		titulo	t		titulo	t
0	18/28	1:2 = 6 1:4 = 1 1:8 = 1	64	4/19	1:2 = 3 1:4 = 1	21
1.5	4/7	1:2 = 1 1:128 = 1	57	2/6	1:4 = 1 1:256 = 1	33
7.5	0/5	-----	0	2/5	1:4 = 1 1:8 = 1	40
15.0	7/13	1:2 = 1 1:4 = 1 1:12 = 2 1:64 = 1 1:128 = 3	54	0/7	-----	0
75.0	11/12	1:2 = 3 1:4 = 5	92	0/15	-----	0
150.0	14/14	1:2 = 2 1:8 = 4 1:16 = 4 1:32 = 1 1:64 = 2 1:128 = 1	100	1/10	1:8 = 1	10
300.0	12/12	1:4 = 1 1:8 = 3 1:16 = 3 1:32 = 1 1:64 = 2 1:128 = 2 1:256 = 1	100	4/8	1:4 = 1 1:8 = 3	50
600.0	11/11	1:2 = 4 1:4 = 7	100	4/10	1:2 = 4	40
1200.0	6/8	1:2 = 6 1:4 = 7	75	2/16	1:2 = 1 1:4 = 1	12.5
2400.0	13/13	1:2 = 5 1:4 = 5	85	4/15	1:2 = 4	27
4500.0	10/14	1:2 = 1 1:4 = 1 1:8 = 1 1:16 = 1	71	1/11	1:2 = 1	9.1

IgG inmunoglobulinas de cadena.
* sueros positivos/sueros totales.



Gráfica 6. Remaglutinación Indirecta. Sueros positivos de los ratones inmunizados por vía oral y vía subcutánea con diferentes concentraciones de inmunoglobulinas de cerdo y con PBS.

CUADRO 10. Frecuencia de anticuerpos en lactantes (Cepa Halb/c Ann) determinada por medio de la Técnica de Hemaglutinación Indirecta.

Año de Igs/ ratón	Vía Subcutánea			Vía Oral		
	n/t*	título	%	n/t*	título	%
1.5	4/7	1:32 = 3 1:128 = 1	57	1/16	1:16 = 1	16.66
7.5	0/5	-----	0	1/5	1:8 = 1	20
15.0	1/13	1:32 = 2 1:64 = 1 1:128 = 2	38	0/7	-----	0
75.0	0/12	-----	0	0/15	-----	0
150.0	4/14	1:32 = 1 1:64 = 2 1:128 = 1	28	1/10	1:8 = 1	10
300.0	6/12	1:32 = 1 1:64 = 2 1:128 = 2 1:256 = 1	50	3/8	1:8 = 3	37.50
600.0	0/11	-----	0	0/10	-----	0
1200.0	0/8	-----	0	0/16	-----	0
2400.0	0/13	-----	0	0/15	-----	0
4500.0	0/14	-----	0	0/11	-----	0

Igs = Inmunoglobulinas de cerdo.

* = Sueros positivos/sueros totales.

que el control negativo (eritrocitos sensibilizados + PBS) no presentó título de anticuerpos, y el control positivo (eritrocitos sensibilizados + suero de conejo anti-cerdo) presentó un título hasta de 1:4096.

De acuerdo con los datos obtenidos en los sueros testigos en ambas vías, se estableció la positividad de los sueros de los ratones inmunizados, eliminando los valores abajo de 1:16 para la vía subcutánea y 1:4 para la vía oral, dado que la positividad de los testigos estaba en esos valores y por lo tanto se consideraron positivos unicamente valores arriba de los encontrados en los grupos testigos como se observa en la Gráfica 7 y Cuadro 10.

De esta manera, solamente el 13.86% (19/137) de los animales inmunizados por vía subcutánea y el 4.91% (6/122) de los inmunizados por vía oral, mostraron títulos de anticuerpos.

El análisis estadístico mediante la prueba de X^2 , indica que los valores encontrados en el suero de los animales experimentales inmunizados por vía subcutánea son diferentes a los encontrados en el suero de los animales testigos con una $p \angle$ de 0.001. Por el contrario, los resultados en el grupo inmunizado por vía oral, muestran una diferencia con $p \angle$ de 0.05.

La comparación entre las dos vías muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas excepto en el grupo inmunizado con 1.5 μ g de inmunoglobulinas de cerdo.

DISCUSION

El fenómeno inmunológico presente en todos los vertebrados y algunos invertebrados, se inicia con la función primordial del reconocimiento de lo propio.

Este evento está mediado por el reconocimiento de moléculas presentes en la superficie de las células, las cuales son el resultado de la expresión de un conjunto de genes a los que en grupo se les llama " sistema de antígenos de histocompatibilidad ", (HLA en el humano) el cual se vuelve más complejo y polimórfico en mamíferos (39 y 42).

Congruente con la Ley de Haeckel de " la recapitulación de la filogenia durante la ontogenia ", la primera respuesta inmune en fetos humanos se observa a las 10 semanas, momento en el cual se evidencia la reactividad de los linfocitos de hígado en cultivo mixto de linfocitos (39). Se conoce también que el desarrollo fetal implica una supresión de la respuesta inmune de la madre hacia los antígenos de histocompatibilidad del feto y que esta supresión demostrada en células ó suero, termina unos pocos días después (de 10 a 15 días en el humano) del parto (43, 44 y 45). Asimismo, de acuerdo a la Teoría de Burnet, durante el desarrollo fetal, el individuo suprime las clonas reactivas a sus propios antígenos (39).

Actualmente, se ha identificado también en el genoma humano un gen que codifica para una proteína ó péptido inmunosupresor, que está estrechamente relacionado con la proteína que sintetizan algunos retrovirus como el FeLV, (46) de tal manera que se puede suponer que ésta pudiera ser un mecanismo real en el feto, ya que la supresión que se observa en el recién nacido no se ha podido relacionar con los linfocitos TS (47).

Al mismo tiempo, se conoce que las células T4 necesitan de la estimulación antigénica para poder multiplicarse, por lo que la respuesta del neonato a los estímulos presentes en el medio ambiente después del nacimiento, será menos eficiente y más tardía que la respuesta que un adulto puede desarrollar a los mismos estímulos contra los cuales ya tiene células de memoria (4).

Esta inmunosupresión en el recién nacido se compensa en parte por la transferencia de anticuerpos, células y/o sus productos de la madre en forma pasiva (3, 4, 8, 9, 10 y 11).

Es probable que las diarreas que se observan en el recién nacido sean el reflejo del desequilibrio de los mecanismos de defensa que son superados por los agentes patógenos. Es por ello que el tratar de incrementar la concentración de anticuerpos del recién nacido a través de la administración pasiva de inmunoglobulinas específicas, contra los agentes patógenos más frecuentemente involucrados en la producción de diarreas puede repercutir en la frecuencia de las mismas. Sin embargo, la administración de inmunoglobulinas heterólogas pueden ocasionar reacciones inmunológicas en contra de ellas, ya que las macromoléculas administradas por vía oral pueden atravesar la mucosa intestinal fácilmente durante los primeros días después del nacimiento y aún cuando este mecanismo cese, existe la posibilidad de que éstas mediante endocitosis pueden llegar completas a la circulación (22, 21, 22, 33 y 34) provocando la estimulación del aparato inmunocompetente. Debido a lo anterior, es necesario estudiar si las inmunoglobulinas de cerdo administradas por vía oral son capaces de estimular inmunológicamente a los recién nacidos. Para ello, se montó un modelo experimental en ratones recién nacidos a los cuales se les administró inmunoglobulinas de cerdo por vía oral.

Los resultados encontrados muestran que los linfocitos T de los ratones Balb/c AnN de 21 días de edad están capacitados para responder a mitógenos inespecíficos, respuesta que se puede observar incluso en fetos de 16 días de edad; por otra parte, la estimulación de células T4 y la multiplicación clonal necesaria para montar una respuesta inmune se puede observar en ratones después del sexto día de edad, etapa en la cual aparentemente termina el periodo de supresión (47, 48 y 49). Los resultados encontrados en este trabajo muestran claramente que los cultivos celulares de los linfocitos de ratones recién nacidos a los que se les administró inmunoglobulinas de cerdo por vía oral ó subcutánea, no presentan diferencias significativas cuando se cultivan en presencia de gamaglobulinas de cerdo y gamaglobulinas de bovino, se observa una diferencia estadísticamente significativa cuando se les compara con células estimuladas con Con A de acuerdo a la prueba es-

estadística de U de Mann-Whitney (50). De acuerdo al análisis de varianzas que se empleó tampoco se encontraron diferencias significativas.

Aunque el 13.86% de los animales inmunizados por vía subcutánea y el 4.91% de los inmunizados por vía oral produjeron anticuerpos en contra de dicha proteína; el valor de la respuesta es tan bajo que no se encuentra significancia estadística cuando se analiza por medio de La prueba de χ^2 . Sin embargo, existe una diferencia significativa entre los sueros de los ratones testigos y los sueros de los ratones experimentales únicamente en el grupo inmunizado por vía subcutánea. Se conoce que cuarenta la segunda y tercer semana de edad, se hace evidente la respuesta inmune en ratones hacia antígenos solubles, aunque definitivamente en menor grado que en animales adultos, lo cual se puede observar también en este trabajo.

Es importante hacer notar que aunque es posible la estimulación antinatural por vía oral en individuos normales, como se ha visto en niños de 1 mes a 5 años de edad, en los cuales se pueden encontrar anticuerpos contra una de Albúmina Sérica Bovina (ASB) y de B-lactoglobulina, como resultado quizá de la ingestión de leche de vaca (12 y 51); rara vez se observan reacciones indeseables. Por otra parte, el hecho de que los ratones adultos son capaces de responder inmunológicamente a la estimulación con inmunoglobulinas de cerdo, permite asegurar que esta especie reconoce como extraño a esta molécula y que por lo tanto, la falta de reacción de los recién nacidos se debe considerar como un fenómeno inmunológico influenciado por la edad de los mismos.

CONCLUSION

Aunque la estimulación inmunológica con inmunoglobulinas de cerdo se inició al nacimiento de los ratones, ésta se continuó hasta después del período de supresión inmune. Sin embargo se demuestra la presencia de anticuerpos en los ratones inmunizados por vía subcutánea, aunque a concentraciones muy bajas en comparación a las concentraciones de anticuerpos encontradas cuando se inmunizan ratones adultos. Se puede por lo tanto aseverar la importancia de la edad y vía de estimulación en la respuesta inmune.

" A P E N D I C E "

PREPARACION DE SOLUCIONES

PBS pH 7.4, 0.01 M.

Para 250 ml, se prepararon las soluciones A y B.

Sol. A: Se pesaron 6.9 gr de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Sol. B: Se pesaron 7.1 gr de Na_2HPO_4 .

Se tomaron 16.5 ml de la Sol. A, 33.5 ml de la Sol. B, se agregaron 7.4 gr de NaCl, se aforó con agua destilada hasta 1 l y se ajustó el pH a 7.4.

Técnica de Lowry.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- A. Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%.
- B. " de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 2% (tartrato de sodio-potasio).
- C. Solución de Na_2CO_3 al 2% en una solución de NaOH 0.01 N.
- D. " del reactivo de folin 1:2.
- E. " estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) 1mg/ml.
- F. " para 100 ml, se agregó 1 ml de la Solución A + 1 ml de la Solución B + 98 ml de la Solución C.

Con la Solución E se preparó una curva patrón con concentraciones de proteína de 200, 100, 50, 25 y 10 $\mu\text{g/ml}$. A cada una de estas diluciones se les agregaron 4 ml de la Solución F, se agitaron y se dejaron reposar 10'; después se les agregó a cada una 0.4 ml de la Solución D, agitándose rápidamente y se procedió posteriormente a la lectura espectrofotométrica a 600 nm, de cuyos valores se construyó la curva patrón. De la muestra problema se hicieron diluciones de 1:1000 y 1:2500; se tomaron los valores de densidad óptica y los valores resultantes se extrapolaron en la curva patrón, obteniéndose de esta manera la concentración de la muestra problema.

Solución Salina Balanceada (SSB) de Hank.

Para 1 l, se prepararon las soluciones I y II:

Solución I: D-Glucosa _____ 10 gr.
 KH_2PO_4 anhidro _____ 6 gr.
 Na_2HPO_4 _____ 1.85 gr.
 rojo de fenol _____ 2 ml (Solución al 0.05%).

Solución II: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ _____ 1.86 gr.
 KCl _____ 4 gr.
 NaCl _____ 80 gr.
 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ _____ 2 gr.
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ _____ 2 gr.

Se tomaron 100 ml de la Solución I + 100 ml de la Solución II, se aforó a 1 l con agua destilada, se ajustó el pH a 7.3, se esterilizó con un filtro MILLIPORE con membrana de 0.22 μm y se repartió en muestras de 100 ml en frascos con tapón y retapa metálica estériles.

Medio RPMI 1640 Gibco.

Para 1 l:

Se pesaron 10.4 gr de RPMI 1640 Gibco, se disolvió con agitación lenta, se agregaron 2 gr de Na_2CO_3 y se ajustó el pH a 0.2 - 0.3 unidades por debajo del pH deseado. Se esterilizó con un filtro MILLIPORE con membrana de 0.22 μm y se repartió en muestras de 100 ml en frascos con tapón y retapa metálica estériles.

Hepes (ácido N-2- Hidroxietilpiperazina-N'-2 etanelsulfónico).

Para 100 ml:

Se pesaron 23 gr de Hepes y se disolvieron en 70 ml de agua destilada: se ajustó el pH a 7.2 con una solución de NaOH 5N, se aforó a 100 ml y se esterilizó con un filtro MILLIPORE con membrana 0.22 μm manteniéndose a 4°C.

Glutamina.

Para 100 ml:

Se preparó una solución 200 mM, se pesaron 2.927 gr de glutamina y se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Se esterilizaron 15' a 15 lb de presión, se hicieron alícuotas de 4 ml y se congelaron.

Antibióticos.

Se preparó una mezcla penicilina-estreptomicina SIGMA (100 ml) que contenían 10, 000 U de penicilina/ml y 10, 000 µg de estreptomicina/ml. Se esterilizó con un filtro MILLIPORE con membrana de 0.22 µm.

Suero Bovino Fetal (SBF).

El suero bovino fetal se descomplementó a 56° C durante 30', se hicieron alícuotas de 100 ml en frascos con tapón y retapa metálica y de 10 ml en tubos, ambos estériles y se congelaron hasta su uso.

Medio RPMI 1640 Gibco complementado.

Para 100 ml se agregaron:

- 0.4 ml de la mezcla de antibióticos.
- 4.0 ml de la solución de hepes.
- 1.0 ml de la solución de glutamina.
- 10.0 ml de suero bovino fetal.

Concanavalina A (C-2010 SIGMA).

Se pesaron 400 mg de Con A, se disolvieron en 20 ml de NaCl 6.1 M, se centrifugó a 457 g durante 10' y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 37 000 g durante 1 hr y 30'. Posteriormente se cuantificó tomando una muestra

tra de Con A diluida 1:50 en NaOH 1 N y se leyó en un espectrofotómetro Hilger & Watts a 280 nm. Se esterilizó por filtración con un filtro MILLIPORE con membrana de 0.22 μ m, se repartió en muestras de 2 ml en frascos con tapón y retapa metálica estériles y se congelaron hasta su uso.

Líquido de Centelleo.

Para 1 l se pesaron:

6 gr de PPO (2,5 difeniloxazol)

0.05 gr de POPOP [1,4-bis 2 (5-feniloxazolil)]benceno.

Se agregaron 1 000 ml de Tolueno.

Solución Alsever's.

Para 50 ml:

Se pesaron 0.4 gr de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (citrato de sodio), 0.21 gr de NaCl y 1.025 gr de Dextrosa; se ajustó el pH a 6.1 con ácido cítrico al 10% y se esterilizó por 15' a 10 lb de presión.

REFERENCIAS

1. ELIASSEN M., 1984. Aplicación de la ingeniería genética en la prevención de la colibacilosis entérica. Porciram. IX, 106:5-10.
2. OCAMPO L., y SUMANO H., 1984. Sisiología de la diarrea. Porciram. IX, 106:11-13.
3. BARBOSA H., RAVINES J., GARZA J., y LARRALDE C., 1981. Producción masiva de anticuerpos comerciales en cerdos. Técnica Pecuaria en México (INIP). 41:45-52.
4. KRETSCHMER R., 1977. Inmunidad en el recién nacido. Gaceta Médica de México. 113, 3:133-138.
5. CARRADA B., 1981. La fiebre tifoidea y la vacunación antitifoídica. Sal. Pub. Méx. 23, 2:103-157.
6. HERNANDEZ V., y CALDERON S., 1976. Vacunación de lactantes contra infecciones entéricas microbianas. Gaceta Médica de México. 111, 1:25-41.
7. ESPINOSA L., COLORADO D., PADILLA F., y CETINA S., 1983. Frecuencia de gastroenteritis infecciosa aguda por Rotavirus en niños de diversas poblaciones de la Rep. Mexicana. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 40, 4:188-191.
8. MIMS A., 1977 The Pathogenesis of Infections Disease. Academic. Press. London, New York, Sn. Francisco.
9. MURATA H., y NAMIOKA S., 1977. The duration of colostral immunoglobulin uptake by the epithelium of the small intestine of neonatal piglets. J. Comp. Path. 87, 431-439.
10. ASQUITH P., 1979. Immunology of the gastrointestinal tract. Churchill Livingstone New York.
11. PASSMORE R., y ROBSON J., 1981. A companion to medical studies. Pharmacology, Microbiology, General Pathology and related subjects. 2a. Ed. Blackwell Scientific Publications. Vol. 2. Oxford, London, Edinburgh.
12. PARKER C., 1977. Immune responses to environmental antigens absorbed through the gastrointestinal tract. Fed. Proc. 36, 5:1732-1735.

13. ROWLEY D., 1977. The problems of oral immunization. AJEBAK 55 (Pt.1) 11-18.
14. BRUETON M., 1980. Immune mechanisms and the gut. Eur. J. Pediatr. 133: 201-205.
15. ROTHBERG R., KRAFT S., y FARR R., 1967. Similarities between rabbit antibodies produced following ingestion of Bovine Serum Albumin and following parenteral immunization. J. Immunol. 98, 2:386-395.
16. PERROTO J., HANG L., ISSELBACHER H., y WARREN K., 1974. Systemic cellular hypersensitivity induced by an intestinally absorbed antigen. J. Exp. Med. Vol. 140, pp. 296-299.
17. IMSS. 1981. Boletín epidemiológico semanal de los estados y del valle de México. 4:52.
18. SNYDER J., y MERSON M., 1982. The magnitude of the global problem of acute diarrreal disease. A review of active surveillance data. Bull. W. H. O. 60, 4:605-613.
19. ELLIOTT K., y KNIGHT J., 1976. Acute diarrhea in childhood. Ciba Foundation Symposium 42 (new series) Elsevier/Excerpta Medica. North Ithaca, New York. p. 1.
20. SCHOTTELIUS B., y SCHOTTELIUS D., 1980. Fisiología. Ed. Interamericana. México.
21. SALAS A., y RAMIREZ M., 1981 Síndromes pediátricos. Fisiopatología Clínica y Terapéutica. 2a. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México. pp. 139-145.
22. BROBECK C., BEST E., y TAYLOR L., 1983. Bases fisiológicas de la práctica médica. Ed. Médica Panamericana. México.
23. GANONG. 1982. Manual de Fisiología Médica. El Manual Moderno. Cap. 25 y 26. México.
24. WARSHAW A., WALKER A., CORNELL R., e ISSELBACHER K., 1971. Small intestinal permeability to macromolecules. Transmission of horseradish peroxidase into mesenteric lymph and portal blood. Lab. Invest. 25, 6:675-684.
25. WALKER A., CORNELL R., DAVENPORT L., e ISSELBACHER K., 1972. Macromolecular absorption. Mechanism of horseradish peroxidase uptake and trans-

- port in adult and neonatal rat intestine. *J. Cell. Biol.* Vol. 54. pp. 195-205.
26. WALKER A., ISSELBACHER K. y BLOCK., 1973. Intestinal Uptake of Macromolecules. II. Effect of parenteral immunization. *J. Immunol.* 111, 1: 221-226.
27. WALKER A., ISSELBACHER K. y BLOCH K., 1974. Immunologic control of soluble protein absorption from the small intestine: a gut-surface phenomenon. *Am. J. Clin. Nutr.* 27. 1434-1440.
28. WALKER A., 1975. Immunological mechanisms controlling macromolecular penetration in the small intestine. *A. S. M. Microbiology* pp. 158-164.
29. WALKER A., ABEL S., WU M., y BLOCH K., 1976. Intestinal uptake of macromolecules.V. Comparison of the in vitro uptake by rat small intestine of antigen-antibody complexes prepared in antibody or antigen excess. *J. Immunol.* 117, 1032-1032.
30. WALKER A., 1981. Antigen uptake in the gut: immunologic implications. *Immunology today.* pp. 30-39.
31. MILLE E., HARMON B., ULLREY D., SCHMIDT D., LUECKE R., y HOEFER J., 1962. Antibody absorption, retention and production by the baby pig. *J. Animal Science.* Vol. 121. pp 309-314.
32. PAYNE L., y MARSH C., 1962. Gammaglobulin absorption in the baby pig: the non selectiv absorption of heterologus globulins and the factors influencing absorption time. *J. Nutrition.* Vol. 76. pp. 151-158.
33. SPEER V., BROWN H., QUINN L., y CATRON D., 1959. The cessation of antibody absorption in the young pig. *J. Immunol.* Vol. 83. pp. 632-634.
34. KAEBERLE M., y SEGRE D., 1964. The persistence of passively administered antibodies of homologous and heterologous origin in the circulation of baby pigs. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 25. pp. 1103-1111.
35. RODEWALD R., 1973. Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. *J. Cell. Biol.* Vol. 58. pp. 189-211.
36. KOOK W., YOUNG J., SIK H., YOUNG H., MOO S., y PRINCE A., 1985. Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus a comparison between the efficacy of passive and passive-active immunization in Korea. *J. Infect. Dis.* 151, 2:

37. CAMPBELL D. H., GARVEY J. S., CREMER N., y SUSSDORF D. H., 1970. Immunology. 2a. Ed. W. A. Benjamin Inc. New York.
38. LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., y RANDALL R. S., 1951. Protein measurement with folinphenol reagent. J. Biol. Chem. Vol. 193. pp. 265-275.
39. FUDENBERG H. H., STITES D. P., CADWELL J. L., y WELLS J. V., Inmunología clínica. 3a. Ed. El Manual Moderno. S.A. de C.V. Méx. 1982.
40. BOYDEN S. V., 1951. The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid, the subsequent hemagglutination with anti-protein sera. J. Exp. Med. 93, 107.
41. WEIR B., 1978. Handbook of experimental immunologic. 3a. Ed. Vol. 1 Immunochemistry. Blackwell New York.
42. FOUGEREAU M., y DAUSS J., 1980. Immunology 80. Academic Press London.
43. VAN FURTH R., SCHIT H., y WLTIJMANS , 1965. The immunological development of the human foetus . J. exp. Med. 122: 1173-1188.
44. KASAKURA S., 1971. A factor in maternal plasma during pregnancy that suppresses the reactivity of mixed leucocyte cultures . J. Immunol. 107: 1296-1301.
45. SPEAR P., WANG A., RUTISHAUSER U., y EDELMAN G., 1973. Characterization of splenic lymphoid cells en fetal and newborn mice. J. Exp. Med. Vol. 138. pp. 557-573.
46. LAURENCE J., 1985. The immune system in AIDS Sci. Am. pp. 70-136.
47. RODRIGUEZ G., ANDERSON G., WIGZELL H., y PECK A., 1979. Non-T cell matu ra of the naturally occurring spleen-associated suppressor cell present in the newborn mouse. Eur. J. Immunol. 9: 737-746.
48. MOSIER D., y COHEN P., 1975. Ontogeny of mouse T lymphocyte function. Fed. Proc. 34: 137-140.
49. PTAK W., NAIDORZ K., STRZYZEWSKA J., y GERSHON R., 1979. Ontogeny of cells involved in the suppressor circuit of immune response. Eur. J. Immunol. 9:495-500.
50. SIEGEL S., 1979. Estadística no paramétrica. Ed. Trillas . México.
51. KORENSLAT P., ROTHBERG R., MINDEN P., y FARR R., 1968. Immune responses of human adults after oral and parenteral exposure to bovin serum albumin . J. Allergy. 41:4 pp 226-235