

47 29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA TOLERANCIA INMUNOLOGICA
ORAL EN RATONES RECIEN NACIDOS
TRATADOS CON Staphylococcus aureus

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
LEONEL FRANCISCO FIERRO GAXIOLA



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.

CONTENIDO

| capitulos | pagina |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUCCION | 3 |
| 2. ANTECEDENTES | 7 |
| 2.1. El síndrome del desgaste, | |
| 2.2. Inmunopatología del síndrome del desgaste, | |
| 2.3. La tolerancia inmunológica oral, | |
| 2.4. Factores que modulan la tolerancia oral, | |
| 3. OBJETIVOS E HIPOTESIS | 24 |
| 4. MATERIAL | 26 |
| 5. TECNICAS | 28 |
| 5.1. Inducción del síndrome del desgaste, | |
| 5.2. Inducción de la tolerancia oral, | |
| 5.3. Inmunización de los animales, | |
| 5.4. Cuenta de células formadoras de anticuerpos, | |
| 6. METODOLOGIA | 30 |
| 6.1. Diseño del experimento, | |
| 6.2. Recuperación inmunológica de los ratones con el síndrome del desgaste, | |
| 6.3. Influencia del síndrome del desgaste en la inducción de una tolerancia inmunológica oral, | |
| 6.4. Análisis estadístico de los resultados, | |
| 7. RESULTADOS | 34 |
| 7.1. Crecimiento y desarrollo de los ratones, | |
| 7.2. Cinética de la respuesta de anticuerpos, | |
| 7.3. La tolerancia oral del animal desgastado, | |
| 8. DISCUSION | 40 |
| 9. CONCLUSIONES | 60 |
| 10. RESUMEN | 61 |
| 11. TABLAS Y FIGURAS | 64 |
| 12. APENDICE | 77 |
| 13. BIBLIOGRAFIA | 80 |

CAPITULO 1. INTRODUCCION.

Hace aproximadamente tres décadas, después del descubrimiento de los primeros casos de personas inmunodeficientes (1), se inició una nueva etapa de investigaciones clínicas sobre los mecanismos encargados de la defensa específica contra las infecciones. Las primeras inmunodeficiencias congénitas fueron llamadas "experimentos de la naturaleza" (2) porque permitieron obtener una abundante información sobre varios aspectos de la respuesta inmunitaria que habían permanecido desconocidos hasta ese momento. Sin embargo, las personas inmunodeficientes solo pudieron ser estudiadas hasta ciertos límites compatibles con las restricciones éticas de la sociedad.

El descubrimiento de animales de laboratorio con inmunodeficiencias primarias o congénitas (3) y la posibilidad de inducir inmunodeficiencias secundarias mediante ciertos procedimientos quirúrgicos (timectomía, bursectomía y la cateterización permanente del conducto torácico), abrieron otro camino importante para la Inmunología experimental porque proporcionaron los modelos necesarios para ampliar considerablemente los primeros estudios inmunológicos que habían sido realizados en niños inmunodeficientes.

Desde entonces, los modelos experimentales de animales inmunodeficientes han sido utilizados ampliamente para estudiar los mecanismos inmunológicos que pueden estar alterados en diferentes circunstancias clínicas. Particular importancia han tenido los modelos de animales inmunodeficientes en una forma secundaria porque están desnutridos, envejecidos, sometidos a diversos estímulos que les provocan "stress" o porque han sido intervenidos quirúrgicamente para extirparles el timo, la hipófisis u otras glándulas.

En las últimas décadas, los modelos animales también han sido útiles para estudiar los efectos benéficos o deletéreos, sobre la inmunocompetencia, que tiene la administración de varias sustancias naturales o sintetizadas en los laboratorios. Estos experimentos han permitido descubrir nuevos productos con una actividad inmunosupresora o inmunoestimulante. Algunos de ellos han sido purificados y comercializados para su utilización como fármacos en la inmunoterapia de varias enfermedades humanas.

También han sido importantes los modelos animales que tienen comprometida, parcialmente o en una forma transitoria, las funciones de algunas subpoblaciones de linfocitos. Estos animales inmunocomprometidos pueden simular la condición clínica de personas enfermas con algunas funciones inmunológicas deprimidas. En los últimos años se ha observado que, a lo largo de la vida de cualquier individuo, pueden actuar numerosos factores capaces de provocar diversos grados de inmunosupresión. Los factores inmunosupresores más conocidos son las infecciones virales y bacterianas, la administración de ciertos antibióticos y

esteroides, los compuestos utilizados en la quimioterapia de enfermedades primarias, las intervenciones quirúrgicas, la exposición a radiaciones, el cancer, la desnutrición, la edad avanzada, la contaminación ambiental, el hábito de fumar, la drogadicción, varios trastornos emocionales, etc.

Las personas inmunocomprometidas en una forma secundaria son una realidad mucho más frecuente de lo que se había sospechado inicialmente (4). La mayor parte de ellas tienen la inmunidad comprometida en una forma transitoria y no manifiestan inmediatamente complicaciones graves. Pero de todos modos estas personas están expuestas al riesgo que representan ciertas infecciones inaparentes (virus oncogénicos, por ejemplo) cuyas consecuencias generalmente aparecen varios años más tarde y, además, pueden tener facilitado el inicio de otras enfermedades, inmunológicas o no, para las cuales existe una predisposición genética.

Todas estas razones explican el creciente interés por la caracterización inmunológica de varios modelos animales que tienen inmunodeficiencias secundarias. Las investigaciones que se realizan sobre ellos permiten conocer mejor y más rápidamente las bases moleculares de varios trastornos inmunológicos humanos. Este es el caso, por ejemplo, de los estudios que se realizan con ratones inmunodeficientes que pueden ser injertados con linfocitos humanos y, posteriormente, utilizados para infectarlos con el virus responsable del SIDA. Además, los modelos experimentales de

animales inmunodeficientes tambien permiten el ensayo de diversos procedimientos terapeuticos que no pueden ser aplicados libremente en las personas enfermas.

En el Departamento de Biologia de la Facultad de Quimica se trabaja desde hace dos años en la caracterización inmunologica de una inmunodeficiencia secundaria y transitoria de los ratones. Esta enfermedad se conoce como el síndrome del "desgaste" físico e inmunológico (en inglés, "wasting disease" o "runting-like syndrome") y puede ser inducida mediante la administración de varios productos bacterianos en la cavidad peritoneal de animales recién nacidos.

El presente trabajo forma parte de la línea de investigación mencionada. El diseño experimental utilizado permitirá explorar la competencia del sistema inmunológico asociado al tubo digestivo, la cual no ha sido investigada anteriormente en este modelo animal. El estudio de la inmunidad de la mucosa intestinal del animal desgastado es importante por las similitudes que existen entre esta inmunodeficiencia secundaria y la desnutrición humana o de animales de laboratorio que reciben una ingesta deficiente de alimentos.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES.

En el presente trabajo experimental se estudia la capacidad que tiene un grupo de ratones para adquirir una tolerancia inmunológica hacia los antígenos administrados por vía oral cuando se encuentran inmunodeficientes porque se les ha inducido el síndrome del "desgaste". Existe una abundante bibliografía sobre las investigaciones que han permitido caracterizar los principales trastornos físicos e inmunológicos de este modelo animal. Los ratones con la enfermedad del desgaste retrasan significativamente su crecimiento y desarrollo durante un periodo aproximado de dos meses y, en este lapso, se desnutren y presentan una serie de complicaciones que han sido atribuidas a la inmunodeficiencia. Pero los trastornos inmunológicos del animal desgastado no han sido estudiados completamente y, probablemente por esta razón, la enfermedad experimental no ha sido utilizada ampliamente para resolver o conocer los problemas inmunológicos que frecuentemente están asociados a varias enfermedades humanas que evolucionan con desnutrición o caquexia. A continuación se presenta un panorama general del conocimiento que se tiene hoy en día sobre la enfermedad del desgaste y sobre el fenómeno, que se va a estudiar en el presente trabajo, de la tolerancia inmunológica a los antígenos administrados por vía oral.

1. El síndrome del desgaste es una enfermedad experimental que tiene tres manifestaciones principales : 1) retraso del desarrollo pondoestatural de los animales, 2) depresión de la respuesta de anticuerpos y 3) susceptibilidad a infecciones por microorganismos oportunistas. Puede ser provocada por diferentes procedimientos (5) y, según la técnica utilizada para su inducción, puede ser de carácter transitorio o definitivo.

En el presente trabajo, la aparición del síndrome del desgaste va a ser provocada mediante la inyección intraperitoneal de productos bacterianos en ratones recién nacidos. Este procedimiento fue descrito hace varios años por Ekstedt y colaboradores (6).

A continuación se presenta un resumen de los principales síntomas y alteraciones patológicas que han sido descritas en animales con el síndrome del desgaste :

1) Daños corporales :

- inhibición y disminución progresiva del crecimiento,
- postura encorvada,
- adelgazamiento de la piel,
- disminución de la grasa subcutánea,
- alargamiento de las orejas y la cola,
- pelo ralo,
- microesplacnia y microsomnia,

2) Daños en el tejido linfoide :

- atrofia de médula ósea, con necrosis focales,
- atrofia de timo,
- atrofia de ganglios linfáticos,
- aumento de tamaño del bazo, con necrosis focales,
- linfopenia en sangre periférica,

3) Alteraciones glandulares :

- atrofia de tiroides,
- desarrollo incompleto de las glándulas salivales,
- lesiones en la corteza de las suprarrenales,
- degranulación de las células acidófilas (hipófisis),

- 4) Alteraciones sexuales :
- ausencia de caracteres sexuales secundarios en los animales de sexo masculino,
 - espermatogénesis incompleta,
 - esterilidad en los dos sexos,
- 5) Otras alteraciones :
- focos de necrosis en el hígado,
 - reducción del número y el tamaño de los hepatocitos,
 - osteoporosis,
 - desarrollo incompleto de los riñones,
 - anemia microcítica,
 - diarreas hemorrágicas.

La frecuencia con la cual se presentan todas estas alteraciones puede variar según el procedimiento utilizado para inducir la aparición del síndrome, la edad del animal, sexo, etc.

En la década comprendida entre 1960 y 1970, este síndrome y varios más similares despertaron considerable interés porque revelaron las propiedades inmunosupresoras que tenían varios productos, incluyendo algunos de origen bacteriano (7), y porque permitieron establecer comparaciones entre la condición de los animales "desgastados" y el estado clínico de los enfermos con infecciones graves (8). Así mismo, también llamó la atención observar que los animales con un desgaste crónico tenían una elevada incidencia de tumores malignos de aparición espontánea (9). A partir de entonces fue evidente que así como las inmunodeficiencias podían facilitar las infecciones, también podía ocurrir lo contrario, es decir la aparición de varios trastornos inmunológicos como una consecuencia de una infección (10).

Por esa misma época se descubrió que los productos de las bacterias no solo tenían un efecto inmunosupresor sino también otro inmunoestimulante (11). Según la especie animal utilizada,

las dosis del inóculo, vías de administración, etc., los animales podían aumentar o disminuir la calidad de la respuesta inmunitaria después de recibir una o varias dosis de endotoxinas y varios productos más de origen bacteriano. Este último hallazgo resultó mucho más interesante que el anterior por la perspectiva de utilizar los productos bacterianos como un tratamiento adyuvante en personas que tenían la inmunidad comprometida. La mayor parte de los estudios sobre los efectos inmunológicos de varias sustancias separadas de las bacterias se enfocaron hacia las posibilidades terapéuticas de esos factores inmunoestimulantes (12 y 13). Los efectos inmunosupresores de los mismos factores fueron relegados porque, desde un punto de vista pragmático, no ofrecían posibilidades como medicamentos para mejorar la salud de los enfermos inmunocomprometidos. Actualmente, el aumento de las personas que tienen comprometida su inmunidad y presentan infecciones asociadas ha estimulado numerosos estudios sobre las relaciones entre la inmunocompetencia del hospedero y las diversas actividades biológicas que dependen de los microorganismos (14).

El síndrome del desgaste o inmunodeficiencia secundaria provocada mediante la administración de productos bacterianos, se caracteriza por una atrofia o hipoplasia considerable de varios órganos linfoides primarios y secundarios. Sin embargo, las investigaciones publicadas han revelado que los animales desgastados, a pesar de la gravedad de las lesiones macroscópicas en el timo, el bazo y los ganglios linfáticos, solo tienen deprimida su respuesta de anticuerpos contra antígenos timo-dependientes. Después de dos semanas, los animales

desgastados recuperan la imagen histológica y el peso normal del timo (15) y, aparentemente, continúan su vida en una forma indistinguible a la de los ratones sanos.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar las diferentes manifestaciones del síndrome. Las investigaciones realizadas al respecto presentan resultados sugestivos de que la inmunodeficiencia de los animales aparece como una consecuencia de varios eventos sucesivos que parecen tener una relación causa-efecto. Aparentemente, lo primero que sucede después de la inoculación de productos bacterianos en el peritoneo es la estimulación de las células fagocíticas, como los macrófagos o los monocitos, para que liberen al exterior una cantidad exagerada de ciertas citocinas. En una etapa siguiente se deprime la capacidad del animal para sintetizar anticuerpos. Como una consecuencia, las bacterias comensales encuentran la oportunidad para diseminarse hasta diferentes tejidos y, nuevamente, sus productos estimulan la actividad de más células fagocíticas que continúan la liberación de citocinas. Todos estos mediadores, que están reconocidos como los responsables del estado "tóxico" del individuo infectado (16), pueden ser los causantes del desgaste físico e inmunológico que, en una forma transitoria, va a ser la principal característica del síndrome. Una vez terminada la inoculación intraperitoneal de los productos bacterianos, el animal se recupera en una forma similar a como lo haría después de una infección grave. La única diferencia consistiría en que, en el modelo experimental, el animal se desgasta como si estuviera infectado cuando en realidad solo ha sido inyectado con una suspensión estéril de productos bacterianos.

Las hipótesis en favor de que la diseminación de la flora de bacterias comensales es el evento responsable del desgaste se encuentran apoyadas por diferentes experimentos realizados con animales libres-de-gérmenes o sometidos a un tratamiento con antibióticos. El síndrome no ha podido ser reproducido en ratones que, además de las inyecciones intraperitoneales de los productos bacterianos, reciben ciertas dosis de terramicina (17 y 18) o neomicina (19) por vía oral. Así mismo, el esquema de las inyecciones intraperitoneales propuesto por Eksted tampoco puede provocar el desgaste de los animales cuando estos se encuentran en condiciones libres-de-gérmenes (20). Al aplicar otros procedimientos diferentes para la inducción del síndrome del desgaste, por ejemplo la timectomía, también se ha observado que los animales en condiciones axénicas no presentan el cuadro clínico característico de la enfermedad (21).

Todos estos resultados obtenidos en la década de los años 1960-1970 se han actualizado recientemente a causa de las investigaciones realizadas por otros investigadores interesados en estudiar el comportamiento de la flora de bacterias comensales del intestino en animales y personas sometidos al efecto inmunosupresor de diversos factores. La mayoría de los trabajos publicados sobre estos aspectos de la inmunidad han revelado que las alteraciones de la inmunocompetencia permiten la translocalización de las enterobacterias (22). En los animales inmunosuprimidos se ha podido demostrar que ocurre una diseminación de las bacterias que normalmente se localizan en el intestino (23). Se han estudiado ampliamente los mecanismos por

los cuales las enterobacterias avanzan hasta los ganglios linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo (24 y 25) y, así mismo, se ha encontrado que la depresión de la respuesta inmunitaria parece ser la principal causa de translocalizaciones de la flora comensal (26). Estos trabajos han sido recibidos con mucho interés porque las bacterias gram-negativas son las responsables de una buena parte de las infecciones que complican la evolución de los pacientes inmunosuprimidos, particularmente los cancerosos (27) y los desnutridos (28).

Todos los comentarios anteriores, más la elevada frecuencia que tienen las infecciones en las personas inmunosuprimidas en una forma secundaria, avalan la importancia del modelo experimental que se estudia. Inicialmente se comprobó que los animales desgastados presentaban una depresión importante de la síntesis de anticuerpos. Este hallazgo y la observación del timo atrófico sirvieron para caracterizar el síndrome y proponer que, posiblemente, los animales desgastados eran extraordinariamente susceptibles a las infecciones. Actualmente la inmunodeficiencia del animal desgastado se relaciona con los resultados (26) que demuestran una asociación entre la depresión de la inmunocompetencia y la translocalización de las bacterias del intestino.

El modelo estudiado tiene la particularidad de que utiliza el procedimiento más natural (los productos bacterianos) para inducir la inmunosupresión y de que, por esta razón, permite medir más fielmente las alteraciones en las relaciones del hospedador

con su flora de bacterias comensales. Por otra parte, los animales desgastados no se encuentran infectados a priori porque los inóculos intraperitoneales son estériles. Aunque están inmunosuprimidos sistemáticamente, los animales con la enfermedad del desgaste no se pueden comparar con los ratones que reciben radiaciones o quimioterapia, los cuales han sido los procedimientos físico-químicos más agresivos que se utilizan con mayor frecuencia para provocar tanto el desgaste de los animales como la translocalización de las bacterias (23).

2. Inmunopatología del síndrome del desgaste. La mayor parte de la información acumulada sobre las lesiones que se presentaban en el sistema inmunitario fue publicada junto con las primeras descripciones de esta enfermedad experimental y, desgraciadamente, contiene muy poca información respecto a los principales cambios macroscópicos que se observaron entonces (29).

Las lesiones más importantes se encontraron en la médula ósea, en los órganos linfoides primarios o secundarios y en varias glándulas del sistema endócrino (30). Cuando el síndrome del desgaste fue provocado mediante la inducción de una reacción injerto-contra-huésped sistémica (GVH), algunos investigadores (31) observaron que los animales presentaban lesiones importantes en la mucosa del tubo digestivo, las cuales fueron consideradas como un daño indirecto o accidental de la reacción. Pero algunos trabajos más recientes (32) han demostrado que en el curso de las reacciones GVH aumenta la producción de un factor caquetizante o TNF, particularmente cuando los animales se exponen a las

endotoxinas y, además, que la caquectina administrada experimentalmente puede provocar una necrosis intestinal en animales de laboratorio (33). Todas estas observaciones apoyan la idea de que el animal desgastado presenta una profunda alteración de su control inmunológico sobre la flora de bacterias comensales localizadas en el tubo digestivo, cuyos resultados apenas comienzan a ser explorados a un nivel molecular (34).

Un síndrome del desgaste similar al que puede ser inducido mediante la inoculación de productos bacterianos en ratones recién nacidos ha sido observado en una cepa mutante de ratones homocigotos (wast/wast) que, poco tiempo después del nacimiento, desarrollan espontáneamente la mayoría de los síntomas señalados (35). En estos animales también se ha encontrado una disminución significativa de la producción de anticuerpos Ig A de secreción, aunque la concentración de la Ig A sérica se mantiene normal. La deficiencia en la producción de anticuerpos de secreción se acompaña de varias alteraciones microscópicas en la mucosa intestinal y de un deterioro progresivo del sistema nervioso central con síntomas de ataxia (36).

En los ratones homocigotos genéticamente desgastados (wast/wast) se ha encontrado una alteración importante del control sobre la flora bacteriana comensal del intestino. Los microorganismos y sus antígenos pueden pasar libremente a través de la mucosa y, de este modo, los animales pueden desarrollar fácilmente bacteremias por gérmenes oportunistas.

Según algunos autores que se han ocupado extensamente de estudiar las alteraciones del sistema endócrino de los animales desgastados (30), el síndrome consiste en la expresión de una alteración en las interrelaciones que normalmente existen entre los sistemas inmunitario y neuro-endócrino. Por esta razón ha sido tan amplia la patología encontrada. Se ha considerado que el síndrome del desgaste viene a ser un modelo de la interacción anormal entre el timo y las diferentes glándulas del sistema endócrino y que el ataque a la integridad anatómica, el crecimiento, la diferenciación y las funciones del timo constituye un prerequisite básico para que aparezcan las principales manifestaciones de esta enfermedad experimental.

3. La tolerancia inmunológica oral hacia ciertos antígenos es otro fenómeno que también puede ser inducido en una forma experimental pero que difiere completamente del síndrome del desgaste al cual se ha venido haciendo referencia en los párrafos anteriores.

La tolerancia inmunológica se define como la incapacidad del sistema inmunitario de un individuo para responder ante la estimulación de un antígeno específico contra el cual normalmente evocaría una respuesta tanto celular como humoral. La tolerancia inmunológica contra un determinado antígeno implica necesariamente que se conserva normal la capacidad de armar una respuesta inmunológica contra cualquier otro inmunógeno, aunque se trate de una sustancia antigénicamente relacionada con el primero (37).

La falta de una respuesta inmunitaria contra los antígenos propios es un ejemplo claro de una tolerancia natural que se adquiere durante la vida embrionaria de todos los vertebrados. La tolerancia también puede ser inducida en una forma artificial cuando, durante la vida intrauterina, el producto de la gestación se expone a un determinado antígeno extraño que, después del nacimiento, será reconocido como si fuera propio y no podrá estimular una respuesta del sistema inmunitario (38).

La tolerancia inmunológica puede ser inducida experimentalmente mediante diferentes procedimientos. Actualmente se considera que tanto las células T como las B pueden hacerse tolerantes en una forma independiente y por mecanismos diferentes. Esto quiere decir que para producir un estado de tolerancia inmunológica no es necesario que se involucren las dos subpoblaciones de linfocitos. Basta con una cualquiera de ellas dos. Por esta razón es posible que un animal vertebrado desarrolle una tolerancia inmunológica humoral (no produce anticuerpos) contra un determinado antígeno y que, simultáneamente, conserve intacta la capacidad de iniciar una respuesta inmunológica celular (mediada por linfocitos citotóxicos, por ejemplo) contra el mismo inmunógeno. Además se ha observado que los linfocitos T y B tienen una susceptibilidad diferente para hacerse tolerantes. Así por ejemplo, los linfocitos B son particularmente susceptibles a la inducción de la tolerancia cuando son células inmaduras, pero a medida que se van diferenciando resulta cada vez más difícil la inducción del mismo fenómeno. En cambio, la tolerancia inmunológica de los linfocitos T resulta mucho más fácil de

provocar y no se han encontrado diferencias notables para inducirlos en células T que han alcanzado diferentes etapas del desarrollo ontogénico.

Los linfocitos B pueden volverse fácilmente tolerantes hacia los antígenos timo-independientes. Para inducir una tolerancia inmunológica de los linfocitos B hacia antígenos timo-dependientes se necesita suprimir la colaboración de los linfocitos T cooperadores. En los animales de experimentación, la tolerancia puede ser provocada administrando inyecciones repetidas de pequeñas o grandes cantidades de un antígeno.

Desde hace varios años se conoce que, en los ratones, la administración oral de eritrocitos heterólogos da como resultado una buena respuesta de anticuerpos de secreción anti-eritrocitos y una mala respuesta sistémica de anticuerpos séricos cuando los animales vuelven a ser inmunizados con el mismo antígeno por una vía parenteral (39). Lo mismo sucede cuando los ratones son inmunizados con diferentes antígenos de naturaleza proteínica (40). Al contrario, en animales inmunizados subcutáneamente con toxoides, se ha observado que, si posteriormente el mismo toxoide se administra por vía oral, ocurre una supresión de la respuesta de anticuerpos de secreción anti-toxoide en el yeyuno (41). Este último comportamiento inmunológico ha sido considerado como una imagen en espejo de la tolerancia oral. Se ha propuesto que, cuando los antígenos se administran por vía oral, se estimulan células T supresoras que se encuentran en las placas de Peyer de

donde migran hacia el bazo y provocan una supresión sistémica de la respuesta de anticuerpos Ig G e Ig M específicos contra los determinantes absorbidos por la mucosa intestinal (42). En estos casos, simultáneamente ocurre una estimulación de las células T colaboradoras que favorecen la síntesis de Ig A de secreción.

Diferentes condiciones clínicas pueden provocar una pérdida de este mecanismo inmunológico de protección. Así por ejemplo, los pacientes con una inmunodeficiencia selectiva de Ig A de secreción no pueden hacerse tolerantes a los antígenos administrados por vía oral porque no tienen capacidad para controlar el paso de las macromoléculas a través de las mucosas. Los pacientes inmunodeficientes que tienen comprometida la inmunidad de las mucosas presentan con relativa frecuencia manifestaciones clínicas de hipersensibilidad. Al no ser tolerantes a los antígenos administrados por vía oral, ellos pueden formar fácilmente complejos antígeno-anticuerpo solubles y, además, tienen facilitada la aparición de reacciones alérgicas y enfermedades autoinmunes. Algunos inmunólogos (43) han relacionado la incapacidad para desarrollar la tolerancia oral con algún defecto del sistema inmunitario asociado al tubo digestivo.

Una situación similar se puede presentar en los pacientes que tienen amplias lesiones de la mucosa intestinal. Sin embargo, hace dos años, Lamont y sus colaboradores (44 y 45) estudiaron el efecto de la desnutrición experimental sobre la inducción de la tolerancia oral a la albúmina de huevo y sus resultados no apoyan este último punto de vista. Ellos buscaron el efecto de una dieta

hipoproteica sobre las subpoblaciones de células supresoras y sus resultados revelaron que la desnutrición hipoproteica acentúa significativamente el fenómeno de la tolerancia oral. A pesar de la patología intestinal del animal desnutrido, la administración de antígenos por vía oral provocó una mayor actividad de las células T supresoras y una abolición casi absoluta de la respuesta humoral sistémica. Más recientemente, otros autores han investigado los efectos que tiene la microflora gastrointestinal sobre la inducción de la tolerancia (46) mientras otros se han ocupado en caracterizar la cinética de la tolerancia oral a los antígenos proteicos (47), por la importancia de este fenómeno en la patogenia de varias enfermedades.

El fenómeno de la tolerancia oral es un mecanismo fisiológico homeostático que impide la aparición de una serie de enfermedades por hipersensibilidad (formación de complejos antígeno-anticuerpo solubles, por ejemplo) a las proteínas de la dieta (48). Su importancia aparece claramente demostrada por la cantidad de investigaciones sobre el tema que se continúan desarrollando actualmente, como lo mencionamos en el párrafo anterior. Si se comprueba la hipótesis del presente trabajo y se demuestra que los animales desgastados pierden transitoriamente la capacidad de volverse tolerantes a ciertos antígenos administrados por la vía oral, se podrían añadir nuevos renglones a la lista de problemas inmunológicos del animal con ese síndrome y, simultáneamente, contribuir al mejor conocimiento de la inmunopatología de la desnutrición. Conviene aclarar que se ha mencionado varias veces el problema de la competencia inmunológica

del desnutrido porque los animales con el síndrome del desgaste presentan un significativo retraso de su crecimiento y desarrollo. Al final de los experimentos, los ratones desgastados se encuentran desnutridos. Pero la literatura consultada no ha discutido ni ha analizado la influencia que tiene la pérdida de peso sobre los trastornos inmunológicos del síndrome que se estudia.

4. Factores que modulan la tolerancia oral. Existe una larga serie de factores que regulan, modifican o promueven la inducción de la tolerancia inmunológica. Todos estos factores pueden reunirse en dos grupos : 1) las condiciones del hospedero y 2) las propiedades del antígeno.

Las condiciones del hospedero que influyen sobre la inducción de la tolerancia inmunológica están relacionadas con el grado de inmunocompetencia de los animales y el mosaico genético que porta cada uno de ellos, de modo que, según la especie y la cepa de los animales que se estudian se pueden obtener diferentes grados de tolerancia contra diversos antígenos. Mientras más inmaduro sea el hospedero resulta más fácil la inducción de la tolerancia. El ejemplo más conocido es el de los animales que se encuentran en una etapa embrionaria de su desarrollo o que son recién nacidos. Ellos se pueden volver tolerantes mucho más fácilmente que los animales adultos. Pero existe un segundo ejemplo, diferente, representado por aquellos animales o personas con algunas deficiencias selectivas en la síntesis de anticuerpos, particularmente los de secreción. En estos últimos casos sucede lo

contrario, porque se ha podido demostrar que ellos pierden la capacidad de volverse tolerantes a los antígenos administrados por vía oral (43). La inducción de la tolerancia inmunológica oral requiere además que los animales tengan la capacidad de responder a los LPS de las bacterias gram-negativas comensales del intestino (49). En los animales libres de gérmenes, que no pueden presentar el fenómeno de la tolerancia oral, la administración de LPS les proporciona la capacidad de adquirir una tolerancia oral hacia ciertos antígenos (50).

Las propiedades del antígeno que influyen sobre la inducción de la tolerancia inmunológica están relacionadas con la naturaleza química y el peso molecular de los antígenos utilizados, con la dosis aplicada, el tiempo utilizado para la inducción de la tolerancia, la vía de administración del antígeno, la frecuencia con la que se administra, el tiempo que persistan las moléculas dentro del organismo o el tiempo que demore el catabolismo del mismo. En líneas generales, un antígeno timo-dependiente necesita ser administrado varias veces para poder inducir una tolerancia en los linfocitos T, en los linfocitos B del bazo o en los linfocitos B de la médula ósea. Los antígenos que se catabolizan más lentamente y que pueden permanecer acumulados durante mucho tiempo en los tejidos del hospedador resultan los mejores inductores de la tolerancia inmunológica. Las cantidades de antígeno administradas para provocar la tolerancia de los linfocitos B generalmente son 100 ó 1000 veces mayores que las necesarias para inducir el mismo fenómeno con los linfocitos T. Algunos autores han observado que cuando los antígenos son administrados por vía

endovenosa la tolerancia aparece más fácilmente que cuando se utilizan otras vías.

El estado de tolerancia inmunológica suele terminar por uno u otro de los dos siguientes mecanismos : 1) espontáneamente cuando disminuyen hasta cierto límite o desaparecen completamente las cantidades del antígeno que se habían acumulado en los tejidos del hospedero tolerante, y 2) específicamente cuando el animal tolerante es inyectado con algún otro antígeno similar, particularmente si es administrado junto con una substancia adyuvante. Entre los procedimientos utilizados más frecuentemente para anular la tolerancia inmunológica oral se encuentran los tratamientos con ciclofosfamida y la administración de estrógenos que activan el sistema reticuloendotelial.

CAPITULO 3. OBJETIVOS E HIPOTESIS.

A lo largo del capítulo anterior sobre los antecedentes del trabajo se enfatizó varias veces la importancia de los modelos de inmunodeficiencias experimentales en general y también la del modelo del síndrome del desgaste en lo particular como herramientas biológicas para el estudio y la investigación en varias áreas de la Inmunología.

La simple caracterización de la naturaleza de las deficiencias inmunológicas presentes, en una forma congénita o adquirida, en los modelos experimentales conocidos, puede conducir a mejorar el conocimiento sobre las complicaciones o la evolución de situaciones clínicas similares que pueden observarse en las personas. El objetivo de este trabajo forma parte de una línea de investigación dirigida a conocer la inmunocompetencia de los ratones que tienen el síndrome del desgaste. Esta enfermedad fue descrita hace varios años pero ha sido poco estudiada. La mayor parte de las características inmunológicas de los ratones desgastados no han sido exploradas. En lo particular, por la relación del síndrome del desgaste con la situación física e inmunológica del niño desnutrido y por las interacciones que han sido propuestas entre la patogenia de la enfermedad y la

translocalización de bacterias desde el tubo digestivo hacia otros tejidos, en el presente trabajo se propuso el estudio de la influencia que tiene la enfermedad del desgaste sobre la competencia del sistema inmunológico asociado al tubo digestivo.

El trabajo fue diseñado con el propósito de conocer la capacidad que tienen los ratones desgastados para adquirir una tolerancia inmunológica hacia los antígenos administrados por vía oral. La hipótesis propone que el desgaste inmunológico, caracterizado por una deficiente producción de anticuerpos, impide la inducción de la tolerancia inmunológica para los antígenos que son administrados por vía oral durante el lapso que dura la inmunodeficiencia.

CAPITULO 4. MATERIAL

1. Staphylococcus aureus ATCC 6538. Esta cepa fue cultivada en medio BHI, a 37° C, con agitación, durante 18 horas. Las bacterias se lavaron tres veces con solución salina isotónica estéril (SSI) y posteriormente fueron inactivadas por calor, en autoclave a 121° C durante 30 minutos. Los estafilococos se recolectaron por centrifugación y finalmente se ajustaron nefelométricamente a 5×10^{10} bacterias/ml en SSI. La suspensión fue conservada a 4° C hasta el momento de su uso.

2. Ratones. Se utilizaron 170 ratones CDI recién nacidos que fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Química en donde permanecieron durante todo el experimento bajo condiciones convencionales. Cada camada se mantuvo con su correspondiente madre durante las primeras tres semanas de vida y, luego del destete, los animales fueron alimentados ad libitum con Purina y agua.

3. Glóbulos rojos de carnero (GRC). La sangre fue obtenida en condiciones de esterilidad y mezclada con solución anticoagulante de Alsever (ver Apéndice). En el momento de su uso,

Los GRC fueron separados por centrifugación, lavados tres veces con solución salina amortiguada de Hanks (SSA) y resuspendidos en la misma solución hasta ajustar su concentración a la cantidad requerida.

4. Complemento. Se utilizó suero fresco de cobayo como fuente de complemento, el cual fue conservado a -20° C hasta el momento de su uso.

CAPITULO 5. TECNICAS

1. Inducción del síndrome del desgaste. La enfermedad experimental fue provocada en ratones recién nacidos. Los animales seleccionados tenían menos de dos horas de edad cuando comenzaron a recibir intraperitonealmente 0.1 ml de la suspensión de estafilococos muertos. Esta dosis se repitió cada tres días durante cuatro semanas, como una modificación al esquema propuesto inicialmente por Ekstedt (51).

2. Inducción de la tolerancia inmunológica oral. De acuerdo a procedimientos que han sido probados previamente por otros autores (52), se preparó una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 50% en solución de Hanks. Un volumen constante de 0.25 ml fue administrado por vía oral diariamente, durante dos semanas, a los animales que habían sido seleccionados para inducirles una tolerancia a los eritrocitos. La suspensión fue colocada directamente en el estómago de los ratones utilizando un catéter delgado y flexible de polietileno, que había sido unido a una jeringa de 1 ml. El mismo procedimiento sirvió para administrar diariamente un volumen igual de solución de Hanks a los grupos de ratones control.

3. Inmunización de los animales. Al final de los experimentos, todos los ratones fueron inmunizados intraperitonealmente con una sola dosis de una suspensión de GRC al 15 por ciento en solución de Hanks.

4. Cuenta de células formadoras de anticuerpos. Cinco días después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a la extracción del bazo de cada uno de ellos para preparar las respectivas suspensiones de células esplénicas que sirvieron para contar las cantidades de linfocitos que formaban anticuerpos anti-GRC. El procedimiento utilizado fue la modificación de Cunningham (53) a la técnica propuesta inicialmente por Jerne (54). Brevemente, los linfocitos del bazo fueron suspendidos en solución de Hanks fría y ajustados a 5×10^6 células viables / ml. Posteriormente se mezclaron 400 μ l de la suspensión celular ajustada más 400 μ l de suero fresco de cobayo, adsorbido con GRC y diluido 1:10 en solución de Hanks, más 200 μ l de una suspensión de GRC al 8 % en solución de Hanks. Con esta mezcla se llenaron las cámaras (aproximadamente 200 μ l para cada una) que, luego de sellarlas con parafina, fueron incubadas durante una hora a 37° C. Con un microscopio se contó el número de linfocitos que formaban halos de hemólisis a su alrededor y esta cifra se ajustó como la cantidad de linfocitos formadores de placas hemolíticas/millón de células esplénicas, tomando en cuenta que cada 200 μ l de la mezcla contenían 0.4×10^6 células esplénicas.

CAPITULO 6. METODOLOGIA.

1. Diseño del experimento. De acuerdo a los objetivos del trabajo se propusieron dos experimentos sucesivos. El primero para estudiar el tiempo que tardaban los ratones con el síndrome del desgaste en recuperar una inmunocompetencia similar a la de los animales sanos. El segundo, para conocer si los animales inmunológicamente desgastados tenían disminuida o no su capacidad para hacerse tolerantes a los antígenos administrados por vía oral.

2. Estudio sobre la recuperación inmunológica de los ratones con el síndrome del desgaste. Este primer experimento fue diseñado para conocer el tiempo que duraba la depresión de la síntesis de anticuerpos en los animales desgastados. Con este fin se utilizaron 60 ratones CD1 recién nacidos. A las cuatro semanas de edad, cuando se terminaron de aplicar las inyecciones de estafilococos por vía intraperitoneal, se procedió a separar los animales en cinco grupos. Los ratones desgastados fueron entonces inmunizados intraperitonealmente con GRC de acuerdo a la técnica descrita en el capítulo anterior. Las fechas de las inmunizaciones para los animales de cada grupo fueron seleccionadas arbitrariamente a los 3, 9, 15, 21 y 27 días después de haber

terminado el esquema de las inyecciones con la suspensión de estafilococos. Posteriormente, cinco días después de inyectar los eritrocitos, los animales fueron sacrificados para obtener una suspensión de células del bazo y proceder a contar el número de linfocitos que formaban anticuerpos contra los GRC. Para evaluar esta respuesta se utilizaron dos grupos de ratones control que fueron inyectados intraperitonealmente con solución salina isotónica estéril o que no recibieron ningún inóculo.

3. Estudio sobre la influencia del síndrome del desgaste en la inducción de la tolerancia inmunológica oral. Para realizar este segundo experimento se utilizaron 110 ratones CD1 que fueron divididos en tres grupos (I, II y III) desde el momento de su nacimiento. En una primera etapa que duró cuatro semanas, los ratones de cada grupo fueron sometidos a diferentes condiciones experimentales. Los animales del grupo I fueron inyectados intraperitonealmente con la suspensión de estafilococos, para que desarrollaran el síndrome del desgaste inmunológico. Los animales del grupo II fueron inyectados con el mismo volumen de SSI estéril por vía intraperitoneal, con el propósito de tener un grupo control en el cual era simulado el procedimiento de la inducción del síndrome del desgaste. Finalmente, los ratones del grupo III no recibieron ninguna inyección y, durante esta primera etapa del experimento, fueron considerados como animales sanos.

El estudio sobre la influencia del síndrome del desgaste en la inducción de la tolerancia inmunológica oral fue continuado con una segunda etapa que comenzó inmediatamente después de la

primera y que se prolongó dos semanas. Con el propósito de hacerlos tolerantes a los GRC, los animales de cada grupo fueron separados en tres subgrupos denominados A, B y C. Los ratones de los tres subgrupos A (I-A, II-A y III-A) recibieron por vía oral una suspensión de GRC de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo anterior. Los animales de los tres subgrupos B (I-B, II-B y III-B) fueron utilizados para simular la inducción de la tolerancia inmunológica oral y, en lugar de la suspensión de eritrocitos, solo recibieron diariamente por vía oral el mismo volumen de solución Hanks. Los animales de los tres subgrupos C (I-C, II-C y III-C) no recibieron ningún tratamiento durante esta segunda etapa del experimento.

A continuación se presenta una lista de los nueve subgrupos experimentales de ratones CDI, de los tratamientos intraperitoneales que recibieron durante su primer mes de vida y de los inóculos que se les administraron por vía oral antes de inmunizarlos con eritrocitos.

| grupo | tratamiento por vía intraperitoneal | inoculaciones por vía oral | inmunización con eritrocitos |
|---------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| I - A | estafilococos | GRC | + |
| I - B | estafilococos | Hanks | + |
| I - C | estafilococos | - | + |
| II - A | SSI | GRC | + |
| II - B | SSI | Hanks | + |
| II - C | SSI | - | + |
| III - A | - | GRC | + |
| III - B | - | Hanks | + |
| III - C | - | - | + |

El estudio sobre los efectos del síndrome del desgaste en la inducción de la tolerancia inmunológica oral continuó con la inmunización de los animales, la cual se realizó una semana después de terminar el esquema de inoculaciones por vía oral. Todos los ratones de los nueve subgrupos fueron inmunizados intraperitonealmente según la técnica descrita en el capítulo anterior y, cinco días más tarde, fueron sacrificados para medir la respuesta de anticuerpos anti-GRC.

4. Análisis estadístico de los resultados. El grado de significancia estadística de las diferencias obtenidas entre los nueve grupos de ratones estudiados fue calculado mediante una prueba de varianza (SS), utilizando como punto de corte un valor de $F = 0.01$.

1. Crecimiento y desarrollo de los ratones. Los animales que recibieron durante un mes las inyecciones intraperitoneales de estafilococos (grupo I), crecieron a una tasa más lenta que los animales de los dos grupos restantes (II y III) que solo habían sido inyectados con SSI o que no recibieron tratamiento. En la Figura 1 se pueden observar estas diferencias. A los 30 días de edad, los ratones desgastados tenían un peso promedio de 13.7 g y habían dejado de ganar un 40 % del peso que, para esa misma edad, habían alcanzado los animales normales (20.5 y 22.2 g). Desde un punto de vista experimental, estos ratones se encontraban desnutridos. Además de su bajo peso, los ratones estaban irritables, era evidente que no tenían buen apetito y presentaban una debilidad general manifiesta, casi todos ellos tenían el pelo erizado y sus movimientos eran lentos y mal coordinados. El índice de mortalidad fue de 25 % , pero los animales que murieron durante esta primera parte del experimento no fueron considerados como formas graves del síndrome, ya que la mayor parte de las muertes se debieron al canibalismo de las madres y, además, a defectos en la técnica de las inoculaciones intraperitoneales. Según las curvas de crecimiento y desarrollo de los animales, así como también según los síntomas que presentaron, los resultados indican que los ratones inyectados con estafilococos estaban

desnutridos.

2. Cinética de la respuesta de anticuerpos del animal desgastado. En la Tabla 1 y en la Figura 2 se presentan las cantidades de células formadoras de anticuerpos anti-eritrocitos que se encontraron en cada uno de los cinco grupos de ratones CDI desgastados que fueron incluidos en el primer experimento. Estos animales fueron inmunizados con GRC después de terminar el esquema de inyecciones intraperitoneales con la suspensión de estafilococos. Ninguno de estos ratones fue utilizado para el ensayo sobre la inducción de la tolerancia inmunológica oral.

Los resultados de este primer estudio revelaron que el síndrome del desgaste provocaba una depresión transitoria de la producción de anticuerpos anti-eritrocitos. Los ratones inmunizados 3 días después de terminar las inyecciones de estafilococos solo tenían $22.1 \text{ CFA} / 10^6$, mientras que los animales inmunizados a los 9 días de terminar la inducción del desgaste dieron un valor promedio de $181.6 \text{ CFA} / 10^6$. Esta inmunosupresión se mantuvo durante poco tiempo, ya que, 15 días después de inducir el desgaste, los ratones habían aumentado significativamente su producción de anticuerpos hasta alcanzar cantidades ($776.8 \text{ CFA} / 10^6$) que eran superiores a las encontradas en la población de animales normales. Tres semanas después de haber concluido la inducción del síndrome del desgaste, los ratones mantenían elevada su producción de anticuerpos ($574.2 \text{ CFA} / 10^6$) y solo recuperaron su inmunocompetencia habitual una semana más tarde ($324.3 \text{ CFA} / 10^6$). Al final del experimento, cuatro semanas después de haber inducido el desgaste, los animales

problema tenían las mismas cantidades de células formadoras de anticuerpos que los ratones sanos del grupo control.

En este experimento no se estudió la forma como se instalaba la depresión en la síntesis de anticuerpos a medida que se repetían las inyecciones de estafilococos. Los resultados solo revelan que la respuesta de anticuerpos anti-GRC se encuentra totalmente suprimida durante unos pocos días. Los animales se recuperan rápidamente, en una forma distinta a como sucedería si tuvieran que reponer un tejido linfoide dañado y, además, presentan un fenómeno de "rebote" ya que, durante un corto lapso, elevan al doble de lo normal su número de linfocitos esplénicos formadores de placas hemolíticas.

3. Efecto del síndrome del desgaste sobre la inducción de la tolerancia inmunológica oral. En este segundo experimento se encontraron notables diferencias en la respuesta de anticuerpos anti-eritrocitos entre los nueve grupos de ratones que recibieron distintos inóculos por vía oral. En las Tablas 2, 3 y 4 se presentan los resultados, separados según el diferente tratamiento intraperitoneal que se les había aplicado a los animales durante su primer mes de vida. Todos los animales de este segundo experimento fueron inmunizados 21 días después de terminar las inyecciones intraperitoneales de estafilococos y, de acuerdo a los resultados del primer experimento, se debían encontrar en la etapa final del "rebote" mencionado en el párrafo anterior.

En los ratones desgastados del grupo problema I-A, inyectados intraperitonealmente con estafilococos y posteriormente inoculados con GRC por vía oral, se observó que aparentemente no hubo una inducción de la tolerancia inmunológica. Estos animales desgastados no disminuyeron las cantidades de células formadoras de anticuerpos anti-eritrocitos (240.3 CFA / 10^6) como lo hicieron los ratones de los grupos control II-A y III-A que recibieron GRC por vía oral aunque no fueron inyectados con estafilococos (104.8 y 93.8 CFA / 10^6). Las diferencias mencionadas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$). No obstante, el valor promedio de células formadoras de anticuerpos en los ratones del grupo I-A resultó inferior al que se obtuvo en los animales normales de los grupos control III-B y III-C (310.3 y 327.3 CFA / 10^6), pero, en este caso, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.01$).

Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 3, si los ratones desgastados que recibieron GRC por vía oral (grupo problema I-A) se comparan con los otros ratones desgastados a los cuales no se les indujo la tolerancia inmunológica (grupos control I-B y I-C), entonces resulta que los primeros sí deprimieron significativamente ($p < 0.01$) su respuesta de anticuerpos. Para poder interpretar correctamente estos resultados, conviene tener en cuenta que sobre los animales del grupo I-A actuaron dos fenómenos inmunológicos diferentes que fueron provocados en una forma sucesiva. Uno, la inducción de la tolerancia cuando los ratones se encontraban desgastados y, otro, la estimulación antigénica con GRC cuando los animales ya habían recuperado su

capacidad para producir anticuerpos. La inducción de la tolerancia disminuyó significativamente la capacidad de los ratones normales para responder contra los eritrocitos, tal como era de esperarse. Pero en los ratones desgastados no hubo una disminución significativa ($p > 0.01$) en la respuesta de anticuerpos. En cambio, la inyección intraperitoneal de los eritrocitos, llevada a cabo después de la inducción de la tolerancia, no estimuló la producción de anticuerpos anti-GRC en los ratones normales, pero sí aumentó significativamente la respuesta en los animales desgastados.

Los ratones de los grupos control positivos (II-A y III-A), que no habían sido inyectados con estafilococos, sí se hicieron tolerantes después de la administración oral de los GRC porque redujeron significativamente ($p < 0.01$) la respuesta de anticuerpos anti-eritrocitos (104.8 y 93.8 CFA / 10^6) en relación a los animales normales de los grupos control III-B y III-C. Los promedios de CFA de los ratones que sí se hicieron tolerantes resultaron significativamente inferiores ($p < 0.01$) al de los ratones problema del grupo I-A.

En otros dos grupos control de ratones (II-B y II-C) que fueron inyectados intraperitonealmente con SSI, para simular el tratamiento con los estafilococos, los resultados revelaron una respuesta de anticuerpos anti-eritrocitos similar a la de los ratones normales, lo cual era esperado porque no se les había administrado la suspensión de GRC por vía oral.

Finalmente, los ratones de los grupos I-B y I-C, que se encontraban en la etapa de la recuperación del síndrome del desgaste cuando fueron inmunizados con GRC, respondieron con un aumento considerable de la producción de anticuerpos (542.6 y 574.2 CFA / 10^6), en la misma forma que los animales del primer experimento. A ninguno de estos ratones se les administraron GRC por vía oral.

CAPITULO 8. DISCUSION

Los ratones recién nacidos a los cuales se les provocó la enfermedad del desgaste mediante la inyección intraperitoneal de una suspensión de estafilococos muertos, presentaron alteraciones significativas de los mecanismos inmunológicos que controlan la producción de anticuerpos. Mientras estuvo presente, la enfermedad experimental disminuyó la cantidad de linfocitos esplénicos que formaban placas hemolíticas (CFP) después de una inmunización intraperitoneal con GRC y, además, provocó una pérdida de la tolerancia oral en otro grupo de ratones desgastados que fueron alimentados con una suspensión de eritrocitos antes de la inmunización intraperitoneal con GRC. Aparte de estas dos alteraciones inmunológicas, los ratones desgastados también presentaron un retraso importante en su desarrollo, de tal modo que al final del experimento pesaban 40 por ciento menos que los animales sanos del grupo control. Los otros resultados del presente trabajo permitieron conocer el tiempo que se mantuvo deprimida la respuesta de anticuerpos después de terminar la inducción del síndrome y la forma, de "rebote", por la cual los animales recuperaron una inmunocompetencia normal para su edad.

La pérdida de peso fue atribuida a la anorexia que presentaron los animales desgastados, los cuales disminuyeron la ingesta del alimento que siempre les fue proporcionado ad libitum. A medida que se prolongaba la serie de inyecciones con la suspensión de estafilococos se observó que se acentuaban los signos y síntomas del desgaste, entre los cuales se destacaron el aletargamiento, la indiferencia ante los estímulos leves y una pérdida del apetito. Hasta el momento del destete, todas estas manifestaciones se presentaron en una forma atenuada, probablemente por la cercanía de la madre que representaba una fuente de alimentos fácilmente alcanzable. La Figura 1 muestra como, durante las tres primeras semanas de la vida, el progreso en peso de los animales problema y de sus controles se encuentra representado por dos líneas casi paralelas que están poco separadas entre si. Pero una vez destetados los ratones, se puede observar como se acentúan bruscamente las diferencias entre los dos grupos de animales. La línea que señala el progreso del peso de los animales desgastados prácticamente continúa con la misma pendiente, mientras que la línea que marca los promedios de los pesos de los animales sanos muestra claramente que el inicio de la alimentación con Purina provocó un aumento en la tasa de crecimiento y una modificación importante en la pendiente de la línea. Diez días después del destete ya existía una franca diferencia entre los pesos promedio de los ratones desgastados y los de sus controles sanos.

Teóricamente, la pérdida de peso pudo estar influida por otros factores. Por ejemplo, la activación de los macrófagos peritoneales por los productos de los estafilococos pudo haber estimulado la liberación de interleucina-1 y caquetina durante un lapso prolongado. Sin embargo, el diseño experimental del presente trabajo no estuvo dirigido al estudio de la síntesis de estas citocinas y, por otra parte, los resultados obtenidos no revelan ninguna información en este sentido.

De todos modos, fue evidente que los animales inyectados con estafilococos disminuyeron su ingesta de alimentos y que, como una consecuencia, al final de las inoculaciones presentaban un franco cuadro clínico de desnutrición avanzada.

Como la desnutrición provoca una inmunodeficiencia secundaria que ha sido reconocida y estudiada extensamente (56), fue necesario considerar la posibilidad de que los animales desgastados se encontraran inmunodeficientes por su desnutrición y no por las inyecciones intraperitoneales de estafilococos (6). Por otra parte, fue necesario tomar en cuenta la influencia del stress sobre la alimentación y el grado de desnutrición (57), aunque el uso de ratones control inyectados con solución salina estéril permitió comprobar que los efectos de este último factor no fueron significativos.

La mayoría de los trabajos revisados revelaron que la desnutrición provoca una atrofia importante del timo de niños y animales de experimentación (58), la cual resulta similar a la que ha sido encontrada en los animales desgastados (59). Sin embargo, mientras la desnutrición compromete las principales funciones de los linfocitos T, el síndrome del desgaste no parece alterar la reactividad de esta subpoblación de linfocitos. Ekstedt y colaboradores (51) no encontraron modificado el tiempo que demora el rechazo de aloinjertos practicados en ratones desgastados y García-Tamayo y colaboradores (60) tampoco encontraron que los linfocitos esplénicos de los ratones desgastados tuvieran alterada su capacidad para inducir una reacción GvH en los ganglios poplíteos de ratones híbridos F1. En cambio, Jose y Good (61) si observaron que los animales desnutridos tenían disminuida su capacidad para rechazar los injertos de tumores heterogénicos y Lastra y colaboradores (62) comprobaron que los linfocitos de los ratones desnutridos también tenían disminuida su efectividad como inductores de reacciones GvH sistémicas. En líneas generales, se puede encontrar una abundante literatura (63, 64, 65 y 66) que confirma el deterioro de las funciones de los linfocitos T a causa de la desnutrición. No obstante, conviene señalar que el uso experimental de ciertas dietas administradas durante largo tiempo, para provocar una privación crónica en la ingesta de proteínas, ha permitido obtener modelos de animales desnutridos que tienen aumentada la respuesta de los linfocitos T (67). Del mismo modo, existen trabajos que claman sobre los beneficios de la anorexia como un mecanismo defensivo que limita las infecciones de los desnutridos (68). Sin embargo, estos últimos resultados

experimentales se apartan completamente del consenso alcanzado al estudiar el compromiso inmunológico de múltiples poblaciones de niños desnutridos, bien sea marasmáticos o con el cuadro clínico del kwashiorkor (69).

Al revisar los trabajos publicados sobre la respuesta de los linfocitos B, nuevamente se encontraron resultados contrastantes entre los animales desgastados por los estafilococos y desnutridos con una dieta deficiente en proteínas. En los dos casos los animales presentaban una importante pérdida de peso. Pero mientras la enfermedad del desgaste causaba una depresión de la respuesta de anticuerpos anti-eritrocitos (6 y 51), la alimentación deficiente en proteínas por lo general aumentaba los niveles séricos de las inmunoglobulinas (70 y 71) y elevaba los títulos de anticuerpos formados después de la inmunización con un antígeno específico (72 y 73). Resultados similares han sido obtenidos in vitro (74). La excepción a este hecho son los niños o animales de laboratorio que tienen una desnutrición exagerada o un cuadro de caquexia terminal (75). Sin embargo, se han encontrado algunas publicaciones que refieren los casos de animales desnutridos con una tendencia a disminuir la síntesis de inmunoglobulinas (76), aunque sin alcanzar la magnitud de la depresión observada en los animales desgastados.

En la literatura revisada también se encontraron referencias sobre un modelo experimental de animales genéticamente desgastados (wast/wast) que tienen manifestaciones neurológicas de

ataxia y una deficiencia en la producción de Ig A de secreción, aún cuando conservan normales los niveles séricos de Ig A, así como los de Ig G e Ig M (36). Estos ratones tienen una pérdida de peso muy importante, probablemente a causa de que no ingieren una suficiente cantidad de alimentos, porque su enfermedad evoluciona con un debilitamiento general y dificultad para coordinar los movimientos. Al hacer un estudio sobre su enfermedad (35) los autores tuvieron que plantear un problema similar porque han investigado si la deficiencia selectiva de Ig A de secreción se presentaba como una consecuencia de la desnutrición o por un defecto genético que también involucraba el desarrollo del sistema inmunitario. Los experimentos realizados sobre los ratones wast/wast revelaron que la disminución en la producción de anticuerpos de secreción no estaba causada por la desnutrición (35). Los estudios inmunocitoquímicos mostraron que la lámina propia del intestino de los ratones homocigotos casi no contenía células plasmáticas productoras de Ig A, lo cual no se observaba en los animales control, desnutridos y heterocigotos. En los dos grupos de animales la desnutrición comenzaba a los 21 días de edad, en el momento del destete, lo mismo que en los ratones del presente trabajo que fueron desgastados por inyecciones de estafilococos. Existen varias publicaciones que refieren los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la mala alimentación sobre la aparición de las células productoras de Ig A en el intestino (77). Los resultados de estos trabajos muestran que una alimentación hipo-proteica e hipo-calórica provoca una disminución del peso corporal y también del peso de la mucosa intestinal, pero no modifica la población de células plasmáticas productoras de Ig A de secreción, salvo en aquellos casos en los cuales la inducción

de la desnutrición se prolonga demasiado y se extiende desde el momento del nacimiento hasta cierto tiempo después del destete. Como ya fue discutido al comentar la Figura 1 del presente trabajo, la pérdida de peso de los ratones desgastados por las inyecciones de estafilococos solamente se manifestó francamente a partir del momento del destete.

De acuerdo a todos los comentarios anteriores más los resultados del presente trabajo, se puede afirmar que las alteraciones inmunológicas del animal desnutrido no son completamente iguales a las del animal desgastado, aunque los dos se encuentren inmunocomprometidos. Una observación más en favor de esta diferencia se encuentra en el tejido esplénico. El bazo de los animales desnutridos es pequeño, mientras el de los animales desgastados está aumentado de tamaño y presenta cambios en su color y consistencia.

Otro aspecto de la enfermedad del desgaste que debe ser discutida, porque tiene relación con los resultados obtenidos, se refiere a la controversia que existe acerca de los mecanismos responsables de la sintomatología y de las alteraciones inmunológicas. Inicialmente (78) estas enfermedades fueron conocidas como síndromes de encanijamiento (runting, en inglés) cuando se presentaban en animales recién nacidos a causa de una timectomía o por una reacción GVH provocada mediante un trasplante de linfocitos alogénicos. El encanijamiento implicaba un retardo en el crecimiento y una emaciación de los animales

jóvenes. En cambio, el término desgaste (wasting, en inglés) se reservó para cualquier otra situación en la cual los animales, adultos, experimentaban una pérdida de peso sin retrasar su crecimiento. En estas fechas, al comienzo de la década de los años 60, la discusión sobre los mecanismos involucrados en el daño tisular de los animales encanijados condujo al planteamiento de una serie de hipótesis que relacionaban la enfermedad con infecciones adquiridas en el momento del trasplante o con la susceptibilidad a las endotoxinas derivadas de los microorganismos comensales del tubo digestivo (79). Hubo entonces algunos autores (80) que propusieron varias similitudes entre el cuadro clínico de los ratones recién nacidos timentomizados y el de los que desarrollaban una reacción GvH después de un injerto de linfocitos. En estos dos casos los animales eran desnutridos e inmunodeficientes.

Varios años más tarde se publicaron los trabajos de Ekstedt (6) sobre la inducción de un síndrome similar al encanijamiento (runting-like, en inglés) utilizando productos bacterianos estériles que eran inyectados intraperitonealmente en ratones recién nacidos. El desarrollo tecnológico de esa década permitió obtener animales que nacían y se desarrollaban en condiciones axénicas o libres-de-gérmenes. Estos modelos de animales de laboratorio estériles fueron utilizados para confirmar las hipótesis propuestas anteriormente. Los resultados revelaron que los animales libres-de-gérmenes no presentaban el cuadro clínico de la enfermedad del encanijamiento (21). Las consecuencias desgastantes de la timentomía neonatal también pudieron ser

suprimidas mediante la administración de antibióticos (51) y los mismos resultados se obtuvieron cuando los animales desgastados recibieron un tratamiento antimicrobiano (17). De este modo se pudo establecer un nexo más estrecho entre el desgaste físico de los animales y la invasividad oportunista de los microorganismos comensales del tubo digestivo. Jutila (20) y Keast (19) revisaron la literatura publicada sobre el particular y emitieron opiniones en favor de que las enfermedades desgastantes tenían una etiología de naturaleza bacteriana. Posteriormente se conoció el fenómeno de la translocalización bacteriana (22) y una larga serie de estudios trataron de confirmar que las bacterias translocalizadas eran las responsables de las principales complicaciones en los animales con la inmunidad comprometida (23), con una desnutrición complicada (81), con tumores (82), etc. Actualmente, el problema de la translocalización bacteriana continúa estimulando numerosas investigaciones que tratan de aclarar los mecanismos responsables de que las bacterias comensales se desplacen desde el intestino hasta los ganglios linfáticos mesentericos y otros órganos de la cavidad abdominal (24 y 25).

A un lado de los trabajos mencionados anteriormente se encuentran aquellos otros que estudian los mecanismos moleculares que relacionan las endotoxinas con la respuesta del sistema inmunitario. Aparte de su efecto adyuvante y/o supresor sobre diferentes subpoblaciones de células, las endotoxinas alteran la expresión de las moléculas HLA sobre la membrana de los macrófagos (83) e inducen la liberación de interferón (84) que tiene la propiedad de aumentar la expresión de los antígenos de

histocompatibilidad en diversos tejidos. En otros casos, las endotoxinas han probado ser inhibidoras de la expresión de las moléculas HLA (85). Jephthah-Ochola y colaboradores (86) señalaron recientemente que la modulación de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad puede ser una consecuencia significativa de las relaciones normales entre el hospedero y su flora comensal. Asimismo, ellos propusieron que la calidad de la respuesta inmunológica del hospedero contra los agentes patógenos y la patogenia de varias enfermedades inmunológicas inducidas por las infecciones podían depender de todas estas estimulaciones que aumentaban la expresión de las moléculas HLA.

En el presente trabajo la enfermedad del desgaste fue provocada por la inoculación intraperitoneal de estafilococos muertos. Posteriormente los animales fueron inmunizados con una suspensión de GRC. Los resultados revelaron una depresión de la respuesta de anticuerpos. Desde un punto de vista teórico, este abatimiento de la respuesta inmunitaria humoral de los animales desgastados puede ser explicado por varios mecanismos.

1) En primer lugar, es posible que ocurriera una competencia antigénica entre los estafilococos y los GRC, similar a la encontrada por Radovich y Talmage (87) cuando, con cuatro días de intervalo, utilizaron eritrocitos de caballo y de carnero para inmunizar un grupo de ratones. La disminución de la respuesta de anticuerpos contra los antígenos del segundo inmunógeno ha sido explicada mediante la proposición de varias teorías (88). Sin embargo, en el caso de los ratones desgastados, la competencia

antigénica no permite explicar todo el conjunto de síntomas y signos que han sido encontrados en los animales experimentales.

2) Otra posibilidad es que los estafilococos inyectados durante cuatro semanas hayan saturado la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales y, por consiguiente, hayan anulado sus funciones como células presentadoras de antígenos en una forma similar al bloqueo obtenido después de inyectar carbón o partículas inertes de látex o sílica (89). De todos modos conviene tener presente que las partículas mencionadas representan un material inerte no degradable enzimáticamente en los fagolisosomas de los macrófagos, mientras que las bacterias muertas sí pueden ser eliminadas en una forma relativamente fácil. Por otra parte, también se deben tener en cuenta los experimentos que logran facilitar la respuesta de anticuerpos mediante la inyección de varias suspensiones de bacterias (90) o de sus productos (91).

3) Algunos productos bacterianos han probado ser estimulantes de la actividad de los linfocitos T supresores (92). En otros casos se ha comprobado que la fagocitosis de ciertos parásitos bloquea la capacidad de los macrófagos para liberar interleucina-1 y anula la estimulación de las células T colaboradoras necesarias para una buena respuesta de anticuerpos (93). Es evidente que existen diversos factores, bacterianos o no, que pueden trastornar la modulación de la respuesta inmunitaria o provocar una depresión transitoria en la síntesis de anticuerpos.

Ninguna de estas posibilidades fue explorada en el curso del presente trabajo porque su estudio no formaba parte de los objetivos. Sin embargo, a todo lo largo de los diferentes experimentos se tuvo presente que cualquiera de ellas podía suprimir transitoriamente la respuesta de anticuerpos, tal y como fue observado en el grupo de ratones desgastados. Conviene tener presente que, hasta ahora, todavía no se han aclarado las bases moleculares de los mecanismos que participan en la inducción del desgaste, de la misma manera que tampoco se conocen completamente los mecanismos responsables de la translocalización bacteriana. Actualmente se realizan diversas investigaciones sobre la participación del sistema inmunológico en estos dos fenómenos que son importantes tanto por el carácter inevitable de las interacciones del hospedero con su flora bacteriana comensal (14), como por el riesgo de las inmunodeficiencias secundarias a infecciones (4). Con el presente trabajo se espera contribuir al mejor conocimiento de la patología inmunológica asociada a las interacciones mencionadas.

La recuperación de la capacidad para producir anticuerpos en los animales desgastados reveló que, quince días después de haber terminado el período de las inyecciones intraperitoneales, los ratones presentaban un brusco aumento de su respuesta de anticuerpos anti-eritrocitos. En ese momento que representaba la recuperación del desgaste inmunológico, los animales duplicaron la cantidad de CFA que se podía encontrar en un ratón sano de la misma edad que había sido inmunizado con la misma dosis de GRC. Más adelante, 27 días después de terminar las inyecciones de

estafilococos, los ratones presentaban una normalización de su respuesta inmunológica. Los estudios realizados por otros autores (94) que han estudiado la recuperación de los desnutridos varios días después de realimentarlos adecuadamente, han revelado una rápida capacidad de recuperación inmunológica. Sin embargo, los autores mencionados (94) y otros más que también han estudiado el síndrome de la recuperación inmunológica (95), solo han encontrado un regreso a la normalidad que en algunos casos se demora más de cuatro semanas. El "rebote" de la síntesis de inmunoglobulinas en los ratones desgastados es un fenómeno sugestivo de que los animales conservaron intacta su población de células B y, probablemente, de que hubo una activación de los mecanismos que colaboran en la diferenciación de las células que producen los anticuerpos. Estos hechos podrían ser interpretados en favor de que el sistema inmunitario puede compensar, aunque sea tardíamente, la depresión transitoria de algunas de sus funciones, siempre y cuando la supresión haya sido aguda y de corta duración.

En los ratones desgastados que ya estaban desnutridos y que tenían anulada la respuesta anti-eritrocitos, la administración de GRC por vía oral no pudo inducir un estado de tolerancia comparable al que se obtuvo en los ratones sanos del grupo control. Este resultado es difícil de explicar porque no se conocen todos los mecanismos que intervienen en la inducción de la tolerancia inmunológica oral ni toda la patología del sistema inmunitario asociado al tubo digestivo del animal desnutrido y/o desgastado. Anteriormente se mencionó que una cepa de ratones mutantes desgastados (wast/wast) no producían anticuerpos Ig A de

secreción porque no tenían el número suficiente de células plasmáticas en la mucosa intestinal. Sin embargo, esta condición inmunológica del animal mutante no puede ser extrapolada a otros modelos experimentales de animales a los cuales se les induce la enfermedad del desgaste. Por lo tanto no se puede suponer que los animales del presente estudio tampoco producían Ig A de secreción a nivel del tubo digestivo. Pero, si se puede mencionar que existe una gran cantidad de evidencias en favor de que la desnutrición deprime la producción de anticuerpos de secreción (96 y 97).

En los niños desnutridos se ha encontrado una deficiente producción de anticuerpos de secreción en el intestino. Este trastorno inmunológico generalmente se acompaña de un aumento en la permeabilidad de la mucosa, la cual se agrava por las lesiones secundarias a una dieta deficiente en nutrientes (98). Al combinarse estos dos problemas se facilitan las infecciones (99) y la absorción de algunas macromoléculas antigénicas de la dieta (98). Como una consecuencia de este último evento aparecen o aumentan los anticuerpos séricos contra los antígenos de los alimentos (100). Estos hallazgos están a favor de que el desnutrido pierde una parte de su capacidad para volverse tolerante a los antígenos que entran al organismo por la vía oral.

El tubo digestivo lesionado del desnutrido propicia, además, la aparición de otra complicación cuyos mecanismos inmunológicos no han sido aclarados completamente. Teóricamente, por tratarse de un inmunodeficiente que tiene una elevada incidencia de infecciones por bacterias gram-negativas (101), el desnutrido

debería ser un candidato ideal para expresar los fenómenos de translocalización bacteriana que han sido demostrados en otros casos con el sistema inmunitario comprometido (22 y 23). No obstante, los trabajos realizados hasta ahora muestran que la desnutrición por si sola no facilita la translocalización de las enterobacterias (81), a no ser que se acompañe de una endotoxemia provocada por factores ajenos a la pérdida de peso. El resultado anterior debe ser aceptado con cautela y esos experimentos deben ser repetidos bajo diferentes condiciones, porque ya otros autores (102) habían referido que aproximadamente la mitad de un grupo de niños desnutridos contenían endotoxinas circulantes que pudieron ser demostradas por la prueba del Limulus.

Para aumentar la complejidad de la inmunidad intestinal, se pueden mencionar los trabajos de Chandra (103) quien ha demostrado como, ante la mayor permeabilidad del intestino del desnutrido que deja pasar macromoléculas antigénicas a través de la mucosa (98), el sistema inmunitario responde aumentando su cantidad y/o actividad de linfocitos T supresores con la finalidad de evitar la formación de complejos solubles y la posibilidad de más lesiones tisulares por mecanismos de hipersensibilidad tipo III. El aumento de anticuerpos contra los antígenos de la dieta (100) solo parece indicar que sin la mayor actividad de las células supresoras (103) el desnutrido elevaría muchísimo más su respuesta humoral contra los determinantes de las proteínas de la dieta. La supresión de la respuesta de los linfocitos esplénicos contra los antígenos absorbidos por la mucosa intestinal (104) parecería un complemento natural a la deficiencia primaria de anticuerpos de secreción

sobre la mucosa del tubo digestivo (99), aunque en uno y otro caso actúen dos mecanismos diferentes para reducir a) la respuesta secretora y b) la respuesta sistémica. Los resultados de Suzuki y colaboradores (105) parecen aclarar un poco más esta compleja situación porque proponen la participación de una nueva subpoblación de linfocitos, los contrasupresores, para modular la inmunidad del tubo digestivo. Mientras los linfocitos T supresores que aparecen en las placas de Peyer se desplazan hacia el bazo y otros tejidos periféricos (42), los linfocitos T contrasupresores, que también aparecen en las placas de Peyer, se quedarían a nivel del intestino y ayudarían a las células plasmáticas de la mucosa para que aumentaran su producción de Ig A a pesar de la inmunosupresión sistémica. La desnutrición, que también altera las funciones de los linfocitos T colaboradores (106), aparentemente provoca un desbalance en las relaciones entre las tres subpoblaciones de células T. Todos estos estudios sobre la inmunidad intestinal del desnutrido pueden servir como una base para comprender la inmunidad intestinal del animal desgastado, aunque debe quedar el entendimiento de que los dos cuadros clínicos son diferentes desde un punto de vista inmunológico aunque los animales compartan una pérdida de peso similar.

Las observaciones de Chandra (103) en relación al aumento de las células T supresoras resultaron congruentes con los resultados obtenidos posteriormente por Lamont y colaboradores (44). Estos últimos autores estudiaron el estado de la tolerancia inmunológica hacia los antígenos administrados por vía oral a un grupo de ratones desnutridos. Sus resultados revelaron que los ratones

desnutridos tenían aumentada la supresión sistémica de la respuesta de anticuerpos contra los antígenos que habían sido administrados por vía intragástrica.

Los animales con la enfermedad del desgaste tenían anorexia, bajo peso e hipoplasia tímica en una forma similar a cualquier animal desnutrido por una dieta deficiente en proteínas. Además, habían comenzado a desnutrirse después de los 21 días de edad y, por consiguiente, si habían tenido la oportunidad de desarrollar en la mucosa intestinal una buena población de células plasmáticas productoras de Ig A (77). Pero, a diferencia de los desnutridos, los ratones desgastados tenían completamente deprimida su producción de anticuerpos anti-eritrocitos y, no obstante, conservaban normal la reactividad de los linfocitos esplénicos inductores de una reacción local GvH (60).

Como se puede observar en la Figura 6, los ratones desgastados, alimentados con GRC por vía oral y que posteriormente recibieron una dosis inmunizante de otra suspensión de GRC, generaron una mayor cantidad de CFA anti-eritrocitos que los ratones sanos sometidos a las mismas condiciones experimentales, excepto las inyecciones de estafilococos. Estos resultados fueron interpretados en favor de que el desgaste inmunológico si les había hecho disminuir su capacidad de volverse tolerantes. Es decir, probablemente habían reducido su población y/o actividad de células T supresoras localizadas en el bazo. Sin embargo, en la Figura 7 se puede observar que las cantidades de CFA generadas por los ratones desgastados del grupo problema resultó inferior a las

encontradas en otros grupos de ratones sanos control que no estaban desgastados ni habían recibido la suspensión de GRC por vía oral. Estos otros resultados fueron interpretados como sugerentes de que no había ocurrido una pérdida completa de la tolerancia oral, sino más bien una disminución parcial de la misma.

En vista de que Lamont y colaboradores (44) habían observado que la desnutrición aumentaba la capacidad de los ratones para convertirse en tolerantes a los antígenos administrados por vía oral y de que, en cambio, nuestros resultados mostraban que los ratones desgastados más bien perdían una parte de esa capacidad supresora, se pueden proponer las dos explicaciones siguientes para tratar de comprender estas diferencias.

En primer lugar, probablemente influyó la edad que tenían los animales en el momento de comenzar a desnutrirse y cuando recibieron la estimulación antigénica oral necesaria para la inducción de la tolerancia. En nuestro experimento se trabajó con animales recién nacidos que fueron inyectados desde que tenían dos horas de edad y que, poco tiempo después, comenzaron a perder peso aunque la desnutrición solo se manifestó francamente a partir del momento del destete. La tolerancia se indujo una semana después del destete. Los ratones del experimento de Lamont crecieron normalmente hasta el momento del destete, cuando se les comenzó a administrar una dieta hipoproteica. En ellos la tolerancia les fue inducida 4 semanas más tarde. Aunque las diferencias son muy pequeñas, el sistema inmunitario podría haber madurado más

lentamente en los ratones de nuestro experimento, a pesar de que, al final, la pérdida de peso resultó similar en los dos grupos de animales.

En segundo lugar, es necesario distinguir que se trataba de dos modelos experimentales diferentes aunque los animales habían alcanzado el mismo grado de desnutrición. En uno de los experimentos, el de Lamont, el contenido de proteínas en el alimento se reducía a partir de los 21 días de edad, mientras que, mediante nuestro diseño, los ratones se iban convirtiendo paulatinamente en animales anoréxicos y dejaban de ingerir su dieta habitual, tanto durante la lactancia como después del destete. En cierta forma, la desnutrición obtenida en nuestro experimento fue más anti-natural que la provocada con una dieta deficiente en proteínas. Pero conviene tener presente que, en el curso de las infecciones graves, las interacciones con los productos bacterianos también son una causa frecuente de pérdida de peso y de inmunodeficiencia. Además, el presente trabajo forma parte de una línea de investigación que estudia las consecuencias de las relaciones del sistema inmunológico con los productos de sus bacterias comensales. De modo que, en este otro sentido, se podría decir que nuestro modelo experimental estuvo más cercano a los objetivos de nuestra investigación que el modelo utilizado por Lamont. Estas pequeñas diferencias entre los dos diseños podrían ser consideradas como un evento clave que, además, separa la condición inmunológica del niño desnutrido sano y la del niño desnutrido infectado, no obstante los resultados obtenidos por Klein (102) en favor de que una proporción elevada de niños

desnutridos sanos tienen endotoxinas circulantes en sangre periférica. Nosotros creemos que esas endotoxinas derivan de la flora de enterobacterias comensales y que su paso frecuente a través del intestino del niño desnutrido puede llegar a producir una situación de tolerancia similar a la encontrada por Kind (15) en sus modelos experimentales sobre el desgaste inmunológico de ratones recién nacidos. Esto podría explicar la falta de manifestaciones clínicas en los niños desnutridos sanos pero con endotoxinas en la sangre.

El modelo experimental utilizado en el presente trabajo reveló nuevos aspectos inmunológicos, que no habían sido explorados hasta ahora, de los animales con la enfermedad del desgaste inducida neonatalmente. Además, se encontraron razones, que no habían sido propuestas anteriormente, para establecer una comparación entre las alteraciones inmunológicas del animal desgastado y las del animal desnutrido. Pero entre uno y otro cuadro clínico también se encontraron diferencias. Probablemente estas determinan una evolución y un pronóstico inmunológico completamente diferentes para cada situación, tanto en los animales de laboratorio como en las personas desnutridas que pueden o no presentar diferentes interacciones con varios productos bacterianos. El significado biológico que puede tener la pérdida o la disminución de la capacidad para inducir una tolerancia oral en el curso de una inmunodeficiencia y/o desnutrición es un aspecto interesante que debe ser estudiado más adelante. Pero indudablemente, los riesgos que pueden aparecer como una consecuencia de las alteraciones de la tolerancia oral deben ser tan importantes como los beneficios que regularmente obtiene el desnutrido al aumentar el número y la actividad de los linfocitos supresores localizados en el tejido linfoide asociado al tubo digestivo.

Este trabajo tuvo como objetivo completar la caracterización inmunológica de un grupo de animales a los cuales se les indujo una inmunodeficiencia experimental, secundaria y transitoria. La enfermedad es conocida desde hace varios años como síndrome del desgaste y puede ser provocada mediante la inyección intraperitoneal de una suspensión de bacterias muertas en ratones recién nacidos. En esta investigación experimental se procedió a inducir el síndrome del desgaste en la forma convencional y luego se estudió el estado de la tolerancia inmunológica contra los antígenos administrados por vía oral. El modelo fue diseñado tomando en cuenta la importancia que últimamente han adquirido la inmunidad local de las mucosas en pacientes con infecciones graves o enfermedades crónicas debilitantes y en personas desnutridas por diferentes causas.

Se propuso como hipótesis que la enfermedad del desgaste, en ratones recién nacidos, impide la aparición de un estado de tolerancia inmunológica hacia antígenos administrados por vía oral.

En un primer experimento se estudiaron los cambios en la producción de anticuerpos anti-eritrocitos durante la etapa aguda y la recuperación de la enfermedad del desgaste. Con este propósito, cinco grupos de ratones que habían sido inyectados intraperitonealmente con estafilococos fueron posteriormente inmunizados con GRC a los 3, 9, 15, 21 y 27 días después de haber terminado la inducción del desgaste.

En otro experimento, diseñado para inducir tanto la enfermedad del desgaste como la tolerancia inmunológica contra eritrocitos inoculados por vía oral, 110 ratones fueron separados en nueve subgrupos y estuvieron sometidos a condiciones diferentes durante los dos meses que duró el ensayo. Finalmente, todos los animales fueron inmunizados con GRC y sacrificados cinco días más tarde para contar el número de linfocitos esplénicos formadores de anticuerpos anti-eritrocitos.

Los resultados revelaron, primero, que en el curso de la enfermedad del desgaste se presentan tres estados inmunológicos diferentes y sucesivos: 1) una breve pero profunda depresión inicial de la síntesis de anticuerpos, 2) una etapa de recuperación durante la cual los ratones aumentan exageradamente su producción de anticuerpos anti-eritrocitos, con valores superiores a los de los animales normales, y 3) finalmente, una etapa en la cual los animales recuperan su respuesta inmunológica humoral normal (Ver Tabla 1 y Figura 2).

Por otra parte, también se encontró que los ratones desgastados no se volvían tolerantes a los eritrocitos administrados por vía oral como lo hacían los ratones que no habían recibido las inyecciones de estafilococos (Ver la Figura 6). Pero así mismo fue evidente que los ratones desgastados tampoco alcanzaron a tener la respuesta elevada de anticuerpos que se observó en otros ratones desgastados que no recibieron eritrocitos por vía oral (Ver Figura 3). Todos los animales desgastados presentaron un retraso importante de su crecimiento y fueron considerados desnutridos porque pesaban un 40% menos que los ratones control (Ver la Figura 1).

Los resultados fueron comparados con los encontrados en la bibliografía consultada (5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 29, 35, 36, 51 y 59) y se llegó a la conclusión de que el presente trabajo experimental reveló aspectos no conocidos hasta ahora de la enfermedad del desgaste. Por otra parte, en el modelo se observaron varias similitudes y algunas diferencias inmunológicas con los resultados obtenidos por otros autores al estudiar la desnutrición provocada por una simple reducción en la ingesta de proteínas y calorías. Probablemente las diferencias estuvieron causadas por las interacciones entre los macrófagos del animal desgastado y los productos de las bacterias que recibieron por vía intraperitoneal.

CAPITULO 11. TABLAS Y FIGURAS

A continuación se presentan una serie de Tablas y Figuras que resumen los resultados obtenidos en los diferentes grupos de animales experimentales.

TABLA 1

Resultados del primer experimento. Cantidades de células formadoras de anticuerpos (CFA) / 10^6 células esplénicas obtenidas al inmunizar con glóbulos rojos de carnero (GRC) varios grupos de ratones CDI desgastados que estaban en las tres diferentes etapas del síndrome experimental. Los animales estudiados 3 y 9 días después de terminar las inyecciones de estafilococos presentaron una respuesta muy débil de anticuerpos. A la semana siguiente (15 y 21 días después de las inyecciones), los ratones aumentaron exageradamente su producción de anticuerpos y, al final del experimento (27 días después de las inyecciones), recuperaron la inmunocompetencia normal para su edad y sexo.

| EDAD DE LOS RATONES | N | CFA / 10^6 \bar{x} | \pm D.E. |
|---------------------|----|---------------------------|------------|
| 1m 3d | 15 | 22.1 | 24.2 |
| 1m 9d | 10 | 181.6 | 50.8 |
| 1m 15d | 10 | 776.8 | 356.6 |
| 1m 21d | 12 | 574.2 | 186.7 |
| 1m 27d | 10 | 324.3 | 69.8 |

TABLA 2

Resultados del segundo experimento. Cantidades de células formadoras de anticuerpos (CFA) que se encontraron en 10^6 células esplénicas de los ratones de los tres subgrupos A, B y C del grupo I que fueron inyectados con la suspensión de estafilococos durante las cuatro primeras semanas de vida y que, posteriormente, recibieron glóbulos rojos de carnero (GRC) o solución salina isotónica (SSI) por vía oral durante 14 días, o que no recibieron ningún tratamiento por esta vía durante ese mismo tiempo. Análisis estadístico y grado de significancia de las diferencias.

| grupo | N | inóculo por vía oral | CFA / 10^6 | | por ciento de supresión * | P |
|-------|----|----------------------------|--------------|-----------------|---------------------------------|--------|
| | | | \bar{x} | + - DE | | |
| I - A | 17 | GRC | 240.3 | + - 103.9 | 27% | > 0.01 |
| I - B | 9 | SSI | 542.6 | + - 277.9 | - | < 0.01 |
| I - C | 12 | - | 574.2 | + - 186.7 | - | < 0.01 |

(*) Por ciento de supresión respecto al grupo control III-C.

TABLA 3

Resultados del segundo experimento. Cantidades de células formadoras de anticuerpos (CFA) que se encontraron en 10^6 células esplénicas de los ratones de los tres subgrupos A, B y C del grupo II que solo fueron inyectados intraperitonealmente con solución salina isotónica (SSI) durante las primeras cuatro semanas de vida y que, posteriormente, recibieron glóbulos rojos de carnero (GRC) o solución salina isotónica (SSI) por vía oral durante 14 días, o que no recibieron ningún tratamiento por esa vía durante ese mismo tiempo. Análisis estadístico y grado de significancia de las diferencias.

| grupo | N | inóculo por vía ora | CFA / 10^6 $\bar{x} \pm$ DE | por ciento de supresión * | P |
|--------|----|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------|
| II - A | 14 | GRC | 104.8 \pm 36.2 | 68 % | < 0.01 |
| II - B | 7 | SSI | 343.0 \pm 63.7 | - | > 0.01 |
| II - C | 11 | - | 355.8 \pm 57.2 | - | > 0.01 |

(*) Por ciento de supresión respecto al grupo control III-C.

TABLA 4

Resultados del segundo experimento. Cantidades de células formadoras de anticuerpos (CFA) que se encontraron en 10^6 células esplénicas de los ratones de los tres subgrupos A, B y C del grupo III que no fueron inyectados durante las cuatro primeras semanas de vida y que, posteriormente, recibieron glóbulos rojos de carnero (GRC) o solución salina isotónica (SSI) por vía oral durante 14 días, o que no recibieron ningún tratamiento por esa vía durante el mismo tiempo. Análisis estadístico y grado de significancia de las diferencias.

| grupo | N | inóculo por vía oral | CFA / 10^6 $\bar{x} \pm$ DE | por ciento de supresión * | P |
|---------|----|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------|
| III - A | 22 | GRC | 93.8 \pm 39.7 | 72 % | < 0.01 |
| III - B | 10 | SSI | 310.3 \pm 48.7 | - | > 0.01 |
| III - C | 8 | - | 327.3 \pm 47.9 | | |

(*) Por ciento de supresión respecto al grupo control III-C.

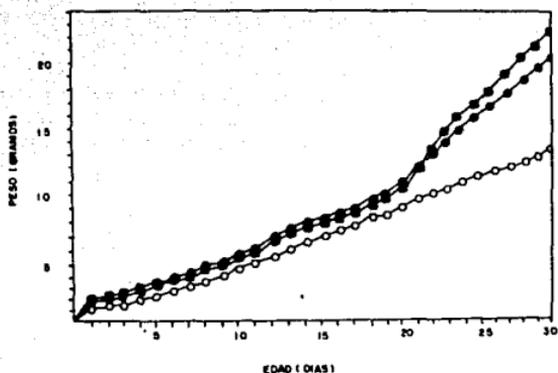


Figura 1. Comparación del aumento de peso corporal (gramos), desde el nacimiento hasta los 30 días de edad, entre los ratones que recibieron las inyecciones intraperitoneales de estafilococos (○) y los que no recibieron ningún tratamiento (■) o solo fueron inyectados con solución salina isotónica estéril (●).

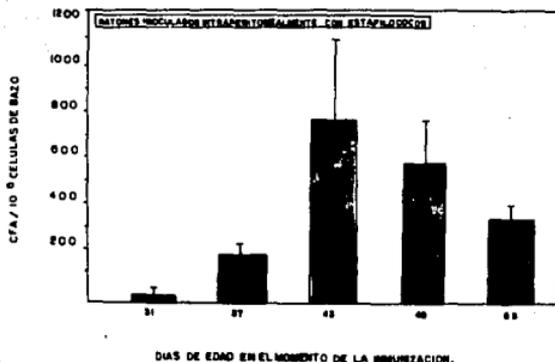


Figura 2. Cinética de las alteraciones en la respuesta de anticuerpos después de la inducción de la enfermedad del desgaste. Cantidades de células esplénicas formadoras de anticuerpos anti-eritrocitos en cinco grupos de ratones que fueron inyectados con estafilococos muertos durante su primer mes de vida. Los animales de cada grupo fueron inmunizados con GRC a los 3, 9, 15, 21 y 27 días después de haber terminado la inducción del desgaste, o sea, cuando éstos tenían 31, 37, 43, 49 y 55 días de edad respectivamente.

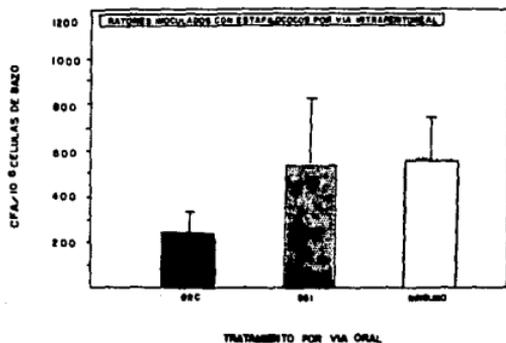


Figura 3. Cantidades de células esplénicas formadoras de anticuerpos anti-GRC (CFA) en los tres grupos de ratones que fueron inyectados con estafilococos durante sus cuatro primeras semanas de vida y que, durante los quince días siguientes, recibieron GRC (■), solución salina isotónica (▨) o ningún tratamiento (□) por vía oral. Posteriormente todos los animales fueron inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRC), 21 días después de terminar la inducción del síndrome del desgaste.

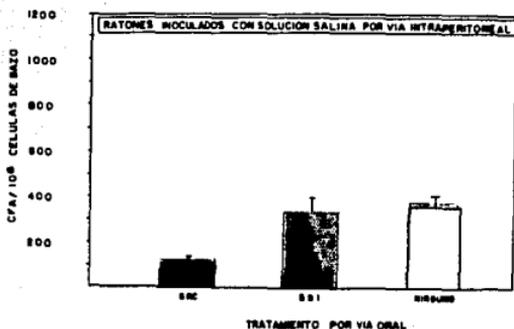


Figura 4. Cantidades de células esplénicas formadoras de anticuerpos anti-GRC que fueron contadas en los tres grupos de ratones que habían sido inyectados intraperitonealmente con solución salina isotónica durante las cuatro primeras semanas de vida y que, durante los 15 días siguientes, recibieron GRC (■), solución salina isotónica (■) o ningún tratamiento (□) por vía oral. Posteriormente todos los animales fueron inmunizados intraperitonealmente con glóbulos rojos de carnero (GRC).

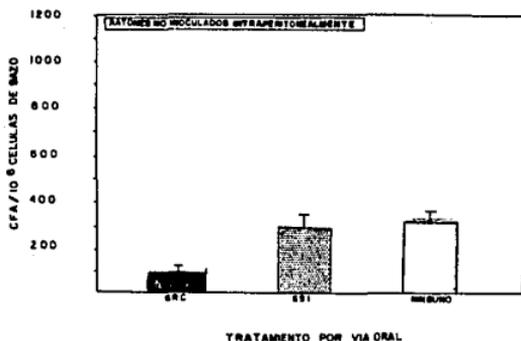


Figura 5. Cantidades de células esplénicas formadoras de anticuerpos anti-GRC en los tres grupos de ratones que no recibieron ninguna inyección intraperitoneal durante sus primeras cuatro semanas de vida y que, durante los 15 días siguientes, fueron tratados con una suspensión de GRC (■); o solución salina isotónica (▨) por vía oral. El tercer grupo de ratones (□) no recibió ningún tratamiento oral. Posteriormente todos los animales fueron inmunizados intraperitonealmente con glóbulos rojos de carnero (GRC).

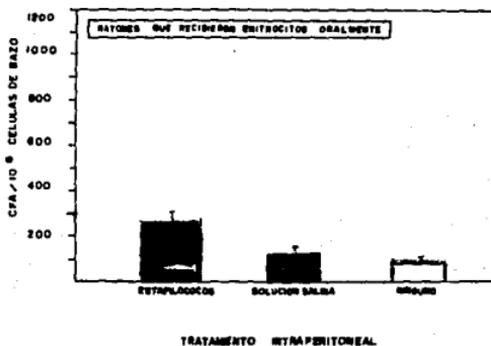


Figura 6. Cantidades de células esplénicas formadoras de anticuerpos anti-GRC (CFA) en los tres grupos de ratones que recibieron una suspensión de GRC por vía oral durante dos semanas. En el curso de su primer mes de vida, estos animales habían sido inoculados intraperitonealmente con estafilococos (■) o con solución salina isotónica (□) o no habían recibido ningún tratamiento (□). Posteriormente todos los animales fueron inmunizados intraperitonealmente con glóbulos rojos de carnero (GRC).

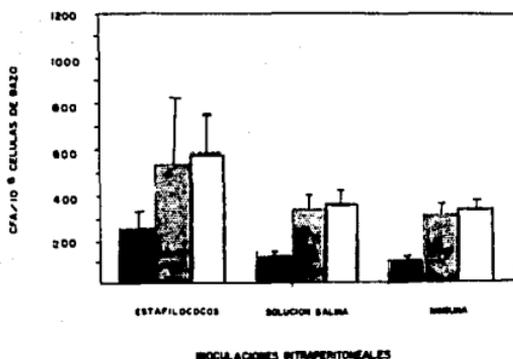


Figura 7. Cantidades de células esplénicas formadoras de anticuerpos anti-GRC en los nueve grupos de ratones que, durante el primer mes de vida, fueron inyectados intraperitonealmente con diferentes tratamientos (estafilococos muertos, solución salina isotónica o ninguno de los dos anteriores). Una vez cumplido el mes de edad y durante los 15 días siguientes, los animales recibieron diariamente y por vía oral una dosis de una suspensión de GRC (■) o solución salina isotónica (▨). A un tercer grupo de animales no se les administró ningún tratamiento por vía oral (□). Posteriormente, todos los ratones fueron inmunizados con GRC.

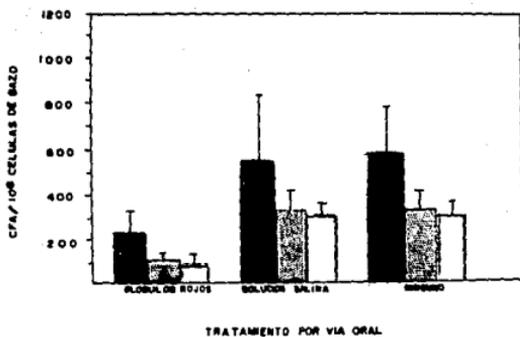


Figura B. Promedios de las cantidades de células formadoras de anticuerpos anti-GRC que se obtuvieron en los nueve grupos de ratones después de dos semanas de tratamiento por vía oral con GRC, solución salina isotónica o ninguno de los dos anteriores. Durante su primer mes de vida, dos grupos de estos mismos animales habían sido inyectados intraperitonealmente con una suspensión de estafilococos (■) o solución salina isotónica (□), mientras los animales de un tercer grupo (□) no recibieron ninguna inoculación. Posteriormente, todos los animales fueron inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRC).

1) Ingredientes del alimento utilizado (Purina*) :

Cereales molidos, combinación de pastas oleaginosas, harinas de origen animal, subproductos de cereales, subproductos alimenticios agrícolas e industriales, melaza de caña de azúcar, alfalfa deshidratada, vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, cloruro de colina, vitamina B 12, pantotenato de calcio, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

Carbonato de calcio, roca fosfórica, cloruro de sodio, fosfato dicálcico, carbonato de cobalto, óxido cúprico, óxido férrico, sulfato ferroso, óxido de manganeso, yoduro de potasio, tiosulfato de sodio y óxido de zinc.

2) Composición química (nutrientes) del alimento utilizado :

| | | | |
|--------------|------------|----------------|--------------|
| Proteína | 23.00 % | Arginina | 1.50 % |
| Cisteína | 0.32 % | Glicina | 1.20 % |
| Histidina | 0.55 % | Isoleucina | 0.95 % |
| Leucina | 1.70 % | Lisina | 1.28 % |
| Metionina | 0.41 % | Fenilalanina | 1.03 % |
| Treonina | 0.84 % | Triptofano | 0.35 % |
| Valina | 1.21 % | Grasa | 2.50 % |
| Fibra | 5.80 % | TND | 75.00 % |
| ELN | 48.50 % | Cenizas | 7.30 % |
| Calcio | 1.00 % | Fósforo | 0.60 % |
| Potasio | 1.10 % | Magnesio | 0.21 % |
| Sodio | 0.40 % | Cloro | 0.50 % |
| Fluor | 35.00 ppm | Hierro | 198.00 ppm |
| Zinc | 58.00 ppm | Manganeso | 51.00 ppm |
| Cobre | 18.00 ppm | Cobalto | 0.40 ppm |
| Yodo | 1.70 ppm | Energía | 4.25 KCal/g |
| Tiamina | 1.00 ppm | Riboflavina | 8.00 ppm |
| Niacina | 95.00 ppm | A. pantotónico | 23.00 ppm |
| Acido Fólico | 5.90 ppm | Piridoxina | 6.00 ppm |
| Biotina | 0.07 ppm | B 12 | 10.00 mcg/lb |
| Vitamina A | 12.50 UI/g | Vitamina D | 3.00 UI/g |

(*) Información proporcionada por el fabricante.

3) Solución salina isotónica.

NaCl 0.85% en agua destilada estéril.

4) Solución anticoagulante de Alsever.

| | |
|------------------|---------|
| Glucosa | 2.050 g |
| Citrato de sodio | 0.800 g |
| Acido Citrico | 0.055 g |
| Cloruro de sodio | 0.420 g |

Aforar hasta 100 ml con agua destilada,
Esterilizar por filtración a través de una membrana
Millipore con poros de 0.45μ de diámetro,
Conservar a 4° C.

5) Solución salina balanceada de Hanks (BSS).

Solución I.

Solución II.

| | | | |
|---------------------------|---------|-------------------------------------------|---------|
| d-glucosa | 10.00 g | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1.86 g |
| KH_2PO_4 | 0.60 g | KCl | 4.00 g |
| Na_2HPO_4 | 1.84 g | NaCl | 80.00 g |
| Rojo de fenol | 0.01 g | $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 2.00 g |
| | | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2.00 g |

Los componentes de las dos soluciones se disuelven en agua desionizada. Se afora hasta 1000 ml. Las soluciones se esterilizan por filtración.

La solución final se prepara con 5 ml de la solución I más 5 ml de la solución II. Luego se afora hasta 50 ml con agua desionizada. La solución final se conserva a 4° C hasta el momento de su uso.

1. BRUTON, O.C. :
Agammaglobulinemia.
Pediatrics, 1952, 9 : 722.

2. GOOD, R.A.; ZAK, S.J. :
Disturbances in gamma globulin synthesis as "experiments of nature".
Pediatrics, 1956, 18 : 109.

3. SHULTZ, L.D.; SIDMAN, C.L. :
Genetically determined murine models of immunodeficiency.
Ann. Rev. Immunology, 1987, 5 : 367.

4. SHEARER, W.T.; ANDERSON, D.C. :
The secondary immunodeficiencies.
En : Immunologic disorders in infants and children, editado por STIEHM, E.R., tercera edición. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989, pag. 400.

5. SCHLESINGER, M.; MARX, R. :
Wasting disease induced in young mice by administration of cortisol acetate.
Science, 1964, 143 : 965.

6. EKSTEDT, R.D.; NISHIMURA, E.T. :
Runt disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines.
J. Exp. Med., 1964, 120 : 795.

7. BROOKE, M.S. :
Experimental runt disease in mice caused by Salmonella typhimurium var. Copenhagen.
J. Exp. Med., 1964, 120 : 375.
8. BLEASE, R.M.; MARTINEZ, C.; GOOD, R.A. :
Immunological incompetence of immunologically runted animals.
J. Exp. Med., 1964, 119 : 211.
9. KEAST, D. :
The murine runtting syndrome and neoplasia.
Immunology, 1969, 16 : 693.
10. LANDY, M.; SANDERSON, R.P.; BERNSTEIN, M.T.; LERNER, E.M. :
Involvement of thymus in immune response of rabbits to somatic polysaccharides of gram negative bacteria.
Science, 1965, 147 : 1591.
11. SKIDMORE, B.J.; CHILLER, J.M.; MORRISON, D.C.; WEIGLE, D. :
Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS) : correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities.
J. Immunology, 1975, 114 : 770.
12. CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; WILLIAMSON, B. :
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc. Nat. Acad. Sc. USA., 1975, 72 : 3666.
13. MAEHORA, N.; HO, M. :
Cellular origin of interferon induced by bacterial lipopolysaccharide.
Infect. Immunity, 1977, 15 : 78.

14. MORRISON, D.C.; RYAN, J.L. :
Bacterial endotoxins and host immune response.
En : Advances in Immunology, editado por DIXON, F.J. y KUNKEL, H.G. Academic Press, New York, 1979. Vol. : 28 : 293.

15. KIND, P.; CAMPBELL, P.; ROWLANDS, D.T. :
Endotoxin-induced wasting disease in mice : a temporary condition explained by endotoxin tolerance.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 125 : 495.

16. BEUTLER, B.; CERAMI, A. :
The biology of cachectin / TNF - A primary mediator of the host response.
Ann. Rev. Immunology, 1989, 7 : 625.

17. DUHIG, J.T. :
Beneficial effect of oxytetracycline in cortisone-induced wasting disease.
Nature, 1965, 207 : 651.

18. AZAR, H.A. :
Bacterial infection and wasting in neonatally thymectomized rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 116 : 817.

19. KEAST, D.; WALTERS, M.N. :
The pathology of murine runtting and its modification by neomicyn sulphate gavages.
Immunology, 1968, 15 : 247.

20. JUTILA, J.W. :
Etiology of the wasting diseases.
J. Infect. Dis., 1973, 128 (supl.) : S99.

21. WILSON, R.; SJODIN, K.; BEALMAR, M. :
The absence of wasting in thymectomized germfree (axenic) mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 117 : 237.
22. OWENS, W.E.; BERG, R.D. :
Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice.
Infect. Immun., 1980, 27 : 461.
23. BERG, R.D. :
Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents.
Curr. Microbiol., 1983, 9 : 285.
24. WELLS, C.L.; MADDAUS, M.A.; SIMMONS, R.L. :
Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria.
Arch. Surg., 1987, 122 : 48.
25. MADDAUS, M.A.; WELLS, C.L.; PLATT, J.L.; CONDIE, R.M.; SIMMONS, R.L. :
Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from gut and mesenteric lymph nodes.
Ann. Surg., 1988, 207 : 387.
26. WELLS, C.L.; MADDAUS, M.A.; SIMMONS, R.L. :
Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria.
Rev. Infect. Dis., 1988, 10 : 958.

27. TANCREDE, C.H.; ANDREMONT, A.O. :
Bacterial translocation and gram negative bacteremia in patients with hematological malignancies.
J. Infect. Dis., 1985, 152 : 99.
28. DEITCH, E.A.; WINTERTON, J.; BERG, R.D. :
Effect of starvation, malnutrition, and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation.
Arch. Surg., 1987, 122 : 1019.
29. ROWLANDS, D.T.; CLAMAN, H.N.; KIND, P.D. :
The effect of endotoxin on the thymus of young mice.
Amer. J. Pathology, 1965, 146 : 165.
30. PIERPAOLI, W.; SORKIN, E. :
Hormones, Thymus and lymphocyte functions.
Experientia, 1972, 28 : 1385.
31. ELSON, C.O.; REILLY, R.W.; ROSEMBERG, H. :
Small intestine injury in the GvHR : an innocent bystander phenomenon.
Gastroenterology, 1977, 72 : 886.
32. NESTEL, F.P.; SEEMAYER, T.A.; LAPP, W.S. :
Cachectin production during acute graft vs host reaction.
FASEB J., 1988, 2 : A448 (abstract).
33. SUNG, X-m.; HSUEH, W. :
Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor.
J. Clin. Invest., 1988, 81 : 1328.

34. PEKALA, P.H.; PRICE, S.R.; HORN, C.H.; HOM, B.E.; MOSS, J.; CERAMI, A. :
Model for cachectin in chronic disease : secretory products of endotoxin-stimulated macrophages induce a catabolic state in 3T3-L adipocytes.
Trans. Assoc. Amer. Physicians, 1984, 97 : 251.
35. KAISERLIANIAN, D.; DELACROIX, D.; BACH, J.F. :
The wasted mutant mouse. I. An animal model of secretory Ig A deficiency with normal serum Ig A.
J Immunology, 1985, 135 : 1126.
36. KAISERLIANIAN, D.; SAVINO, W.; URIEL, J.; HASSID, J.; DARDENE, M.; BACH, J.F. :
The wasted mutant mouse. II. Immunological abnormalities in a mouse described as a model of ataxia-telangiectasia.
Clin. Exp. Immunology, 1986, 63 : 562.
37. SISKIND, G.W. : Immunological tolerance. En : Fundamental Immunology, editado por PAUL, W.E. Raven Press, New York, 1984, pag. 537.
38. CLAMAN, H.N. : Immunological tolerance. En : Immunological Diseases, editado por SAMTER, M.; TALMAGE, D.W.; FRANK, M.M.; AUSTEN, K.F.; CLAMAN, H.N. Cuarta edición, Vol. I, Little, Brown and Company, Boston, 1988, pag. 311.
39. AUERBACH, R.; ROETHLE, J. :
Tolerance to heterologous erythrocytes.
Science, 1974, 183 : 332.

40. THOMAS, H.C.; PARROTT, D.M.V. :
The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration.
Immunology, 1977, 27 : 631.
41. KOSTER, F.T.; PIERCE, N.F. :
Parenteral immunization causes antigen-specific cell-mediated suppression of an intestinal Ig A response.
J. Immunology, 1983, 131 : 115.
42. MATTINGLY, J.A.; WAKSMAN, B.H. :
Immunological suppression after oral administration of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration.
J. Immunology, 1978, 121 : 1878.
43. TOMASI, T.B. :
Mechanisms of immune regulation at mucosal surfaces.
Rev. Infect. Dis., 1983, 5 (supl. 4) : 784.
44. LAMONT, A.G.; GORDON, M.; FERGUSON, A. :
Oral tolerance in protein-deprived mice. I. Profound antibody tolerance but impaired DTH tolerance after antigen feeding.
Immunology, 1987, 61 : 333.
45. LAMONT, A.G.; GORDON, M.; FERGUSON, A. :
Oral tolerance in protein-deprived mice. II. Evidence of normal "gut processing" of ovalbumin, but suppressor cell deficiency.
Immunology, 1987, 61 : 339.

46. MOREAU, M.C.; CORTIER, G. :
Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice.
Infect. Immun., 1988, 56 : 2766.
47. PENG, H.J.; TURNER, M.W.; STROBEL, S. :
The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration.
Immunology, 1989, 67 : 425.
48. MOWAT, A.M. :
The regulation of immune response to dietary protein antigens.
Immunology Today, 1987, 8 : 93.
49. KIYONO, H.; MCGHEE, J.R.; WANNEMUEHLER, M.J.; MICHALEK, S.M. :
Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice.
J. Exp. Med., 1982, 155 : 605.
50. WANNEMUEHLER, M.J.; KIYONO, H.; BABB, J.L.; MICHALEK, S.M.; MCGHEE, J.R. :
Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response : LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction.
J. Immunology, 1982, 129 : 959.
51. EKSTEDT, R.D.; HAYES, L.L. :
Runt diseases induced by non-living bacterial antigens.
J. Immunology, 1967, 98 : 110.
52. TOMASI, T.B. Jr. :
Oral Tolerance.
Transplantation, 1980, 29 : 353.

53. CUNNINGHAM, A.J.; SZENBERG, E. :
Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells.
Immunology, 1968, 14 : 599.
54. JERNE, N.K.; NORDIN, A.A. :
Plaque formation in agar by single antibody-producing cells.
Science, 1963, 140 : 405.
55. HOEL, P.G. :
Estadística Elemental.
Compañía Editorial Continental, SA. (CECSA). México, 1971.
56. SUSKIND, R.M. :
Malnutrition and the immune response.
Raven Press, Publishers. New York, 1977.
57. BEISEL, W.R. :
Malnutrition as a consequence of stress.
En : Malnutrition and the immune response, editado por Suskind, R.M. Raven Press, Publishers. New York, 1977.
Pag. 21.
58. WATTS, T. :
Thymus weights in malnourished children.
J. Trop. Pediat., 1969, 15 : 155.
59. FUNATSU, M.K. ; ERLICH, R.B. ; MONTAGNINI, M.L. ; FERRANDES, C.A. ; OGAWA, C.A. ; PAES, R.A.P. :
Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por Escherichia coli, na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens.
Rev. Inst. Adolfo Lutz (Brasil), 1985, 45 : 65.

60. GARCIA-TAMAYO, F. ; AGUILAR, A.E.; RIVERA, R.; DE LEON, S.;
PASTELIN, R.; LASTRA, M.D. :
Consecuencias de la interaccion de productos bacterianos con
el sistema inmunológico de ratones recién nacidos.
Bol. Méd. Hosp. Inf. Mex., 1990, 47 : 173.
61. JOSE, D.G. ; GOOD, R.A. :
Absence of enhancing antibody in cell mediated immunity to
tumour heterografts in protein deficient rats.
Nature (london), 1971, 231 : 323.
62. LASTRA DE PABLO, D. ; RAMIREZ, A. ; KUMATE, J. :
Graft versus host reactions in severe malnutrition of mice and
chickens. En : Nutrition, Proc. 9th int. Congr. Nutrition,
editado por Chávez, A. ; Bourges, H. ; Basta, S. Basilea :
S. Karger, 1975, vol. 2, Pag. : 155.
63. SELLMEYER, E.; BHETTAY, E.; TRUSWELL, A.S.; MEYERS, D.L.;
HANSEN, J.D.L. :
Lymphocyte transformation in malnourished children.
Arch. Dis. Child., 1972, 47 : 429.
64. SCHLESINGER, L.; STEKEL, A. :
Impaired cellular immunity in marasmatic infants.
Amer. J. Clin. Nutr., 1974, 27 : 615.
65. McFARLANE, H. ; HAMID, J. :
Cell-mediated immune response in malnutrition.
Clin. Exp. Immunol, 1973, 13 : 153.
66. CHANDRA, R.K. :
Immunocompetence in undernutrition.
J. Pediat., 1972, 81 : 1194.

67. JOSE, D.G. ; GOOD, R.A. :
Quantitative effects of nutritional essential amino acid deficiency upon immune response to tumors in mice.
J. Exp. Med., 1973, 137 : 1.
68. MURRAY, M.J.; MURRAY, A.B. :
Anorexia of infection as a mechanism of host defense.
Amer. J. Clin. Nutr., 1979, 32 : 593.
69. SUSKIND, R.; SIRISHINHA, S.; VITHAYASAI, V.; EDELMAN, R.; DAMRONGSAK, D.; CHARUPATANA, C.; OLSON, R.E. :
Immunoglobulins and antibody response in children with protein-calorie malnutrition.
Amer. J. Clin. Nutr., 1976, 29 : 836.
70. ANDERSON, C.G. ; ALTMANN, A. :
The electrophoretic serum-protein pattern in malignant malnutrition.
Lancet, 1951, 1 : 203.
71. KEET, M.P.; THOM, H. :
Serum immunoglobulins in kwashiorkor.
Arch. Dis. Child., 1969, 44 : 600.
72. NEUMANN, G.C.; LAWLOR, G.J.; STIEHM, E.R.; SWENDSEID, M.E.; NEWTON, C.; HERBERT, J.; AMMANN, A.J.; JACOB, M. :
Immunologic responses in malnourished children.
Amer. J. Clin. Nutr., 1975, 28 : 89.
73. REDDY, V.; SRIKANTIA, S.G. :
Antibody response in kwashiorkor.
Indian J. Med. Res., 1964, 52 : 1154.

74. POCINO, M.; MALAVE, I. :
Enhancement of the in vitro antibody response in dietary protein restriction. Failure in the regulation of the antibody synthesis.
immunology, 1981, 43 : 235.
75. GARCIA-TAMAYÚ, F.; KUMATE, J :
Nutrición e inmunidad. II. Síntesis de anticuerpos contra la albúmina bovina en ratas con diferentes grados de desnutrición. En : Los Perfiles de la Bioquímica en México, editado por Mora, J.; Estrada, S. y Martuscelli, J. UNAM, Mexico, 1974. Pag. 475.
76. KENNY, M.A.; RODERUCK, C.E.; ARNRICH, L.; PIEDAD, F. :
Effect of protein deficiency on the spleen and antibody formation in rats.
J. Nutr., 1968, 95 : 173.
77. WADE, S.; LEMONNIER, D.; ALEXIV, A.; BOCQUET, L. :
Effect of early postnatal under- and overnutrition on the development of Ig A plasma cells in mouse gut.
J. Nutr., 1982, 112 : 1047.
78. SIMONSEN, M. :
Mechanism of runt disease. En : Mechanism of cell and tissue damage produced by immune reactions, editado por Grabar, F. y Miescher, P. Benno Schwabe & Co., Publishers. Basilea, 1962, Pag. 233.
79. PATERSON, F.Y. :
Discussion on mechanisms of tissue damage in runtling and homograft rejection. En : Mechanism of cell and tissue damage produced by immune reactions, editado por Grabar, F. y Miescher, P. Benno Schwabe & Co., Publishers. Basilea, 1962, Pag. 241.

80. MILLER, J.F.A.P.; HOWARD, J.G. :
Some similarities between neonatal thymectomy syndrome and GVH disease.
J. Reticuloend. Soc., 1964, 1 : 369.
81. DEITCH, E.A.; BERG, R.D. :
Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice.
J. Trauma, 1987, 27 : 161.
82. PENN, R.L. ; MACA, R.D. ; BERG, R.D. :
Increased translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of tumor-bearing mice.
Infect. Immun., 1985, 47 : 793.
83. ZIEGLER, K.H.; STAFFILENO, L.K.; WENTWORTH, P. :
Modulation of macrophage Ia expression by lipopolysaccharide. I. Induction of Ia expression in vivo.
J. Immunol., 1984, 133 : 1825.
84. HAVELL, E.A.; SPITALNY, G.L. :
Endotoxin-induced interferon synthesis in macrophage cultures.
J. Reticuloendoth. Soc., 1983, 33 : 369.
85. STEEG, P.A.; JOHNSON, H.M.; OPPENHEIM, J.J. :
Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine : inhibitory effect of endotoxin.
J. Immunol., 1982, 129 : 2402.
86. JEPHTHAH-OCHOLA, J.; URMSON, J.; FARKAS, S.; HALLORAN, P.F. :
Regulation of MHC expression in vivo. Bacterial lipopolysaccharide induces Class I and II MHC products in mouse tissues by a T-cell independent, cyclosporine-sensitive mechanism.
J. Immunol., 1988, 141 : 792.

87. RADOVICH, J.; TALMAGE, D.W. :
Antigenic competition cellular or humoral.
Science, 1967, 158 : 512.
88. PROSS, H.F.; EIDINGER, D. :
Antigenic competition : a review of nonspecific antigen-induced suppression.
Advances in Immunology, 1974, 18 : 133.
89. ZIMMERMAN, B.T.; CANONO, B.P.; CAMPBELL, P.A. :
Silica decreases phagocytosis and bactericidal activity of both macrophages and neutrophils in vitro.
Immunology, 1986, 59 : 521.
90. MACKANESS, M.B. :
The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo.
J. Exp. Med., 1969, 130 : 973.
91. WITZEL, G.D.; KETTMAN, J.R. :
Activation of murine B lymphocytes. III. Stimulation of B lymphocyte clonal growth with lipopolysaccharide and dextran sulfate.
J. Immunol., 1981, 126 : 723.
92. HOLLY, M.; LIN, Y.S.; ROGERS, T.J. :
Induction of suppressor cells by staphylococcal enterotoxin B. Identification of a suppressor cell circuit in the generation of suppressor-effector cells.
Immunology, 1988, 64 : 643.
93. JAYAWARDENA, A.N.; WASKMAN, B.H. :
Suppressor cells in experimental Trypanosomiasis.
Nature (London), 1977, 265 : 539.

94. FERGUSON, A.C.; LAWLOR, G.J.; NEUMANN, C.G.; OH, W; STIEHM, E.R. :
Decreased rosette-forming lymphocytes in malnutrition and intrauterine growth retardation.
J. Pediat., 1974, 85 : 717.
95. KULAPONGS, P.; SUSKIND, R.M.; VITHAYASAI, V.; OLSON, R.E. :
In vitro cell-mediated immune response in Thai children with protein-calorie malnutrition. En : Malnutrition and the immune response, editado por Suskind, R.M. Raven Press, New York, 1977, Pag. 99.
96. CHANDRA, R.K. :
Reduced secretory antibody response to live attenuated measles and poliovirus vaccines in malnourished children.
Brit. Med. J., 2 : 583.
97. JOSE, D.G.; WELCH, J.S.; DHERTHY, R.L. :
Humoral and cellular immune responses to streptococci influenza and other antigens in Australian aboriginal school children.
Aust. Paediat., 1970, 6 : 192.
98. ROTHMAN, D.; LATHAM, M.C.; WALKER, W.A. :
Transport of macromolecules in malnourished animals. I. Evidence for increased uptake of intestinal antigens.
Nutr. Res., 1982, 2 : 467.
99. SIRISINHA, S.; SUSKIND, R.; EDELMAN, R.; ASVAPAKA, C.; OLSON, R.E. :
Secretory and serum Ig A in children with protein-calorie malnutrition.
Pediatrics, 1975, 55 : 166.

100. CHANDRA, R.K. :
Food antibodies in malnutrition.
Arch. Dis. Child., 1975, 50 : 532.
101. MOREHEAD, C.D.; MOREHEAD, M.; ALLEN, D.M.; OLSON, R.E. :
Bacterial infections in malnourished children.
J. Trop. Pediat., 1974, 20 : 141.
102. KLEIN, K.; SUSKIND, R.M.; KULAPONGS, P.; MERTZ, G.;
OLSON, R.E. :
Endotoxemia, a possible cause of decreased complement activity in malnourished Thai children. En : Malnutrition and the immune response, editado por Suskind, R.M. Raven Press, New York, 1977, Pag. 321.
103. CHANDRA, R.K. :
Lymphocyte subpopulations in human malnutrition : Cytotoxic and suppressor cells.
Pediatrics, 1977, 59 : 423.
104. MCGEE, D.W.; McMURRAY, D.N. :
Protein malnutrition reduces the Ig A immune response to oral antigen by altering B-cell and suppressor T-cell functions.
Immunology, 1988, 64 : 697.
105. SUZUKI, I.; KITAMURA, K.; KIYONO, H.; KURITA, T.; GREEN, D.R.; MCGEE, D.M. :
Isotype-specific immunoregulation. Evidence for a distinct subset of I contrasuppressor cells for Ig A responses in murine Peyer's patches.
J. Exp. Med., 1986, 164 : 501.

106. CHANDRA, R.K. :

Numerical and functional deficiency in I helper cells in protein energy malnutrition.

Clin. Exp. Immunol., 1983, 51 : 126.