

11661 3  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

**“EFECTO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Trichinella spiralis*  
SOBRE LAS POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE  
INTESTINAL PORCINO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
(MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**Patricia Beatríz García Reyna**

**DIRECTOR : Dr. Marco Antonio Vega López  
ASESOR : Dra. Guadalupe Ortega Pierres**

**Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLÁN  
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
FES - Cuautitlán  
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "EFECTO DE LA INFECCION EXPERIMENTAL CON *Trichinella spiralis* SOBRE LAS POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE INTESTINAL PORCINO".

que presenta el (la) alumno (a) PATRICIA BEATRIZ GARCIA REYNA

con Núm. de cuenta 7907198-7 N° Exp. 100951004  
para obtener el grado de MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

\_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 19 \_\_\_\_\_

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

VOCAL: DRA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES

SECRETARIO DR. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ

1er. SUPL. DRA. LILIAN YEPEZ MULIA

2do. SUPL. DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ

*Juan Antonio Montaraz Crespo*  
*Guadalupe Ortega Pierres*  
*Marco Antonio Vega Lopez*  
*Lilian Yopez Mulia*  
*Camila Arriaga Diaz*

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	i
<b>RELACIÓN DE FIGURAS Y GRÁFICAS</b>	iii
<b>RELACIÓN DE CUADROS Y TABLAS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>Generalidades</b>	1
<i>T. spiralis</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	1
<b>CICLO BIOLÓGICO de <i>T. spiralis</i></b>	2
<b>RESPUESTA INMUNE INTESTINAL HACIA <i>T. spiralis</i></b>	3
<b>RESPUESTA INMUNE INTESTINAL EN EL CERDO</b>	4
<b>MECANISMOS INESPECÍFICOS DE DEFENSA DEL INTESTINO</b>	4
<b>MECANISMOS ESPECÍFICOS DE DEFENSA DEL INTESTINO</b>	4
<b>A. Células productoras de inmunoglobulinas (Ig+) e Igs</b>	5
<b>B. Células del sistema inmune intestinal</b>	7
<b>C. Distribución de linfocitos en intestino</b>	7
<b>D. Desarrollo de células en la lámina propia</b>	9
<b>E. Linfocitos intraepiteliales en el cerdo adulto</b>	10
<b>F. Linfocitos intraepiteliales en el lechón</b>	11
<b>G. Células accesorias</b>	11
1. Macrófagos intestinales en el cerdo adulto	11
2. Células presentadoras de antígeno (CPA)	12
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	13
<b>III. OBJETIVOS</b>	13
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	14
a. Obtención de larvas musculares de <i>T. spiralis</i>	14
b. Preparación del extracto total de antígenos de <i>T. spiralis</i>	15
c. Animales	15
<b>ESTUDIO MORFOMÉTRICO</b>	16
Toma de muestras	16

<b>Cortes histológicos</b>	16
<b>Anticuerpos monoclonales</b>	16
<b>Tinción con la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina)</b>	17
<b>Determinación del número de células</b>	19
<b>ENSAYO DE PROLIFERACIÓN</b>	20
<b>Toma de muestras</b>	20
<b>Separación de células</b>	21
<b>Cultivo de células</b>	22
<b>V. RESULTADOS</b>	26
<b>Estudio morfométrico</b>	26
<b>Ensayo de proliferación</b>	32
<b>I. Respuesta a mitógenos</b>	32
<b>II. Respuesta a AgTLMTsp</b>	44
<b>Evaluación del método de separación</b>	47
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	49
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	59
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	60
<b>ANEXO I</b>	
<b>ANEXO II</b>	

## **ABREVIATURAS**

<b>AbM</b>	<b>Anticuerpos monoclonales</b>
<b>Ags</b>	<b>Antígenos</b>
<b>AgTLMTsp</b>	<b>Antígeno total de la larva muscular de <i>T. spiralis</i></b>
<b>BZO</b>	<b>Bazo</b>
<b>c.b.p.</b>	<b>cuanto baste para</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster differentiation</b>
<b>Células M</b>	<b>Células membranosas</b>
<b>ConA</b>	<b>Concanavalina A</b>
<b>CPA</b>	<b>Células presentadoras de antígeno</b>
<b>cpm</b>	<b>Cuentas por minuto</b>
<b>ctl</b>	<b>Control</b>
<b>DAB</b>	<b>Diaminobencidina</b>
<b>EDTA</b>	<b>Etilendinitrilotetracetato Disódico</b>
<b>g</b>	<b>Gravedades</b>
<b>GLM</b>	<b>Gánglio linfático mesenterico</b>
<b>HBSS</b>	<b>Solución Salina Balanceada de Hanks</b>
<b>I.E.</b>	<b>Índice de estimulación</b>
<b>Igs</b>	<b>Inmunoglobulinas</b>
<b>IL</b>	<b>Interleucina</b>
<b>LIE</b>	<b>Linfocitos intraepiteliales</b>
<b>LM</b>	<b>Larva muscular</b>
<b>LP</b>	<b>Lámina propia</b>
<b>LRN</b>	<b>Larva recién nacida</b>
<b>LLP</b>	<b>Linfocitos de lámina propia</b>
<b>Mφ</b>	<b>Macrófagos</b>
<b>MHC</b>	<b>Complejo principal de Histocompatibilidad</b>
<b>PBS</b>	<b>Solución amortiguadora de fosfatos salina</b>
<b>PHA</b>	<b>Fitohemaglutinina</b>

<b>PMN</b>	<b>Polimorfonucleares</b>
<b>PP</b>	<b>Placas de Peyer</b>
<b>PWM</b>	<b>Fitolaca americana</b>
<b>rpm</b>	<b>revoluciones por minuto</b>
<b>SAN</b>	<b>Sangre</b>
<b>SFB</b>	<b>Suero Fetal Bovino</b>
<b>t.sp</b>	<b>Cerdos infectados</b>
<b>TBS</b>	<b>Salina Tris-Bufferada</b>
<b>UI</b>	<b>Unidades Internacionales</b>

<p><b>Fig. 1. Distribución de las células inmunes en el intestino delgado del cerdo adulto.</b></p>	<p>9</p>	<p><b>Gráfica 1. Densidad de células CD2+ por mm<sup>2</sup> en la lámina propia (LP) de las vellosidades y la LP de las criptas en cerdos control e infectados con <i>T. spiralis</i> los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección</b></p>	<p>27</p>
<p><b>Fig. 2. Protocolo de separación de linfocitos intraepiteliales (LIE) y de la lámina propia (LLP) del intestino delgado proximal.</b></p>	<p>24</p>	<p><b>Gráfica 2. Densidad de células CD4+ por mm<sup>2</sup> en la lámina propia (LP) de las vellosidades y la LP de las criptas en cerdos control e infectados con <i>T. spiralis</i> los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección.</b></p>	<p>28</p>
<p><b>Fig. 3. Diagrama del ordenamiento por tripletes de las células obtenidas de cada órgano para su cultivo.</b></p>	<p>25</p>	<p><b>Gráfica 3. Densidad de células CD8+ por mm<sup>2</sup> en la lámina propia (LP) de las vellosidades y la LP de las criptas en cerdos control e infectados con <i>T. spiralis</i> los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección.</b></p>	<p>29</p>
<p><b>Fig. 4. Tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) en cortes congelados de intestino delgado proximal de cerdo a los 15 días post infección con <i>T. spiralis</i>. (A) Control de tinción con PBS (B) Sección transversal de las vellosidades intestinales teñidas en forma difusa con el AbM contra CD2+ (MSA-4)</b></p>	<p>30</p>	<p><b>Gráfica 4. Respuesta proliferativa de linfocitos de sangre (A) y bazo (B) de cerdos control © e infectados (t) con <i>T. spiralis</i> cultivados con AgTLMTsp durante 96 hrs a 37°C, los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección.</b></p>	<p>45</p>
<p><b>Fig. 5. Tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) en cortes congelados de intestino delgado proximal de cerdo a los 15 días post infección con <i>T. spiralis</i>. (A) Sección transversal de las vellosidades intestinales teñidas con el AbM contra CD4+ (74-12-4) (B). Sección de tejido teñida con el AbM contra CD8+ (MIL-12).</b></p>	<p>31</p>	<p><b>Gráfica 5. Respuesta proliferativa en LIE (A), LLP (B) y GLM (C) en cerdos control © e infectados (t) cultivados con AgTLMTsp a 50 µg/ml 96 hrs a 37°C.</b></p>	<p>46</p>



**Fig. 6. Corte histológico de intestino delgado proximal de cerdo al día 5 post-infección con *T. spiralis*. (A) Se observa en el parásito cortado transversalmente próximo a la zona de las criptas (flecha), Del lado derecho se observa un foco de reacción inflamatoria (i) con eosinófilos evidentes. (B) Foco de reacción inflamatoria delimitado en la zona de las criptas adyacente a la serosa del órgano.**

58

**Gráfica 6. Valores promedio (en I.E.) de linfocitos de sangre de cerdo tratados con EDTA 1mM (SANW1) (A) y con colagenasa Tipo V (SANW4)(B) cultivados con Con A utilizados como controles de los lavados de separación de células de intestino**

48

<b>RELACIÓN DE CUADROS</b>	<b>página</b>	<b>RELACIÓN DE TABLAS</b>	<b>página</b>
Cuadro 1. Respuesta proliferativa de linfocitos sanguíneos y de bazo (en I.E.), obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de ConA durante 72 hrs a 37°C.	34	Tabla 1. Anticuerpos monoclonales anti-CD2+, CD4+ y CD8+ y sus especificidades.	17
Cuadro 2. Respuesta proliferativa de LIE y LLP (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de ConA durante 72 hrs a 37°C.	35		
Cuadro 3. Respuesta proliferativa de linfocitos de GLM (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de ConA durante 72 hrs a 37°C.	36		
Cuadro 4. Respuesta proliferativa de linfocitos sanguíneos y de bazo (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PHA durante 72 hrs a 37°C.	37		
Cuadro 5. Respuesta proliferativa de LIE y LLP (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PHA durante 72 hrs a 37°C.	38		
Cuadro 6. Respuesta proliferativa de linfocitos de GLM (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PHA durante 72 hrs a 37°C.	39		
Cuadro 7. Respuesta proliferativa de linfocitos sanguíneos y de bazo (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PWM durante 72 hrs a 37°C.	41		

<b>Cuadro 8. Respuesta proliferativa de LIE y LLP (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PWM durante 72 hrs a 37°C.</b>	<b>42</b>
<b>Cuadro Respuesta proliferativa de linfocitos de GLM porcinos (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con <i>T. spiralis</i> (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PWM durante 72 hrs a 37°C.9.</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

La triquinosis causada por el nemátodo *Trichinella spiralis* es una parasitosis de amplia distribución a nivel mundial. Aún cuando el cerdo es el hospedero definitivo y principal fuente de infección para los humanos, poco se conoce acerca de la respuesta inmune intestinal. La respuesta inmune en mucosas, sobre todo la intestinal, atrae la atención por su aplicación en el diseño de inmunógenos mucosales que resultarían de gran impacto tanto en salud humana como veterinaria. En este contexto el estudio de la respuesta a nivel intestinal contra *T. spiralis* en el cerdo, resulta muy apropiado debido a que este parásito cuenta con una fase entérica dentro de su ciclo biológico. Así, en este trabajo, se planteó el evaluar la maduración del sistema inmune intestinal en cerdos destetados de 6 a 12 semanas de edad, describir morfométricamente las poblaciones de células T del sistema inmune local ante la infección con *T. spiralis* y analizar la respuesta *in vitro* de esas células a antígenos de *T. spiralis*. Se utilizaron 5 camadas de 10 cerdos destetados de 6 semanas de edad, divididas en 2 grupos (5 animales control y 5 infectados). Los animales se infectaron con 7000 larvas musculares (LM) de *T. spiralis* y se sacrificaron por pares (un control y un infectado), los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección. Para el análisis morfométrico de células T, se realizaron cortes histológicos de 4µm de muestras congeladas de intestino delgado proximal de los animales control e infectados. Los cortes se tiñeron por la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina) utilizando anticuerpos monoclonales (AbM) contra subpoblaciones CD2+(MSA-4), CD4+(74-12-4) y CD8+(MIL-12), de linfocitos T de cerdo. Los cortes teñidos se evaluaron en un analizador de imágenes por computadora y los datos se expresaron en células por mm<sup>2</sup>. Por otro lado, de estos animales se obtuvieron linfocitos de sangre y bazo por gradientes de Ficoll-diatrizoato de sodio (respuesta sistémica), así como de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) (respuesta intermedia) y linfocitos intraepiteliales (LIE) y de la lámina propia de intestino (LLP) (respuesta local) por lavados secuenciales con EDTA 1mM y colagenasa respectivamente. Las células obtenidas se cultivaron en presencia de los mitógenos ConA, PHA y PWM y con antígeno crudo de la larva muscular de *T. spiralis* (AgTLMTsp). La respuesta proliferativa se evaluó por la incorporación de timidina-<sup>3</sup>H en cuentas por minuto y los resultados se expresaron en índices de estimulación (I.E.). Los resultados en la maduración del sistema inmune intestinal de cerdos control de 6 a 12 semanas de edad, no mostraron variaciones significativas en el número y distribución de células en los tiempos en que se realizaron los experimentos, lo que sugiere que los cerdos alcanzan cierta estabilidad en el desarrollo del sistema inmune intestinal a esta edad. En el análisis morfométrico de células T, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos control e infectados en cuanto a las subpoblaciones de células CD2+, CD4+ y CD8+. Las células de sangre y bazo cultivadas con mitógenos dieron respuestas en I.E.  $\leq 172.5 \pm 142.4$  en sangre y  $\leq 38.82 \pm 55.4$  en bazo con ConA, así como  $\leq 213.3 \pm 70.5$  en sangre y  $101.2 \pm 132.7$  en bazo con PHA, observándose casos individuales con bajos I.E. La respuesta proliferativa de LIE y LLP cultivados con ConA fue escasa o nula en la mayoría de los casos (I.E.  $\leq 2.4 \pm 1.3$  en LIE y  $\leq 4.78 \pm 4.29$  en LLP) aunque se presentaron casos individuales de alta reactividad ( $64.8 \pm 142.7$  en LIE del día 5 del infectado y  $10.86 \pm 18.9$  de LLP del día 5 del infectado así como  $9.34 \pm 14.1$  del día 25 del control). Con PHA la respuesta fue mejor pero aún baja, comparada con la sistémica (LIE  $\leq 8.7 \pm 8.3$ , LLP  $\leq 8.0 \pm 11.3$ ), nuevamente hubo casos individuales de alta respuesta (LIE  $117.7 \pm 200.1$  en el día 5 del infectado y LLP  $23.9 \pm 39.0$  en el día 25 del control). Por otro lado la

respuesta proliferativa a nivel sistémico y local cuando se empleó AgTLMTsp fue en general baja (alrededor de 5.0 de I.E). En conclusión, la maduración evaluada en el estudio morfométrico en cuanto al número de células, no tuvo diferencias significativas en cerdos de 6-12 semanas de edad. Así mismo con respecto a las subpoblaciones de células T, no se observaron diferencias entre animales control e infectados con *T. spiralis*. La respuesta proliferativa hacia los mitógenos, fue diferente en sangre y bazo (sistémica) con respecto a LIE y LLP (local), siendo la primera alta en comparación con la segunda, lo que marca la diferencia entre ambos nichos. La respuesta proliferativa a AgTLMTsp en ambos niveles (sistémico y local) generalmente no fue detectable. A pesar de que se presentan valores estables en cuanto a número de células por morfometría, las variaciones individuales en funcionalidad durante la respuesta proliferativa sugieren que en las células de los animales de 6-12 semanas de edad existe todo un gradiente de maduración, que se refleja en las diferencias detectadas individualmente. Esta circunstancia podría ser aprovechada por los patógenos para pasar inadvertidos, lo que aumentaría la susceptibilidad en los cerdos jóvenes a padecer infecciones a nivel mucosal.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **GENERALIDADES**

Las mucosas son las superficies de contacto más extensas entre el organismo y el medio ambiente, (aproximadamente 400m<sup>2</sup>), esto las hace una vía de entrada frecuente de gran variedad de patógenos y antígenos inocuos de la dieta (McGhee y Kiyono, 1993).

El sistema inmune gastrointestinal posee en general los mismos componentes que el sistémico, sin embargo existen diferencias importantes en su función y regulación (Stokes, 1988; Kiyono *et al.*, 1992). Así los componentes del sistema inmune intestinal tienen la habilidad de identificar con precisión diferentes grupos de antígenos incluyendo patógenos potenciales (toxina, alérgeno, virus, hongo, bacteria, parásito) y activar respuestas que los eliminen, a su vez suprime cualquier respuesta inmune indeseable contra aquellos componentes de la dieta, que aún cuando sean antigénicos, son necesarios para la vida (Bienenstock *et al.*, 1987, Stokes *et al.*, 1994). Esta tarea de selección sólo puede efectuarse después de la eliminación de la mayoría del material de desafío por los procesos de digestión y de defensa inespecíficos (Vega-López, 1994).

En los últimos años se ha dado gran relevancia al estudio de las mucosas debido sobre todo al desarrollo tecnológico de áreas como la biomedicina y la necesidad de producir inmunógenos orales (Brandtzaeg, 1995).

El profundizar los estudios acerca de la fisiología de la respuesta inmune y de la regulación de esa doble función a nivel intestinal tendría un gran impacto en el futuro al utilizar estos elementos para el desarrollo de vacunas mucosales.

### *Trichinella spiralis* COMO MODELO DE ESTUDIO

La mayoría de las enfermedades conocidas en la actualidad tienen como puerta de entrada una superficie mucosal (Bianchi y van der Heijden, 1994; Brandtzaeg, 1995), dentro de las infecciones que afectan al tracto digestivo, las parasitosis tienen un lugar

relevante. Tanto protozoarios como metazoarios componen un universo de agentes que afectan la mucosa, ya sea porque su ciclo de vida se cumple en el tracto gastrointestinal (*Giardia*, *Entamoeba*) , o porque la mucosa representa su vía de entrada (*Toxoplasma*, *Trichinella*).

La triquinelosis es una parasitosis que representa un problema en muchas partes del mundo y es causada por el nemátodo *Trichinella*. Se le considera una zoonosis de interés en salud pública ya que es potencialmente fatal para el hombre, así mismo, porque afecta la producción pecuaria por el decomiso en carne de cerdo infectada. En México se estima que la parasitosis tiene zonas endémicas importantes (Martínez-Marañón, 1985) y su control es limitado por carecer de métodos efectivos de diagnóstico y prevención. En este sentido, el estudio de *Trichinella spiralis*, que es la especie que afecta al cerdo, resulta de gran interés no solo debido al problema de salud que representa, sino porque provee un buen modelo para el estudio de la respuesta inmune durante su fase intestinal.

#### CICLO BIOLÓGICO DE *Trichinella spiralis*

El ciclo de vida de este parásito es relativamente corto y los síntomas asociados con la enfermedad han sido reproducidos en animales experimentales incluyendo ratas y ratones. El ciclo de vida presenta dos fases: una entérica, donde el parásito pasa por cuatro estadios larvarios y el adulto; y la fase sistémica que incluye a la larva recién nacida (LRN) y la LM enquistada.

La fase entérica del parásito se establece después de la ingestión de carne cruda o mal cocida de animales silvestres y cerdos domésticos infectada con la LM (Alcántara *et al.*, 1992). Ésta se libera en pocos minutos gracias a la digestión gástrica y migra al duodeno donde se establece en el epitelio intestinal en pocas horas (Dick y Silver, 1980). Ahí la LM sufre cuatro mudas sucesivas hasta convertirse en adulto. El crecimiento, desarrollo y maduración del organismo adulto se realiza en las células epiteliales del intestino, resultando en la destrucción de estas células (Wright *et al.*, 1987). En esta fase entérica, las hembras fecundadas migran a la lámina propia intestinal, donde en aproximadamente cinco días, tienen la posibilidad de liberar larvas recién nacidas (LRN).

Estas LRN llegan a la linfa y al torrente circulatorio, que es la fase sistémica del parásito, para su posterior establecimiento en el músculo estriado esquelético del hospedero donde se desarrolla la LM, en ese sitio puede sobrevivir por años o eventualmente calcificarse y morir (Murrell, 1985a; Despommier, 1990).

### RESPUESTA INMUNE INTESTINAL HACIA *T. spiralis*

*T. spiralis*, se considera un parásito intracelular en sus fases entérica y sistémica o muscular, (Despommier, 1990;1993) por lo que tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a varios mecanismos de inmunidad. Así mismo constituye un estímulo antigénico complejo para el hospedero dada la diversidad y la estadio-especificidad de los antígenos que presenta, por lo tanto establece una respuesta inmunológica humoral y celular específica (Alcántara *et al.*, 1992), que lo hace importante para su estudio debido a la relación especial que debe entablar con las células del hospedero a lo largo de sus diferentes fases de diferenciación.

Dada la inespecificidad que *T. spiralis* tiene por su hospedero se ha podido desarrollar un modelo experimental en ratones, el cual ha provisto de la mayoría de información acerca de su inmunología.

En los estudios sobre la infección primaria en roedores se ha demostrado que los parásitos adultos son expulsados después de la tercera semana, con el desarrollo de una respuesta inmune protectora intensa que se expresa con el fenómeno de expulsión rápida de adultos o preadultos del intestino (Love *et al.*, 1976; Despommier *et al.*, 1977; Bell *et al.*, 1979). En el cerdo, el parásito adulto puede permanecer en el intestino por periodos de mas de siete semanas (Martí y Murrell, 1986) y aún no se conocen los mecanismos que permiten la larga permanencia de este estadio. Los cerdos también desarrollan una intensa respuesta inmune protectora y en la reinfección expulsan a los parásitos adultos en alrededor de tres semanas (Murrell, 1985b) y se ha descrito la inducción de una inmunidad efectiva contra las LRN y la LM, además de una reducción significativa de la fertilidad en las hembras adultas (Martí y Murrell, 1986) , lo cual limita el establecimiento del parásito.



La cinética de la infección primaria y secundaria tanto como la respuesta a antígenos de *T. spiralis* es distinta claramente en roedores y en cerdos. En un modelo murino la resistencia a *T. spiralis* ha sido asociada con genes dentro y fuera del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés).

Se han publicado reportes sobre la respuesta inmune generada contra el parásito en roedores (Philipp *et al.*, 1981; Almond y Parkhouse, 1986), sin embargo, los estudios de la respuesta inmune en el cerdo, que es la fuente principal de la zoonosis, se limitan a la inmunidad sistémica generada en infecciones experimentales (Arriaga *et al.*, 1989; Ivanoska *et al.*, 1990), naturales o después de la inmunización (Gamble *et al.*, 1986; Marti y Murrell, 1987) y poco o nada se sabe de la relación hospedero-parásito e inmunidad en la mucosa intestinal.

## **SISTEMA INMUNE INTESTINAL EN EL CERDO**

### **MECANISMOS INESPECIFICOS DE DEFENSA DEL INTESTINO**

La protección a nivel mucosal está a cargo de numerosos mecanismos innatos tanto físicos, químicos como biológicos que cooperan de manera estrecha con el sistema inmune local (Brandtzaeg, 1995). Los mecanismos físicos incluyen fluidos, motilidad, epitelio y moco, los químicos las secreciones, enzimas, pH y ácidos grasos y los biológicos la microflora. La función principal de estos mecanismos es evitar la adhesión y penetración de antígenos (Ags) y fragmentos presentes en el lumen intestinal (Walker y Owen, 1990), ejemplo de ello es la composición del moco que actúa como barrera física para la difusión de antígenos y sinérgicamente participa en el proceso denominado “exclusión inmune” con la secreción de las IgA e IgM (Newby y Stokes, 1984; Walker, 1987a y Husby, 1988).

### **MECANISMOS ESPECÍFICOS DE DEFENSA DEL INTESTINO**

A nivel intestinal existen una gran diversidad de células que están involucradas con el sistema inmune, entre las que se encuentran los enterocitos, las células caliciformes

secretoras de moco, las células M de las placas de Peyer (PP) encargadas de la captura de antígenos y proteínas, los linfocitos T y B, las células plasmáticas (CP), los macrófagos (M $\phi$ ) y las células presentadoras de antígeno (CPA) (Johnson, 1983).

El desarrollo y maduración de estos tipos celulares durante el periodo neonatal depende de manera importante de factores genéticos y alimentarios, de la exposición a antígenos y del medio que rodea al individuo (Brandtzaeg, 1995).

El epitelio intestinal actúa como barrera permeable permitiendo el paso de sustancias provenientes del exterior. La mayoría de estas sustancias no provocan una respuesta inmune debido a su tamaño pequeño y baja antigenicidad. Las barreras humoral, celular y mecánica reducen la absorción de antígenos no digeridos, pero aún así cantidades inmunológicamente significativas se absorben a través del epitelio y de las células M (Husby, 1988).

Para la inducción de respuesta inmune se requiere del procesamiento y la presentación de los antígenos a los linfocitos T cooperadores (CD4+) por células accesorias (CPA) que expresen en su superficie moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Después de la presentación antigénica, las células T se activan expresando en su superficie receptores para interleucina 2 y posteriormente se secretan diversas citocinas.

La relación anatómica entre las CPA, los linfocitos T y las células activadas (ver fig. 1) nos proporciona información clave para elucidar cuales son los sitios de contacto del sistema inmune con el antígeno (Vega-López, 1994).

#### **A. Células productoras de Inmunoglobulinas (Ig+) e Igs**

En el caso de las células Ig+ del cerdo tenemos que en animales jóvenes las células IgM+ intestinales exceden en número a las células IgA+ y posteriormente las células IgA+ vienen a ser el tipo predominante. La localización de la mayoría de éstas células es en la región de las criptas del intestino porcino (Bianchi y van der Heijden, 1994).

Las IgA secretadas en la mucosa pueden limitar la toma de Ags al bloquear su adsorción al enterocito, lo que prolonga su estancia en el lumen y potencia su proteólisis (Brandtzaeg, 1995).

La IgG y la IgM son sintetizadas en el intestino. La IgM es la principal inmunoglobulina secretoria en animales jóvenes (Stokes, 1988). La IgG es importante en roedores y rumiantes, aunque en otros mamíferos es sólo un componente menor de las secreciones intestinales, al parecer producto de la trasudación del suero, o la producción local por células presentes en la lámina propia (LP) intestinal. La IgG podría ser importante en la patogénesis de procesos inflamatorios que pueden producir daño intestinal (activación del complemento, opsonización y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) (Brandtzaeg, 1995).

Otra inmunoglobulina importante en el intestino es la IgE, que se encuentra asociada a las células cebadas en la LP. Su importancia radica en la protección contra infecciones parasitarias y en la regulación y amplificación de la respuesta inmune local (Stokes, 1988). Las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE pueden ser una causa importante de problemas intestinales (Patrick y Gall, 1988). Por ejemplo, al destete, el lechón recibe una cantidad masiva de nuevos Ags y su regulación inmune local puede ser deficiente a esa edad (Vega-López, 1994). Estas dos circunstancias, en conjunto, pueden producir una reacción de hipersensibilidad a Ags de la dieta (Walker, 1987b). Se sabe que estas reacciones existen y que su duración no va más allá de los diez días, pues son autolimitantes (Brandtzaeg, 1995). Sin embargo, en ese periodo, el animal es mas vulnerable a las infecciones oportunistas (Vega-López, 1994).

La mayoría de las ocasiones la respuesta inmune a nivel intestinal es de tipo IgA secretoria (SIgA), aunque también existe el mecanismo inmune mediado por células, sin embargo sus funciones se han dilucidado solo parcialmente. (Barret *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1992). Se sabe que la inducción de la producción de IgA es dependiente de las células T cooperadoras (CD4+). Estas células se dividen en dos subclases funcionales principales, las T<sub>h</sub>1, que producen interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2) y esencialmente soportan la respuesta inmune mediada por células y las T<sub>h</sub>2, las cuales producen interleucina-4 (IL-4), e interleucina-10 (IL-10) y sirven en la cooperación para la

respuesta de células B. En humanos se sabe que el switch de diferenciación para la producción de células IgA+ se dá por la liberación del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) por las células T<sub>h</sub>1, la interleucina 10 (IL-10) e interleucina 4 (IL-4) de las células T<sub>h</sub>2 y que participan también las células epiteliales del intestino con mayores cantidades de TGF- $\beta$  e IL-10. Esto sugiere que existe una estrecha cooperación entre linfocitos, células epiteliales y el microambiente y que esta es esencial para la programación de maduración preferencial hacia células B productoras de IgA.

## **B. Células del sistema inmune intestinal**

Linfocitos, células plasmáticas (CP), macrófagos (M $\phi$ ), eosinófilos, células cebadas y varios tipos de CPA se localizan en el tejido conectivo de la LP intestinal. Ciertos linfocitos también se encuentran entre las células epiteliales del intestino (linfocitos intraepiteliales ó LIE) (Parrot, 1987). Además, grupos de nódulos linfoides organizados (placas de Peyer (PP), agregados linfoides), así como folículos linfoides dispersos, se encuentran a lo largo del tracto intestinal. Los linfocitos y las CP en la LP están separados del contenido intestinal por las células epiteliales y la membrana basal. En cambio, los LIE están separados de los antígenos del lumen intestinal únicamente por las uniones de los enterocitos. Las células linfoides de las PP, están separadas del lumen intestinal por un epitelio especializado que contiene células membranosas (M), fagocíticas, que forman una delgada capa entre los linfocitos y el lumen intestinal (Chu *et al.*, 1979).

## **C. Distribución de linfocitos en intestino**

En el caso del cerdo se ha descrito el desarrollo, distribución y número de células del sistema inmune en intestino (Rothkotter *et al.*, 1991; Vega-López *et al.*, 1993) (fig. 1) y se sabe que existe una sorprendente compartimentalización a nivel del epitelio y la lámina propia (LP) (Vega-López *et al.*, 1993; Hamad y Klein, 1994), así como también que ocurren algunos cambios en morfología y celularidad determinados por el

microambiente local y la madurez relativa como es el caso de las células T (Vega-López *et al.*, 1995).

En un análisis de la densidad de células en la LP del intestino delgado de cerdos convencionales de 6 meses de edad se encontraron marcadas diferencias de distribución entre las vellosidades y las criptas (Vega-López *et al.*, 1993). Algunas células se concentran en la LP de las vellosidades (CD2, clase II del MHC, CD4 y CD8), mientras que otras aparecen más a menudo en la LP que rodea las criptas (M $\phi$ /PMN, células Ig+).

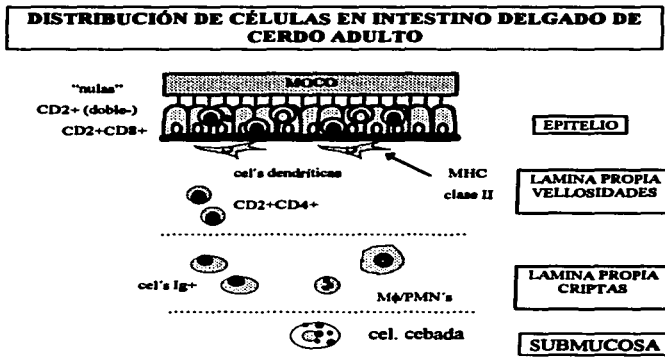
La LP contiene una de las acumulaciones mas grandes de células del sistema inmune. Por lo general se le considera como un sitio de almacenamiento de células efectoras de "memoria", pero aún no se realiza un análisis preciso y detallado de su función (Vega-López, 1994).

La mayoría de los linfocitos T (CD2), se encuentran en las vellosidades y la diferencia en número con las criptas es altamente significativa. Sin embargo aún cuando la densidad de células CD2+ en las criptas es menor a la que se encuentra en las vellosidades, representa una población numéricamente importante (Vega-López, 1994).

Dentro de las células CD2+ presentes en las vellosidades, la mayoría de las CD8+ (linfocitos T citotóxicos) se encontraron alrededor de la membrana basal y la mayor parte de las de células CD4+ (linfocitos T cooperadores) se localizó hacia la parte central de la LP de la vellosidad, alrededor del vaso quilífero. Del total de células CD2+ localizadas en las vellosidades, hasta el 55% en duodeno (59% en íleon) se detectan en el compartimiento intraepitelial. Las células CD8+ se localizan en la membrana basal en la zona de contacto antigénico, que es una posición óptima para regular la respuesta hacia antígenos inocuos absorbidos. Por otro lado, las células cooperadoras/inductoras (CD4+) se encuentran en sitios más profundos de menor contacto antigénico en la LP, lo que puede evitar reacciones exageradas a antígenos de la dieta. Sin embargo, están disponibles si el antígeno representa un peligro para el tejido (Vega-López *et al.*, 1993).

#### D. Desarrollo de células T en la lámina propia

Los lechones recién nacidos poseen todas las células necesarias para montar una respuesta inmune en el intestino, aunque todas están presentes en número reducido a esa edad. La distribución de las células no presenta un patrón definido como el que se ha descrito en el cerdo adulto puesto que se encuentran números similares de estas en las vellosidades y las criptas. Probablemente sea necesario el estímulo antigénico para alcanzar la arquitectura organizada de la LP.



**Fig. 1** Distribución de las células inmunes en el intestino delgado del cerdo adulto. Los linfocitos T están distribuidos preferentemente a nivel de las vellosidades. Los LIE's de la parte apical del epitelio presentan el fenotipo CD2+CD4-CD8- (doble negativos), mientras que los LIE's cercanos a la membrana basal son CD2+CD4-CD8+. Las células dendríticas por debajo de la membrana basal expresan el MHC clase II+ y vecinas a éstas, en el centro de la vellosidad se encuentran células CD2+CD4+CD8-. Los Mφ/PMN's+, se localizan principalmente en la LP de las criptas, así como también las células Ig+. En la submucosa se localizan las células cebadas (adaptado de Vega, 1994).

Los infocitos T en la LP del recién nacido se localizan principalmente en el epitelio y carecen de marcadores CD4 o CD8 (doble negativas) (Vega-López *et al.*, 1995). La población de células doble negativas (CD2+CD4-CD8-) se ha descrito en la circulación sanguínea del cerdo adulto (Saalmuller *et al.*, 1989) y en el intestino porcino (Rothkotter *et al.*, 1991), pero aún no se ha definido cual es su función.

A la semana de edad, las células empiezan a distribuirse diferencialmente a nivel de las vellosidades y las criptas. En el caso de las vellosidades la densidad de células aumenta con la edad sin embargo se mantiene constante en las criptas (Vega-López *et al.*, 1995). De este modo la llegada y retención de los linfocitos T en esas zonas pudiera ser influenciado por la carga antigénica del lumen intestinal (Vega-López, 1994).

En evaluaciones cualitativas se observa que a la semana de edad hay un aumento repentino de células CD4+ en la LP y que estas células muestran tendencia para localizarse en la parte central de las vellosidades, cerca del vaso quilífero. En contraste, las células CD8+ no son detectables sino hasta las 4 ó 5 semanas de edad en animales sin destetar, o hasta los cuatro días post-destete en animales destetados a las tres semanas (Vega-López *et al.*, 1995). En ambos se presentan números bajos de células CD8+ que se localizan preferentemente por el epitelio, sobre todo en animales destetados. Los linfocitos CD2 aumentan constantemente después del nacimiento lo que podría deberse a un incremento de las células CD4. Sin embargo, también podría tratarse de células doble negativas o de células con expresión baja de CD8 (Vega-López, 1995).

#### **E. Linfocitos Intraepiteliales en el cerdo adulto**

La mayoría de los LIE en cerdos adultos expresan el marcador CD2, pero algunos otros aparentemente no expresan marcadores de linfocitos T (¿células nulas?) (Saalmuller *et al.*, 1989). Esta población de células nulas está presente cerca del lumen intestinal (zona apical de los enterocitos), por lo que se podría tratar de células en proceso de extrusión. Su función e importancia son desconocidos, pero se sugiere que son una subpoblación de células en fase terminal de diferenciación (Wilson *et al.*, 1986a), programada para morir. Al menos se han identificado dos subpoblaciones de LIE CD2+. Una de ellas tiene el fenotipo

**CD2+CD4-CD8-** (doble negativa). La otra subpoblación de LIE se concentra en la membrana basal del epitelio y expresa el fenotipo CD2+CD4-CD8+ (Vega-López *et al.*, 1993). Su papel en el sistema inmune mucosal es controversial, pero es posible su efecto regulador en el establecimiento de supresión de la respuesta inmune (Fujihashi *et al.*, 1990).

## **F. Linfocitos Intraepiteliales en el lechón**

Los LIE aparecen en el intestino del lechón durante el desarrollo. La mayoría son células doble negativas (Guy-Grand *et al.*, 1991). Su proporción, dentro del total de la población de células CD2+, aumenta en las vellosidades duodenales de menos del 40% al nacimiento, a más del 50% a las 7 semanas de edad y hasta cerca de 65% en ileon (Vega-López *et al.*, 1995). A esa edad algunos LIE también expresan el marcador CD8. Se han sugerido actividades reguladoras (Fujihashi *et al.*, 1990) y citotóxicas (Wilson *et al.*, 1986a) de estas células.

## **G. Células accesorias**

### **1. Macrófagos intestinales en el cerdo adulto**

Los macrófagos se encuentran en la LP intestinal, en números inferiores a las CD2+. Hay más macrófagos en ileon que en el duodeno y la densidad de estas células en criptas es mayor que en las vellosidades (Vega-López *et al.*, 1993). Estas células al ser activadas *in vitro* en sangre periférica, son capaces de expresar antígenos de clase II y receptores para interleucina-2 (IL-2) en su superficie (Austyn, 1989). En cerdos de más de 6 meses se ha demostrado que hasta 30% de los M $\phi$ /PMN de la LP de las criptas, expresan el receptor IL-2, sin embargo la mayoría de los M $\phi$  intestinales no expresan antígenos de clase II (Vega-López *et al.*, 1993).

En cerdos después del nacimiento los M $\phi$ /PMN se localizan principalmente en las criptas y en mayor número en el ileon y su distribución es diferente a la de las células



**MHC II+ . En las criptas, la llegada del antígeno es menos probable, por lo que su acción como CPA no es plausible (Vega-López, 1994).**

## **2. Células presentadoras de antígeno (CPA)**

**La propiedad de presentación de antígenos en el sistema inmune la poseen una gran variedad de células. Sin embargo los tipos celulares “profesionales” involucrados son los macrófagos, dendrocitos y células B. Estas CPA, presentan antígeno asociado a moléculas del MHC clase I ó clase II, además de que proveen de función accesoria a células T.**

**La participación de las células del sistema inmune en las parasitosis se ha estudiado ampliamente en roedores donde hasta la fecha se ha demostrado que la mayoría de las respuestas intestinales a helmintos son del tipo  $T_H2$  (Grencis *et al.*, 1991; Hermanek *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 1995 y Ramaswamy *et al.*, 1996) con predominio de la expresión de IL-4, sin embargo la expulsión temprana de parásitos se relaciona también con un aumento en la producción local de IFN- $\gamma$  (Ramaswamy *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 1996), componente típico de la respuesta TH1. En el caso del cerdo que es la fuente principal de la zoonosis por *T. spiralis*, existen muchas incógnitas en cuanto a la participación de las células del sistema inmune a nivel intestinal.**

## **II. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de que el sistema inmune de las mucosas posee los mismos componentes que el sistémico, se sabe que existen diferencias importantes en cuanto a su función y regulación (Kioyono *et al.*, 1992). Estas diferencias incluyen la interacción entre la naturaleza y distribución del tejido linfoide, la presentación de los antígenos, células regulatorias, secreción de ciertas clases de inmunoglobulinas, células cebadas y señales neuroendócrinas (Bienenstock *et al.*, 1987).

El desarrollo, distribución y número de células del sistema inmune intestinal porcino y la presencia y organización estructural de todos los tipos celulares necesarios para la respuesta inmune ya se han descrito para cerdos jóvenes de menos de 7 semanas y adultos de más de 6 meses, así mismo se sabe acerca de la cinética de migración de las poblaciones celulares en el epitelio y en la lámina propia intestinal durante el desarrollo animal y los cambios que ocurren en el órgano ante variaciones en el medio ambiente (destete) (Vega-López *et al.*, 1993;1995).

Es indispensable completar el conocimiento sobre la diferenciación y función de los componentes del sistema inmune en cerdos mayores de 6 semanas de edad, así como entender los mecanismos que lo regulan. También es necesario ampliar la información de las interacciones de los componentes del sistema inmune ante la presencia de agentes infecciosos. Por lo que la fase entérica del ciclo de vida de *Trichinella spiralis* resulta ser un modelo adecuado para el estudio de la respuesta inmune intestinal.

## **III. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la respuesta inmune intestinal en el cerdo después del destete (6-12 semanas) ante la infección experimental con *Trichinella spiralis*.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar la maduración del sistema inmune intestinal en cerdos destetados de 6 a 12 semanas de edad.
- Describir morfológicamente las poblaciones de células del sistema inmune intestinal ante la infección experimental con *Trichinella spiralis*.
- Analizar la respuesta *in vitro* de las células del sistema inmune intestinal a antígenos de *Trichinella spiralis*.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **a. Obtención de LM de *T. spiralis***

Se obtuvieron larvas musculares (LM) de una cepa de *T. spiralis* (mantenida en el laboratorio por pases continuos en rata) a partir de tejido muscular de ratas Wistar infectadas experimentalmente de acuerdo a la técnica descrita por Dennis y cols. en 1970 con algunas modificaciones. Las ratas se sacrificaron bajo anestesia general utilizando cloroformo, se obtuvo el músculo esquelético y tejido óseo que se maceró finamente en una procesadora de alimentos (Moulinex). El macerado se incubó en solución de 1% de pepsina en HCl al 1% a razón de 10 ml/g de carne, con agitación constante (200 rpm) a 37°C por 3 hr.

Transcurrida la incubación, la mezcla se pasó a través de un tamiz y se vertió a un embudo, en cuyo extremo, se colocó una manguera unida a un tubo Falcon de 15 ml para que permitiera la sedimentación de las LM. El sobrenadante del tubo se decantó y las LM del fondo, se lavaron con amortiguador de fosfatos salino (PBS) (ver anexo I) por centrifugación a 1800 x g por 3 min. en una centrifuga clínica (Damon IEC/División) hasta que el sobrenadante estuviera claro.

Posteriormente, del paquete de larvas se hizo una dilución 1:100 en bacto agar al 0.2% y se tomaron alicuotas de 10µl para su conteo. Finalmente se determinó el número de larvas por gramo de macerado para utilizarse en la infección de los animales durante el

experimento. Así mismo el paquete de larvas obtenido, fue utilizado para la obtención de antígeno crudo.

#### **b. Preparación del extracto total de antígenos de *T. spiralis***

El extracto total de antígenos de LM de *T. spiralis* se obtuvo siguiendo el método reportado por Parkhouse y cols. en 1981 con modificaciones. Paquetes de aproximadamente un gramo de LM se homogeneizaron en forma manual con el mínimo volumen posible de PBS estéril con 40µg/ml de Gentamicina (Lab. Hormona, S.A.) todo esto en hielo y bajo campana de flujo laminar. La homogenización se hizo durante 20 min seguido de un descanso de 15 min, para finalizar con otro ciclo de homogenización de 20 min. Para clarificar, el lisado obtenido se recuperó con pipeta Pasteur y se colocó en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. La centrifugación se realizó a 9 000 x g, durante 30 min a 4°C.

El sobrenadante obtenido se colocó en tubos estériles y se conservó en frío hasta la determinación de proteínas que se realizó con el método descrito por Bradford en 1976. El antígeno se alicuotó y congeló a -70 C hasta su uso.

#### **c. Animales**

Se utilizaron 5 camadas de 10 cerdos destetados cada una, de la raza Hampshire x Landrace de aproximadamente 6 semanas de edad y provenientes de una granja libre de enfermedades endémicas y que no vacuna a sus animales.

Cada camada se dividió en dos grupos (cinco animales control y cinco infectados) los cuales se mantuvieron en jaulas por separado dentro de las instalaciones del bioterio del CINVESTAV-IPN.

Los animales se infectaron con carne de rata con LM de *Trichinella spiralis* a una dosis aproximada de 700 LM/kg de peso y se sacrificó un animal del grupo control y otro del grupo infectado, los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección, para lo cual se utilizó una sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico (Anestesa/Smithkline Beecham).

## **ESTUDIO MORFOMÉTRICO**

### **Toma de muestras**

Se tomaron muestras de intestino delgado proximal provenientes de los animales control y con *T. spiralis* los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección. Las muestras fueron de una longitud aproximada de 2 a 3 cm., contiguos a la zona utilizada para el ensayo de proliferación. Estas se depositaron inmediatamente en viales que contenían una solución crioprotectora (IEC/USA) y se sumergieron en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta la realización de los cortes histológicos.

### **Cortes histológicos**

Se realizaron 4 cortes histológicos seriados de muestras congeladas en cada laminilla a partir de muestras de intestino delgado en su porción proximal. Se hicieron cortes de 4µm de espesor en un crióstato (MINOTOME, International Equipment Company) y se depositaron en laminillas precubiertas con poli-L-lisina (Sigma Chemical Co.) al 0.1%. Las muestras se fijaron con acetona durante 10 min, se secaron al aire y se conservaron a -70°C hasta ser utilizadas.

### **Anticuerpos monoclonales**

Para la técnica de inmunoperoxidasa (Avidina-Biotina) se utilizó un panel de anticuerpos monoclonales (AbM) para linfocitos T anti-CD2, CD4 y CD8 (Panel de T).

Dichos anticuerpos fueron obtenidos a partir de hibridomas que fueron donados por la Dra. Joan K. Lunney, Immunology and Disease Resistance Lab. LPSI, ARS, USDA, y la Dra. Karin Haverson, University of Bristol. La descripción de cada una de las clonas utilizadas se incluye en la tabla 1.

TABLA 1		
PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LINFOCITOS T		
ESPECIFICIDAD	CLONA	ISOTIPO
CD2	MSA-4	IgG2b
CD4	74-12-4	IgG2b
CD8	MIL-12 (288A1)	IgG2a

## TINCIÓN CON LA TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA (AVIDINA-BIOTINA)

(Para muestras congeladas)

### I.- Hidratación de las muestras

Las muestras se colocaron durante 10 min en solución salina Tris-bufferada (TBS) (ver anexo II) para la eliminación de la solución crioprotectora e hidratación de las mismas.

### II.- Bloqueo de peroxidasa endógena

Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, las secciones del tejido se trataron con metanol absoluto con 2.5 % de  $H_2O_2$  durante 60 min a temperatura ambiente (TA). Al finalizar se lavaron las laminillas 3 veces por 5 min c/u en TBS.

### **III.- Protocolo de tinción**

Para la siguiente técnica se utilizó un Kit HistoMark de KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. cat.71-0018) streptavidin-HRP Systems.

#### **Aplicación del suero de bloqueo**

Se cubrieron las preparaciones completamente con Suero Normal de Cabra y se incubaron por 1 hr a TA dentro de una cámara húmeda.

#### **IV.- Aplicación del anticuerpo primario**

Se decantó el suero de bloqueo sin lavar y se limpió perfectamente el exceso de suero de los bordes del tejido. Las preparaciones se cubrieron con el respectivo anticuerpo primario y se incubaron durante 2 hrs a TA, dentro de una cámara húmeda. Al finalizar este paso se lavaron con TBS 3 veces durante 5 min c/u.

#### **V.- Aplicación del anticuerpo biotilado**

Se secó completamente el TBS de los bordes del tejido y la preparación se cubrió con el anticuerpo (de cabra anti-IgG de ratón) biotilado para incubar a TA por 1 hr en cámara húmeda, posterior a esto se lavó con TBS 3 veces durante 5 min c/u.

#### **VI.- Aplicación de la estreptavidina-peroxidasa**

Se limpiaron los bordes del tejido del TBS de lavado y la muestra se cubrió con la Estreptavidina-Peroxidasa y se incubaron durante 1 hr en cámara húmeda a TA. Al final se lavaron con TBS 3 veces durante 5 min c/u.

## **VII.- Aplicación de la diaminobenzidina (DAB)**

Se secaron perfectamente los bordes de la muestra del TBS de lavado y se aplicó la DAB (ver anexo II). Se esperaron unos segundos a que se observara la reacción al microscopio óptico y se lavaron las muestras en TBS 3 veces por 5 min c/u.

## **VIII.- Contrateñido**

El contraste al tejido se realizó con solución de Hematoxilina (ver anexo II), durante 30 seg. La laminilla se lavó con agua corriente y se pasó por unos segundos por alcohol ácido y se lavó con agua corriente. Se realizó la deshidratación de la muestra con alcoholes (70, 90 y 100%), durante 5 min c/u y posteriormente el aclaramiento de tejido con xileno por 5 min.

## **IX.- Montaje**

Para el montaje de las muestras se utilizó medio Micromount, Surgipath., USA.

## **DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS**

Las células se contaron utilizando un sistema de análisis de imágenes por computadora semi-automático y de alta resolución (VIDS V, Analytical Measuring Systems, Essex, England), el cual permite ver la imagen de las muestras vistas a través de un microscopio sobre un monitor a color.

Con este sistema fue posible contar las células positivas y medir con exactitud el área de tejido en donde aparecieron. Los resultados se expresaron como densidad de células (células/unidad de área) en el tejido.

Para la muestra de intestino delgado proximal se definieron dos áreas distintas: la lámina propia (LP) de las vellosidades y la LP de las criptas. Se descartó la zona del



epitelio de las vellosidades y el epitelio de las glándulas respectivamente y se contaron al menos 5 campos de cada área seleccionada en cada muestra de tejido.

Se compararon los datos obtenidos entre estas dos localizaciones y entre los animales control y los infectados con *T. spiralis*. Posteriormente se realizó el análisis de varianza de los datos obtenidos

## **ENSAYO DE PROLIFERACIÓN**

### **Toma de muestras**

Se obtuvieron muestras de sangre y bazo para la evaluación de la inmunidad sistémica así como de ganglio linfático mesentérico (GLM) e intestino delgado en su porción proximal para la evaluación de la inmunidad local. En todos los pasos llevados a cabo para la toma de muestras y la separación de linfocitos se emplearon material y soluciones estériles y las muestras fueron manejadas bajo campana de flujo laminar. Sangre.- Antes del sacrificio de cada animal se tomaron de 20 a 30 ml de sangre por punción venosa en tubos estériles con heparina 100 UI/ml (vacutainer).

La necropsia se realizó inmediatamente después del sacrificio de los animales y la toma de muestras se realizó bajo los principios de asepsia correspondientes.

Bazo.- Se tomaron aproximadamente 5 g del bazo de cada animal. Se colocaron por separado (el control e infectado) dentro de frascos con 50 ml de RPMI incompleto (ver anexo I), y se mantuvieron a 4°C (baño de hielo) hasta su procesamiento

GLM.- De cada cerdo se tomaron de cuatro a cinco ganglios próximos a la zona del duodeno, los cuales se colocaron en 50 ml de RPMI completado con 10% de suero fetal bovino (SFB), (ver anexo I), para su transporte.

Intestino.- Se obtuvieron aproximadamente de 10 a 12 cm. de la porción proximal del intestino delgado a partir del piloro. Antes de hacer la separación de la víscera, se ligaron los extremos a cortar con hilo cáñamo, para evitar la contaminación o contacto con tejidos adyacentes. Las muestras se colocaron en 200 ml de solución balanceada de Hanks (HBSS) sin Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> (ver anexo I) que contenía 40µg/ml de gentamicina.

## **Separación de células**

### **Sangre**

La sangre se diluyó 1:2 con RPMI incompleto en tubos Falcon de 15 ml. Se colocó en un gradiente de Ficoll-Diatrizoato de sodio (ver anexo I) ( $\rho = 1.077 \text{ g/l}$ ), y se centrifugó a  $900 \times g$  en un equipo Beckman/ Modelo TJ-6 a temperatura ambiente durante 30 min. Las células de la interfase del gradiente, se recuperaron y resuspendieron en medio RPMI completo y se conservaron en hielo hasta su cultivo.

### **Bazo**

El tejido se cortó en fragmentos pequeños que se maceraron sobre una malla de acero inoxidable estéril utilizando RPMI incompleto. El material se pasó por organza estéril hacia tubos Falcon de 50 ml, se diluyó 1:10 con RPMI incompleto y se colocó en un gradiente de Ficoll-Hypaque siguiendo el protocolo descrito para sangre.

### **GLM**

La muestra fue macerada de la misma forma en que se procesó el bazo, utilizando RPMI incompleto. Las células se pasaron por organza estéril a tubos Falcon de 50 ml, se lavaron con RPMI incompleto y se resuspendieron en RPMI completo, manteniéndose en hielo hasta su cultivo.

### **Intestino**

Se separaron linfocitos intraepiteliales (LIE) y linfocitos de lámina propia (LLP) de la porción proximal del intestino delgado.

La técnica consistió en ligar firmemente uno de los extremos de la víscera con hilo cáñamo y evertirla de tal manera que la mucosa quedara expuesta. Se llenó con HBSS sin  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  (ver anexo I) hasta que los pliegues de la mucosa se distendieran. Se ligó el extremo libre y la víscera fue colocada en un recipiente con 200 ml de HBSS sin  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Se realizó un prelavado en una incubadora con agitación (mod. G25/ Scientific Co.,

INC) a 200 rpm durante 15 min a 37°C. Al término de esta fase, se tiró el sobrenadante y se inició la obtención de los LIE.

Para la obtención de los LIE se efectuaron tres lavados secuenciales del intestino en la incubadora de agitación utilizando HBSS con EDTA 1 mM (ver anexo I) a 200 rpm por 75 min a 37 °C para cada lavado. Se colectó el sobrenadante de cada uno de los lavados y se centrifugó a 150 x g durante 3 min a TA en una centrifuga clínica (Clay Adams/ Becton Dickinson and Co.) y el paquete de células que se obtuvo se resuspendió en Percoll isotónico al 40%, mismo que se estratificó sobre Percoll al 80% ( ver anexo I), en una proporción de 3:1. El gradiente se centrifugó a 900 x g durante 30 min a TA y de la interfase se separaron las células que se resuspendieron en RPMI completo.

Para separar los LLP la misma porción de intestino se sometió posteriormente a dos lavados más utilizando RPMI incompleto al que se le adicionó colagenasa Tipo V (cat. C-9263/Sigma Chemical Co.) a una dosis de 100 U/ml. Los paquetes de células obtenidos de los sobrenadantes se trataron del mismo modo descrito para los LIE hasta su cultivo (fig.2).

### **Cultivo de Células**

Antes del cultivo se determinó el porcentaje de viabilidad en las células separadas utilizando Azul de Tripano al 2% (ver anexo I) y el conteo se realizó en una cámara de Neubauer, donde todas las suspensiones de células tuvieron viabilidad  $\geq 90\%$ .

En 3 microplacas de cultivo de 96 pozos (Linbro, Flow Laboratories, Inc.), las que se dividieron en dos partes, se colocaron por triplicado los linfocitos de sangre, bazo, GLM así como LIE y de LP de intestino tanto de los animales control como de los infectados, a razón de  $10 \times 10^4$  células/pozo según el método propuesto por Castillo en 1997 (fig. 3).

En la microplaca 1 se adicionaron los mitógenos concanavalina A tipo IV-S (*Canavalia ensiformis*, ConA, Sigma chemical Co., cat. C-0412) y fitohemaglutinina (*Phaseolus vulgaris*, PHA, Sigma Chemical Co., cat. L-9132), como estimuladores de linfocitos T. En la microplaca 2 se incluyó el mitógeno de Pokeweed (*Phytolacca americana*, PWM, Sigma Chemical Co., cat. L-8777), para la estimulación de linfocitos B

y los triplicados para el cultivo control sin mitógeno (basal) utilizando únicamente RPMI completo.

Los mitógenos se utilizaron a una concentración de 2.5 µg/ml (Castillo, 1997) por 72 hrs a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

La microplaca 3 se utilizó para el cultivo de células en presencia de antígeno total de LM de *Trichinella spiralis* (AgTLMT.sp) a una concentración de 50 µg/ml (Castillo, 1997) durante 96 hrs bajo las mismas condiciones que las anteriores (fig. 3).

Para evaluar la respuesta proliferativa se adicionaron 50 µl de solución madre de Timidina-<sup>3</sup>H (ver anexo I) a una concentración de 0.5 µCi/pozo 12 hrs antes de cosechar las células, La cosecha se efectuó por medio de un colector manual (Nunc Cell Harvester 8) sobre papel de fibra de vidrio (Whatman., cat. 934-AH) y se hicieron lavados de las microplacas con agua destilada. Posteriormente el papel se dejó secar al aire y cada disco/muestra se colocó en viales de microcentrifuga de 1.5 ml. a las que se adicionó 1 ml. de líquido de centelleo (ver anexo I). Cada vial se midió en un Contador de Centelleo (Beckman LS 6000SC, USA) y se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) de las células estimuladas (con mitógeno ó AgTLMT.sp) de los animales control e infectados y las cpm de las células no estimuladas de los mismos animales.

El promedio de los resultados obtenidos en los triplicados de los cultivos, en cpm se transformaron en índices de estimulación (I.E.) según la siguiente fórmula:

$$\text{*Índice de Estimulación (I.E.)} = \frac{\text{cpm estimulado}}{\text{cpm basal}}$$

Los I.E. de los 5 experimentos (E1, E2, E3, E4 y E5) se promediaron y se obtuvieron las desviaciones estándar (D.E.).

\* Se considera que hubo estimulación de los linfocitos cuando el I.E. es igual o mayor a 1.5 (Morilla, 1986).

## SEPARACIÓN DE CÉLULAS DE INTESTINO DELGADO PROXIMAL

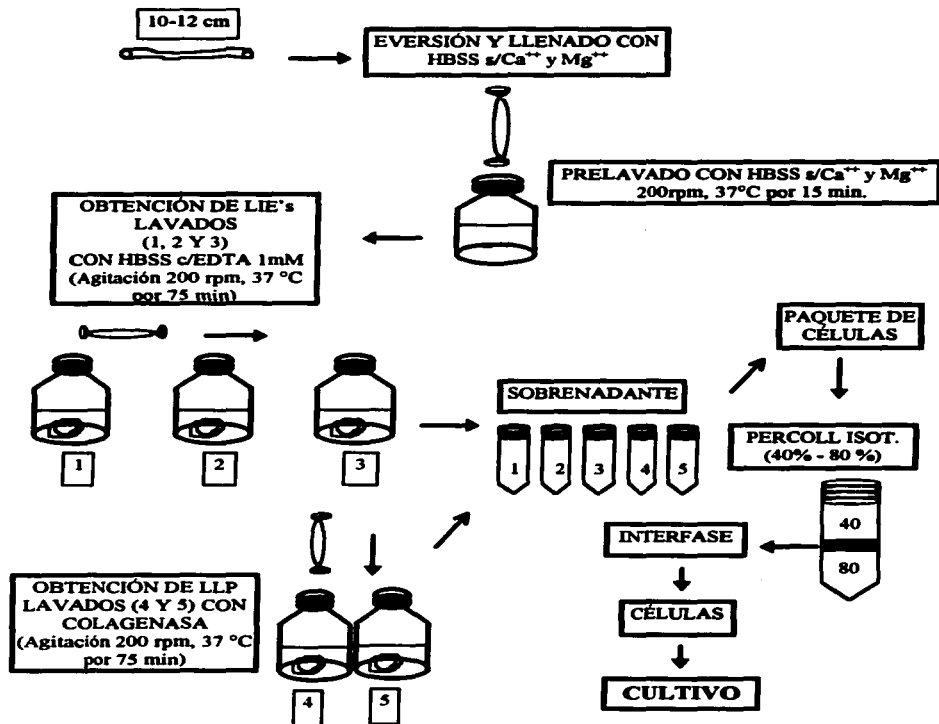


Fig. 2 Protocolo de separación de linfocitos intraepiteliales (LIE) y de lámina propia (LLP) del intestino delgado proximal (modificado de Haverson, 1994).

Fig. 3

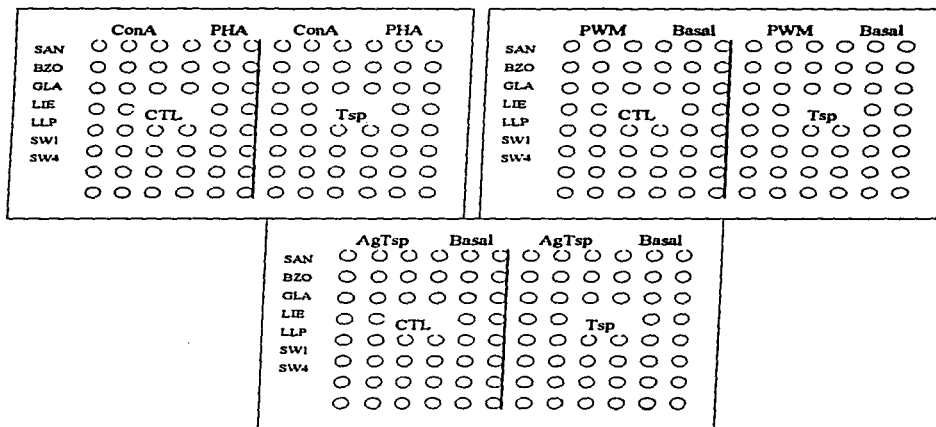


Fig. 3 Diagrama del ordenamiento por tripletes de las células obtenidas de cada órgano para su cultivo. Las placas 1 y 2 contienen células de los animales control (CTL) e infectados (Tsp.), las cuales fueron estimuladas con concanavalina A (ConA), fitohemaglutinina (PHA-P) y fitolaca americana (PWM) a una concentración de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  por 72 hrs. Se incluyeron en la placa 2 triplicados de células sin estimular (Basal). En la placa 3 se adicionó antígeno total de la LM de *Trichinella spiralis* (AgTLMTsp.) a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  durante 96 hrs incluyendo sus basales.

## **V. RESULTADOS**

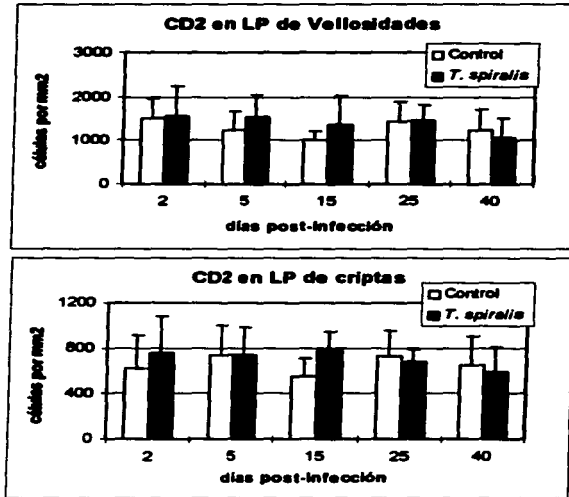
### **ESTUDIO MORFOMÉTRICO**

Las células CD2+ detectadas por el AbM MSA-4 en la LP de las vellosidades (fig. 4) estuvieron en un rango de  $1018 \pm 186$  a  $1508 \pm 459$  para los animales control y de  $1052 \pm 462$  a  $1556 \pm 695$  en los cerdos infectados y a nivel de LP de las criptas en un rango de  $549 \pm 159$  a  $735 \pm 270$  en los controles y de  $587 \pm 224$  a  $785 \pm 163$  en los infectados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos control e infectados, ni en cuanto al tiempo de infección (gráfica 1).

Las células CD4+ detectadas por el AbM 74-12-4 en la LP de las vellosidades (fig. 5) estuvieron en un rango de  $122 \pm 47$  a  $232 \pm 207$  para los animales control y de  $113 \pm 89$  a  $252 \pm 266$  para los infectados a nivel de LP de criptas de  $181 \pm 81$  a  $333 \pm 132$  en los animales control y de  $191 \pm 67$  a  $287 \pm 349$  en los infectados. Tampoco se observaron diferencias significativas entre grupos ni a diferentes días post-infección (gráfica 2).

En el caso de las células CD8+ detectadas con el AbM MIL-12 (288A-1), los valores en densidad de células en la LP de las vellosidades (fig. 5) se presentaron en un rango de  $327 \pm 126$  a  $679 \pm 309$  en los animales control y de  $425 \pm 109$  a  $665 \pm 259$  en los infectados. En la LP de las criptas el rango obtenido fue de  $164 \pm 81$  a  $259 \pm 136$  para los controles y de  $193 \pm 101$  a  $258 \pm 37$  en los animales infectados. No se detectaron diferencias significativas entre el grupo control y el infectado ni a los diferentes días post-infección (gráfica 3).

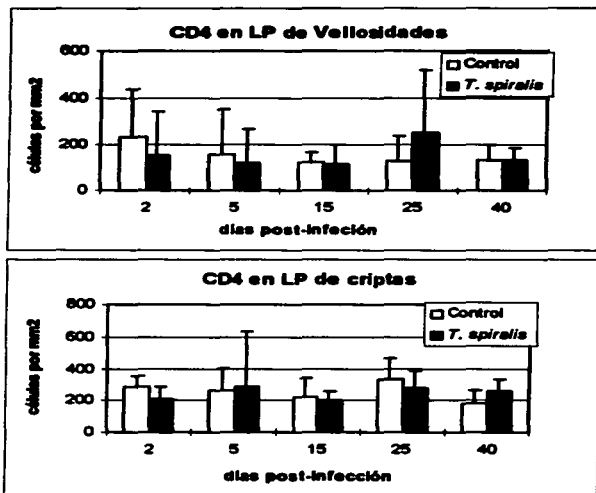
Gráfica 1



Gráfica 1. Densidad de células CD2+ por mm<sup>2</sup> en la lámina propia (LP) de las vellosidades y la LP de las criptas en cerdos control e infectados con *T. spiralis* los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección. Cada barra corresponde al promedio de las medias de 6 animales  $\pm$  su desviación estándar tomadas de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente a una magnificación de 200X.

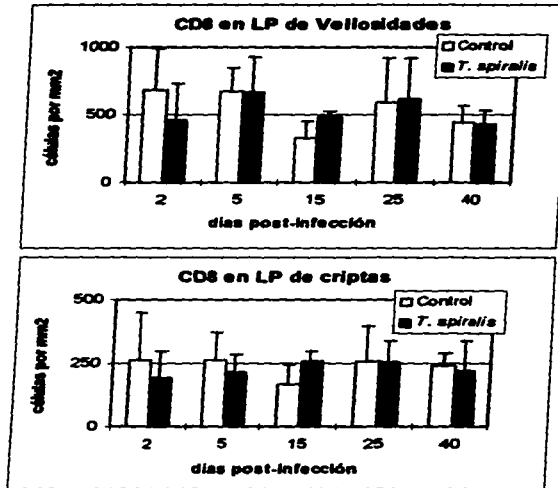


Gráfica 2



Gráfica 2. Densidad de células CD4+ por mm<sup>2</sup> en la lámina propia (LP) de las vellosidades y la LP de las criptas en cerdos control e infectados con *T. spiralis* los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección. Cada barra corresponde al promedio de las medias de 6 animales ± su desviación estándar tomadas de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente a una magnificación de 200X.

Gráfica 3



Gráfica 3. Densidad de células CD8+ por mm<sup>2</sup> en la lámina propia (LP) de las vellosidades y la LP de las criptas en cerdos control e infectados con *T. spiralis* los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección. Cada barra corresponde al promedio de las medias de 6 animales  $\pm$  su desviación estándar tomadas de 5 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente a una magnificación de 200X.

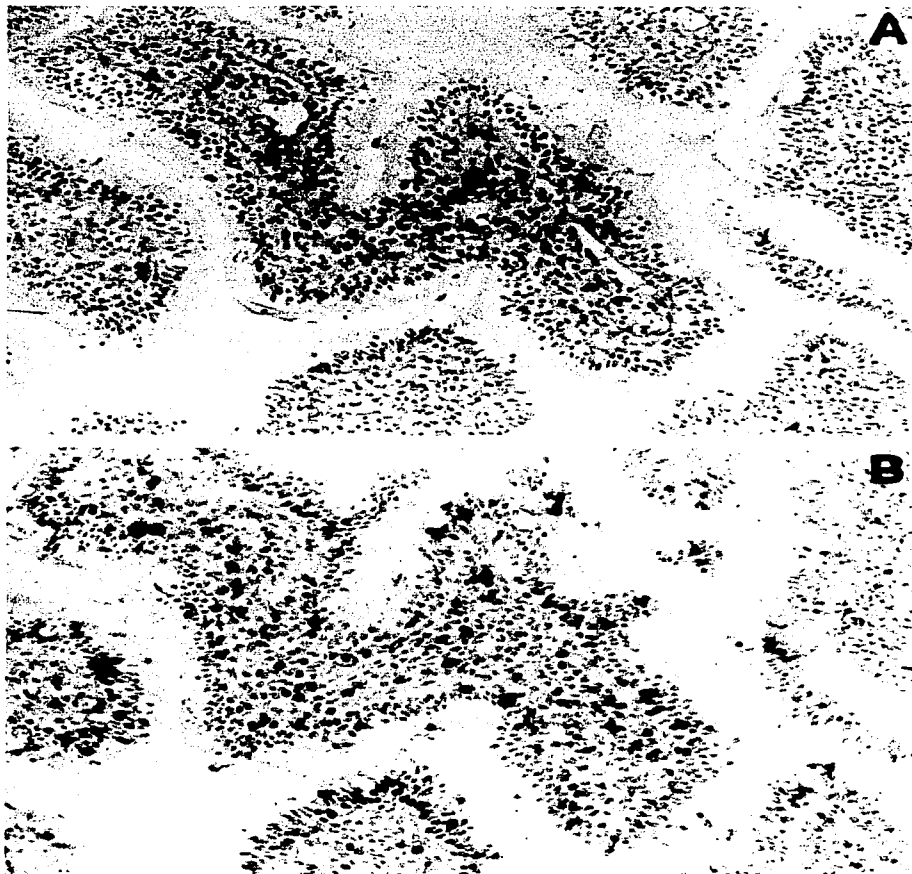


Fig. 4. Tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) en cortes congelados de intestino delgado proximal de cerdo a los 15 días post infección con *T. spiralis*. (A) Control de tinción con PBS (B) Sección transversal de las vellosidades intestinales teñidas con el AbM contra CD2+ (MSA-4) El contrateñido se realizó con hematoxilina de Harris(200x).

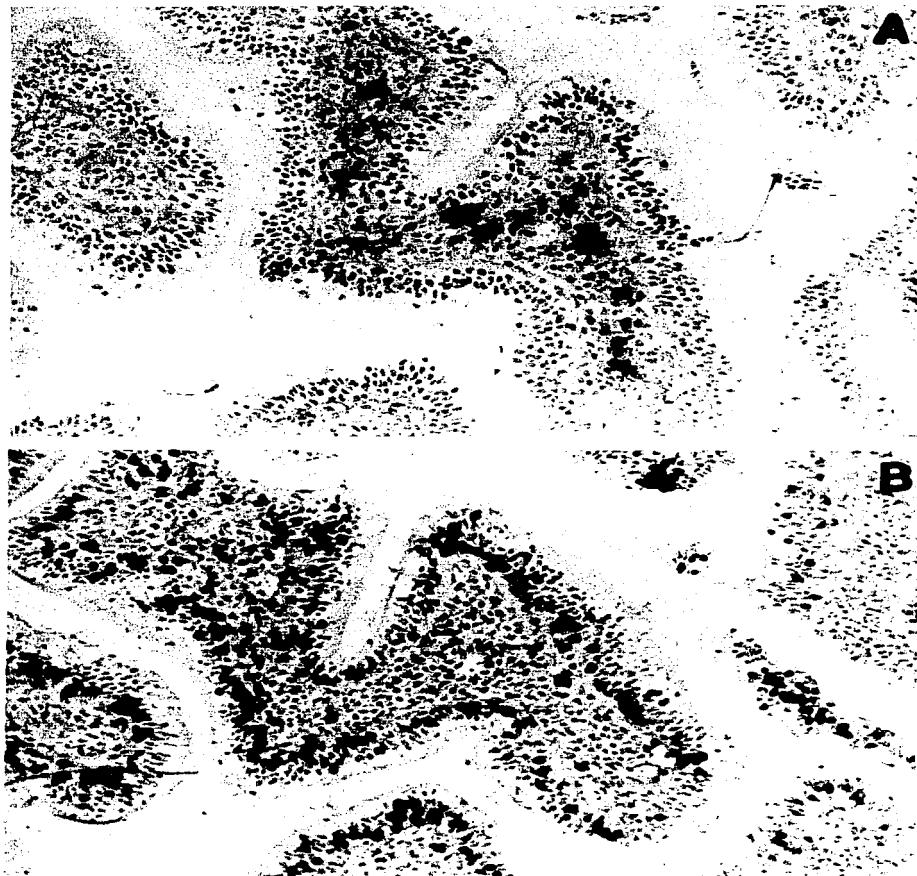


Fig. 5. Tinción inmunohistoquímica de peroxidasa (Avidina-Biotina) en cortes congelados de intestino delgado proximal de cerdo a los 15 días post infección con *T. spiralis*. (A) Sección transversal de las vellosidades intestinales teñidas con el AbM contra CD4+ (74-12-4) (B). Sección de tejido teñida con el AbM contra CD8+ (MIL-12). El contrateñido se realizó con hematoxilina de Harris. (200x)

## ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

### I. Respuesta a mitógenos

En el cuadro 1 se muestra el I.E. obtenido de linfocitos de sangre de los animales control e infectados, cultivados con ConA así como los promedios y D.E. En general la respuesta que se obtuvo fue buena con promedios de I.E. en el rango de  $35.5 \pm 39.5$  a  $172.5 \pm 142.4$  en los animales control y de  $20.4 \pm 26.5$  a  $126.4 \pm 94.1$  en los infectados. No se observaron diferencias significativa a lo largo del experimento ni tampoco entre los grupos control e infectados. En el análisis de los datos individuales, para cada uno de los experimentos (E1, E2, etc), se observaron algunos I.E. muy pobres como en el E5 día 40 del infectado (2.7) o ausentes como en el E3 del día 40 del control (0.4) lo que sugiere una alta variabilidad individual (cuadro 1).

En los datos obtenidos con células de bazo y estimuladas con ConA, se observaron valores de I.E más homogéneos que no superaron los obtenidos en sangre. Estos fueron de  $14.1 \pm 14.1$  a  $73.9 \pm 127.3$  en los animales control y de  $17.0 \pm 11.0$  a  $38.8 \pm 55.4$  en los infectados y no se observaron diferencias a los distintos días post-infección o entre los grupos control e infectados (cuadro 1).

En la evaluación de la respuesta proliferativa local, los datos promedio obtenidos en epitelio con ConA, se observaron en el rango de  $1.5 \pm 1.0$  a  $2.4 \pm 1.3$  de I.E. en los animales control y de  $1.4 \pm 0.4$  a  $64.8 \pm 142.7$  en los infectados. En el caso del E2 día 5 del animal infectado se presentó un I.E. muy alto (320.1) que no corresponde a los valores que en general se observaron en el cuadro y que por consiguiente incrementaron el promedio (64.8) y D.E. (142.7) (cuadro 2).

En el caso de la lámina propia los I.E. estuvieron en el rango de  $1.24 \pm 0.94$  a  $9.34 \pm 14.1$  para los animales control y de  $1.48 \pm 0.39$  a  $10.9 \pm 18.92$  en los infectados, que fueron ligeramente mas altos a los observados en epitelio (cuadro 2).

Para los linfocitos de GLM los valores fueron muy similares a los obtenidos en epitelio y lámina propia, el promedio de los datos tuvieron un rango de  $0.7 \pm 0.2$  a  $2.9 \pm 3.4$

para los animales control y de  $0.9 \pm 0.39$  a  $2.9 \pm 3.2$  en los infectados y tampoco se observaron diferencias con la edad de los animales y entre grupos (cuadro 3).

Con respecto a la respuesta proliferativa de linfocitos de sangre a fitohemaglutinina (PHA), se obtuvieron rangos de respuesta promedio en I.E. de  $28.7 \pm 27.0$  a  $213.3 \pm 70.5$  en los animales control y de  $35.8 \pm 37.9$  a  $109.9 \pm 20.5$  en los animales infectados similares a los obtenidos con ConA. Los promedios de I.E. del bazo con PHA estuvieron en el rango de  $13.2 \pm 5.5$  a  $101.2 \pm 132.7$  en los controles y de  $17.6 \pm 11.6$  a  $95.5 \pm 141.2$  en los infectados. No se observaron diferencias estadísticamente significantes entre los controles y los infectados ni con respecto a la edad a lo largo de la infección y también se observó una gran variabilidad individual en la respuesta (cuadro 4).

La respuesta proliferativa de los LIE con PHA fue de pobre a ligera con promedios de I.E. dentro de un rango de  $2.7 \pm 3.5$  a  $14.6 \pm 14.9$  en los animales control y de  $1.0 \pm 0.4$  a  $117.7 \pm 200.1$  en los infectados. El valor de I.E. en el E2 d5 del infectado (348.7) podría indicar un efecto individual que se observó (cuadro 5) también con ConA (320.1) (cuadro 2) y amplía el rango en los infectados, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significantes entre los animales control y los infectados, ni entre edades a los diferentes días post-infección.

El valor promedio de I.E. en LLP a PHA, indica una respuesta baja a ligera con un rango de  $1.1 \pm 0.6$  a  $23.9 \pm 39.0$  en los controles y de  $2.2 \pm 0.4$  a  $8.0 \pm 11.3$  en los animales infectados. En el mismo cuadro se observaron valores altos como en el E2 d5 del infectado (21.1) y E2 d25 del control (69) que influyeron sobre los promedios. No hubo diferencia significativa entre grupos ni entre edades (cuadro 5).

En el caso de los linfocitos de GLM con PHA se encontraron I.E. entre  $4.8 \pm 1.6$  a  $217.9 \pm 236.2$  en los animales control y de  $4.4 \pm 3.5$  a  $150.0 \pm 232.1$  en los infectados, valores que fueron parecidos a los obtenidos en la respuesta sistémica de sangre y bazo y que difieren de los observados en linfocitos de GLM con ConA (gráfica 6).

Cuadro 1

<b>LINFOCITOS DE SANGRE con ConA</b>						
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	E1	E2	E3	E4	E5	media±D.E.
2 ctl	113.2	29.1	8.6	90.2	19.9	52.2±46.5
2 tsp	107.5	103.3	72.7	29.9	55.8	73.84±32.6
5 ctl	391.4	203	91.6	163.9	12.5	172.48±142.4
5 tsp	243.7	177.2	64	142.9	4.2	126.4±94.1
15 ctl	4.1	30.3	158.6	38.4	3.7	47.02±64.3
15 tsp	243.7	22	100.4	42.8	11.2	84.02±95.7
25 ctl	3.7	322.3	40.4	3.7	1.4	74.3±139.6
25 tsp	22	3.8	65.8	3.3	7.2	20.42±26.5
40 ctl	72.8	18.1	0.4	83	3.2	35.5±39.5
40 tsp	3.8	76.8	3.3	133.6	2.7	44.04±59.3
<b>LINFOCITOS DE BAZO con ConA</b>						
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	E1	E2	E3	E4	E5	media±D.E.
2 ctl	26.4	np	2.4	26.1	1.3	14.05±14.1
2 tsp	17.5	33.5	18.5	12.4	3.3	17.04±11.0
5 ctl	47.8	32.8	1.7	18.3	1.7	20.46±20.1
5 tsp	136.8	23.6	18.8	13.9	1	38.82±55.4
15 ctl	10.1	17.8	53.7	41.1	1.3	24.8±21.9
15 tsp	10	41.8	17.2	18.8	1	17.76±15.2
25 ctl	20.2	299.3	45.9	2.8	1.4	73.92±127.3
25 tsp	2.7	66.2	23.4	1.6	1.8	19.14±27.9
40 ctl	44.2	3.5	49.9	1.5	1.2	20.06±24.7
40 tsp	38.3	4.9	5.6	30.1	48.4	25.46±19.6

Cuadro 1. Respuesta proliferativa de linfocitos sanguíneos y de bazo (en I.E.), obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de ConA durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 5 experimentos (E1 a E5), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.). Las celdas np corresponden a muestras no procesadas.

Cuadro 2

<b>LINFOCITOS INTRAEPITELIALES (LIE) con ConA</b>						
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	E1	E2	E3	E4	E5	media± D.E.
2 ctl	0.9	1.8	3.2	0.9	3.1	2.0±1.1
2 tsp	0.6	0.8	1.2	5.1	0.7	1.7±1.9
5 ctl	0.4	1.7	3.7	3.1	2.9	2.4±1.3
5 tsp	1.2	320.1	0.6	1.5	0.6	64.8±142.7
15 ctl	2.2	0.4	2.1	2.7	4.2	2.3±1.4
15 tsp	1.7	1	1.1	2	1.1	1.4±0.4
25 ctl	1.2	2.1	3.7	2	1.4	2.1±1.0
25 tsp	1.3	1.5	1	4.5	1	1.9±1.5
40 ctl	1.1	3.1	0.4	1.1	2	1.5±1.0
40 tsp	2.3	1	3.6	1.6	1	1.9±1.1
<b>LINFOCITOS DE LÁMINA PROPIA (LLP) con Con A</b>						
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	E1	E2	E3	E4	E5	media± D.E.
2 ctl	0.7	1.4	1.4	2.5	1.6	1.52±0.58
2 tsp	1.3	1.9	1.1	1.1	2	1.48±0.39
5 ctl	2.8	2.7	13.3	3.4	1.7	4.78±4.29
5 tsp	1	48.7	1.3	1.7	1.6	10.86±18.92
15 ctl	3	0.5	0.8	0.5	1.4	1.24±0.94
15 tsp	1.9	3.3	3.3	1	1.4	2.18±0.96
25 ctl	1.7	37.6	2.4	2	3	9.34±14.14
25 tsp	1.2	5.1	3	4.5	1.5	3.06±1.56
40 ctl	7.7	3	0.7	0.9	1	2.66±2.65
40 tsp	18.9	0.9	0.6	1.1	1.5	4.6±7.16

Cuadro 2. Respuesta proliferativa de LIE y LLP (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de ConA durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 5 experimentos (E1 a E5), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.).



Cuadro 3

LINFOCITOS DE GLM con Con A						
Días p.i.	EXPERIMENTOS					
	E1	E2	E3	E4	E5	media± D.E.
2 ctl	1.3	0.6	2	3.1	1.2	1.6±0.96
2 tsp	0.8	1.3	1.1	1.1	0.3	0.9±0.39
5 ctl	0.3	1.3	0.6	8.3	1	2.3±3.38
5 tsp	2	1.7	0.7	8.6	1.7	2.9±3.20
15 ctl	0.8	0.7	8.7	2.9	1.2	2.9±3.38
15 tsp	0.8	0.8	1.4	4.5	1.8	1.9±1.54
25 ctl	0.6	0.8	0.5	1.1	0.7	0.7±0.23
25 tsp	1.1	0.8	0.8	0.6	0.7	0.8±0.19
40 ctl	np	1.6	1.1	0.7	0.9	1.1±0.39
40 tsp	np	1.2	2	1.2	2.5	1.7±0.64

Cuadro 3. Respuesta proliferativa de linfocitos de GLM (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de ConA durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 5 experimentos (E1 a E5), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.). Las celdas np corresponden a muestras no procesadas.

Cuadro 4

<b>LINFOCITOS DE SANGRE con PHA</b>				
<b>Días p.i. EXPERIMENTOS</b>				
	E1	E2	E3	media± D.E.
2 ctl	30.1	33.3	86.4	49.9±31.6
2 tsp	91.1	131.7	106.9	109.9±20.5
5 ctl	280.3	219.8	139.8	213.3±70.5
5 tsp	222.7	0.7	103.8	109.1±111.1
15 ctl	4.9	67.4	153.1	75.1±74.4
15 tsp	72.5	101.9	58.3	77.6±22.2
5 ctl	4.8	195.3	36.4	78.8±102.1
25 tsp	2.7	150.7	31.2	61.5±78.5
40 ctl	55.6	28.9	1.7	28.7±27.0
40 tsp	78.7	21.9	6.8	35.8±37.9
<b>LINFOCITOS DE BAZO con PHA</b>				
<b>Días p.i. EXPERIMENTOS</b>				
	E1	E2	E3	media± D.E.
2 ctl	17.1	np	9.3	13.2±5.5
2 tsp	15.1	258.5	12.8	95.5±141.2
5 ctl	43.7	66.2	11.1	40.3±27.7
5 tsp	115.8	34.8	7.1	52.6±56.5
15 ctl	9.8	58.2	25.7	31.2±24.7
15 tsp	15.3	88.6	12.8	38.9±43.1
25 ctl	30.1	254.3	19.1	101.2±132.7
25 tsp	2.1	48.7	9.4	20.1±25.1
40 ctl	22.1	11	44.8	26.0±17.2
40 tsp	29.3	17.3	6.1	17.6±11.6

Cuadro 4. Respuesta proliferativa de linfocitos sanguíneos y de bazo (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PHA durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 3 experimentos (E1 a E3), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.). Las celdas np corresponden a muestras no procesadas.

Cuadro 5

<b>LIE con PHA</b>				
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>			
	E1	E2	E3	media± D.E.
2 ctl	0.6	0.8	6.7	2.7±3.5
2 tsp	0.5	1.1	1.3	1.0±0.4
5 ctl	0.7	4.6	5.1	3.5±2.4
5 tsp	2.8	348.7	1.5	117.7±200.1
15 ctl	2.5	10.1	31.2	14.6±14.9
15 tsp	8.1	1.9	3.6	4.5±3.2
25 ctl	1.5	17.4	1.7	6.9±9.1
25 tsp	1.2	2	0.7	1.3±0.7
40 ctl	32.1	3.3	1.8	12.4±17.1
40 tsp	17.4	0.9	7.9	8.7±8.3
<b>LLP con PHA</b>				
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>			
	E1	E2	E3	media± D.E.
2 ctl	0.8	0.8	1.8	1.1±0.6
2 tsp	1.7	2.4	2.5	2.2±0.4
5 ctl	7	1.7	2.5	3.7±2.9
5 tsp	1.4	21.1	1.5	8.0±11.3
15 ctl	4.5	0.5	5	3.3±2.5
15 tsp	3.8	2	2.8	2.9±0.9
25 ctl	1.5	69	1.3	23.9±39.0
25 tsp	1.4	5.5	2.6	3.2±2.1
40 ctl	6.4	3.8	1.2	3.8±2.6
40 tsp	22.3	0.8	0.7	7.9±12.4

Cuadro 5. Respuesta proliferativa de LIE y LLP (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PHA durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 3 experimentos (E1 a E3), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.).

Cuadro 6

LINFOCITOS DE GLM con PHA				
Días post-inf	EXPERIMENTOS			
(ctl/tsp)	E1	E2	E3	media±desvest
d2 ctl	0.5	1.5	41.1	14.4±23.2
d2 tsp	29	3.4	417.6	150.0±232.1
d5 ctl	78.8	58.1	162.4	99.8±55.2
d5 tsp	42.9	8.4	51	34.1±22.6
d15 ctl	152	480	21.6	217.9±236.2
d15 tsp	2.5	77.2	170.7	83.5±84.3
d25 ctl	1.3	294.1	4.2	99.9±168.2
d25 tsp	1.1	80.2	125.8	69.0±63.1
d40 ctl	np	5.9	3.6	4.8±1.6
d40 tsp	np	6.9	1.9	4.4±3.5

Cuadro 6. Respuesta proliferativa de linfocitos de GLM (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PHA durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 3 experimentos (E1 a E3), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.). Las celdas np corresponden a muestras no procesadas.

Los valores de I.E. en linfocitos de sangre fueron generalmente buenos y homogéneos con la utilización de PWM. Los rangos de los promedios de I.E. fueron de  $14.1 \pm 10.4$  a  $48.5 \pm 83.9$  en los animales control y de  $28.4 \pm 21.6$  a  $85.4 \pm 72.4$  en los animales infectados y no se presentaron diferencias entre grupos ni con la edad de los animales.

En el caso del bazo los valores fueron en general mas bajos y con mucha mayor variación individual que los observados con ConA y PHA. Dichos valores correspondieron a los rangos entre  $6.0 \pm 5.1$  a  $46.2 \pm 92.8$  en los animales control y de  $8.6 \pm 7.6$  a  $49.0 \pm 65.3$  en los animales infectados (cuadro 7).

Los datos de I.E. en LIE y LLP con PWM son consistentemente bajos o nulos y estuvieron en los rangos de  $1.1 \pm 0.4$  a  $2.0 \pm 0.4$  en los controles y de  $0.9 \pm 0.2$  a  $3.0 \pm 4.5$  en los animales infectados para el caso del LIE y de  $0.8 \pm 0.5$  a  $8.5 \pm 15.6$  en los controles y  $0.6 \pm 0.3$  a  $8.0 \pm 15.9$  en los infectados para los LLP. En el cuadro 8 (LLP) se observaron casos aislados como en el E1 d40 del infectado (10.4), E2 d25 del control (36.4), E3 d2 tsp (36.4) y en el E3 d25 del infectado (10.4) que aparentemente correspondieron a diferencias individuales.

Cuando observamos los valores de linfocitos del GLM con PWM, la mayoría de las veces se presenta una buena respuesta en donde los promedios dejan rangos de  $37.2 \pm 48.6$  a  $68.6 \pm 56.0$  en los controles y de  $23.9 \pm 19.8$  a  $74.5 \pm 143.2$  en los infectados con casos individuales de no respuesta como en el caso del E1 d2 del control y el E1 d25 del infectado (cuadro 9).

Cuadro 7

<b>LINFOCITOS DE SANGRE CON PWM</b>						
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	E1	E2	E3	E4	E5	media± D.E.
2 ctl	89.2	28.5	25.4	17.3	69.6	46.0±31.5
2 tsp	71.7	33.4	193.9	12.1	115.8	85.38±72.4
5 ctl	78.4	46.7	13.1	12.5	35	37.14±27.3
5 tsp	249.5	139.7	8.8	11	11.7	84.14±108.1
15 ctl	3.3	27	23.2	9.7	7.2	14.08±10.4
15 tsp	19.3	42.8	58.6	7.2	14	28.38±21.6
25 ctl	8	198.4	18.6	6.6	10.7	48.46±83.9
25 tsp	3.2	167.8	37.3	3.9	93.3	61.1±70.0
40 ctl	30.5	16.7	1.1	93.7	27.6	33.92±35.4
40 tsp	91.8	23.4	5.1	120.6	34.1	55.0±48.9
<b>LINFOCITOS DE BAZO con PWM</b>						
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	E1	E2	E3	E4	E5	media± D.E.
2 ctl	9.8	np	25.8	3.3	19.9	14.7±10.1
2 tsp	5.1	83.6	148.3	6.3	1.7	49.0±65.3
5 ctl	12.3	31.2	1.1	3.6	2.6	10.2±12.5
5 tsp	46.4	5.2	2.7	2.8	2.8	12.0±19.3
15 ctl	1.8	13.4	8.4	5.6	0.8	6.0±5.1
15 tsp	3.3	15	18.3	5.3	0.9	8.6±7.6
25 ctl	1.9	210.7	12	4.5	2	46.2±92.0
25 tsp	2	39.3	8.7	1.4	1.8	10.6±16.3
40 ctl	6.4	5.7	11	13.1	0.8	7.4±4.8
40 tsp	14.3	5.9	3.3	28.1	131.8	36.7±54.0

Cuadro 7. Respuesta proliferativa de linfocitos sanguíneos y de bazo (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PWM durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 5 experimentos (E1 a E5), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.). Las celdas np corresponden a muestras no procesadas.

Cuadro 8

<b>LIE con PWM</b>						
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	E1	E2	E3	E4	E5	media± D.E.
2 ctl	0.5	2.8	3.5	0.8	1.7	1.9±1.3
2 tsp	0.5	1.5	3.8	0.9	0.8	1.5±1.3
5 ctl	0.8	1.5	1.4	0.8	0.8	1.1±0.4
5 tsp	6.8	2	1.1	0.7	0.4	2.2±2.6
15 ctl	0.4	1.1	3.5	1.5	0.4	1.4±1.3
15 tsp	1.1	1.2	0.8	0.7	0.9	0.9±0.2
25 ctl	0.03	2.2	1.3	0.7	2	1.2±0.9
25 tsp	1.1	1.2	0.7	1.4	0.5	1.0±0.4
40 ctl	2.4	2.3	1.9	2.2	1.3	2.0±0.4
40 tsp	1.3	0.7	11	1.2	0.6	3.0±4.5
<b>LLP con PWM</b>						
Días p.i.	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	E1	E2	E3	E4	E5	media± D.E.
2 ctl	0.5	2.2	0.6	0.3	1.8	1.1±0.9
2 tsp	1.1	1	36.4	0.3	1.2	8.0±15.9
5 ctl	0.7	2.4	0.3	0.4	0.7	0.9±0.9
5 tsp	1.3	1	4.7	0.3	0.4	1.5±1.8
15 ctl	1.3	0.3	1.2	1.1	0.2	0.8±0.5
15 tsp	0.7	0.8	0.8	0.2	0.3	0.6±0.3
25 ctl	0.7	36.4	3.3	0.4	1.6	8.5±15.6
25 tsp	0.9	2.5	10.4	0.1	1.8	3.1±4.2
40 ctl	3.6	4.7	0.7	1.6	0.5	2.2±1.9
40 tsp	10.4	0.8	1.4	0.6	1.6	3.0±4.2

Cuadro 8. Respuesta proliferativa de LIE y LLP (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PWM durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 5 experimentos (E1 a E5), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.).

Cuadro 9

<b>LINFOCITOS DE GLM con PWM</b>						
<b>Días p.i.</b>	<b>EXPERIMENTOS</b>					
	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>media± D.E.</b>
<b>2 ctl</b>	1	2.5	120	32.7	29.9	37.2±48.6
<b>2 tsp</b>	19	2.5	84.25	57.7	67.8	46.3±34.3
<b>5 ctl</b>	95.7	50.7	28.9	50.9	23.3	49.9±28.5
<b>5 tsp</b>	49.9	1.7	37.5	20.8	9.6	23.9±19.8
<b>15 ctl</b>	125.8	119.4	13	76.9	9	68.6±56.0
<b>15 tsp</b>	1.2	17.3	71.5	22.7	9.3	24.4±27.6
<b>25 ctl</b>	1.7	170.7	18	8.5	12.3	42.2±72.1
<b>25 tsp</b>	1	66	197.4	6.9	5.5	55.4±83.8
<b>40 ctl</b>	np	3.6	11.9	150.3	11.7	44.4±70.7
<b>40 tsp</b>	np	3.9	3.3	289.2	1.5	74.5±143.2

Cuadro 9. Respuesta proliferativa de linfocitos de GLM porcinos (en I.E.) obtenidos de cerdos control (ctl) e infectados con *T. spiralis* (tsp), estimulados con 2.5 µg/ml de PWM durante 72 hrs a 37°C. Los datos corresponden a 5 experimentos (E1 a E5), de los días post-infección (p.i.) (2, 5, 15, 25 y 40). En la columna final se muestran los valores promedio y su desviación estándar (D.E.). Las celdas np corresponden a muestras no procesadas.



## **II. Respuesta a AgTLMTsp**

Se evaluó la respuesta proliferativa en linfocitos obtenidos de sangre, bazo, GLM, LIE y LLP hacia el AgTLMTsp a una dosis de 50 µg/ml como fue establecido previamente por Castillo en 1997.

En la gráfica 4 se encuentran representados los valores de I.E. obtenidos de linfocitos de sangre y bazo de animales control e infectados, cultivados con AgTLMTsp en 5 experimentos (E1 a E5) a 2, 5, 15, 25 y 40 días post-infección.

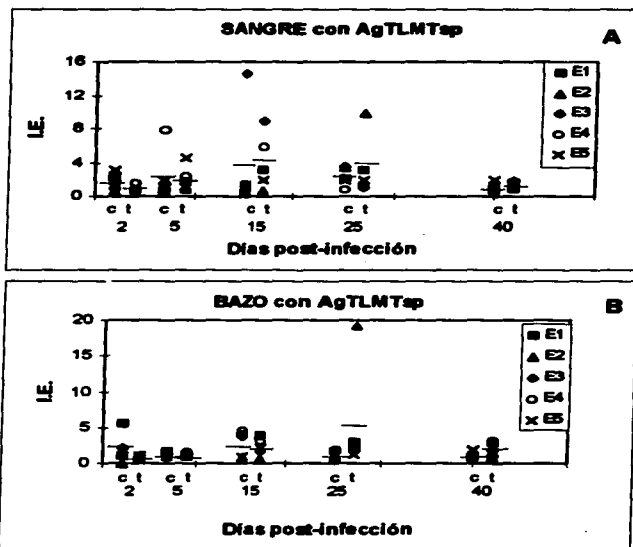
Los linfocitos de sangre (gráfica 4A) mostraron en general un I.E. bajo en respuesta hacia el AgTLMTsp ( $\leq 4.6$ ) sin embargo los valores de I.E. en los animales del E2 d25 del infectado (9.8), E3 d15 del control (14.6), E3 d15 del infectado (8.9), E4 d5 del control (7.9), E4 d15 del infectado (5.9), se encontraron alejados de los valores promedio y parecen corresponder a una respuesta individual independiente del AgTLMTsp. No se observaron diferencias significativas entre grupos control e infectados ó en los diferentes días post-infección

Los valores de I.E. de linfocitos de bazo (gráfica 4B) fueron bajos también ( $\leq 4.4$ ), y en forma aislada se presentaron I.E. en el E1 d2 del control (5.6) y el E2 d25 del infectado (19.2) que indican del mismo modo una alta variación individual. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos ó a diferentes días de infección.

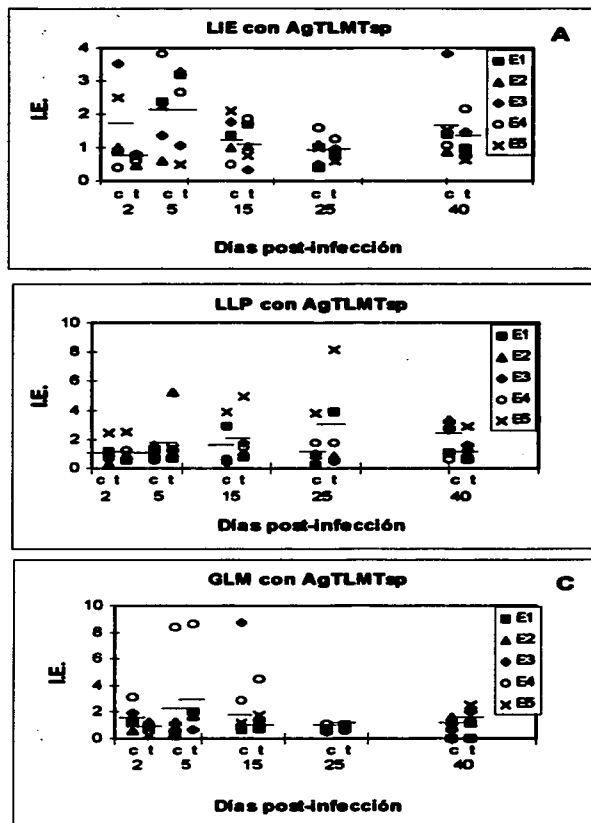
La respuesta de I.E. de los LIE fue baja o nula ( $\leq 3.8$ ) y no parecen observarse diferencias en la edad ni entre los grupos control y los infectados (gráfica 5A).

Los valores en I.E. para los LLP son bajos ( $\leq 4.9$ ) en forma similar a los de epitelio, a excepción del E5 d25 (8.2) y el E2 d5 (5.2) del infectado en que la respuesta es más alta pero sin significancia estadística (gráfica 5B).

Los I.E. de linfocitos de GLM fueron similares a los encontrados en intestino ( $\leq 4.5$ ) y sólo se observan casos aislados de respuesta clara como en el E3 d15 del control (8.7), E4 d5 del control (8.3) y E4 d5 del infectado (8.6) que sugieren de nueva cuenta una respuesta individual independiente de grupo o de edad (gráfica 5C).



Gráfica 4. Respuesta proliferativa de linfocitos de sangre (A) y bazo (B) de cerdos control (c) e infectados (t) con *T. spiralis* cultivados con AgTLMTsp durante 96 hrs a 37°C, los días 2, 5, 15, 25 y 40 post-infección. Las barras horizontales (—) indican los valores promedio para cada grupo.



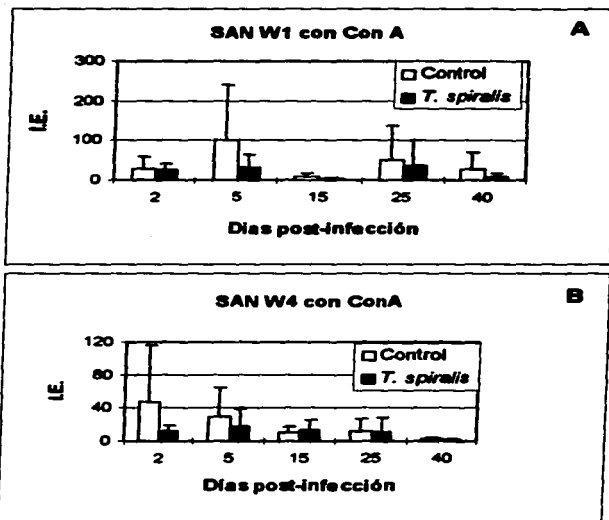
Gráfica 5. Respuesta proliferativa en LIE (A), LLP (B) y GLM (C) en cerdos control (ct) e infectados (t) cultivados con AgTLMTsp a 50 µg/ml 96 hrs a 37°C. Se muestran los valores de 5 experimentos (E1,...E5). Las barras horizontales (—) indican los valores promedio de cada grupo.

### **III. Evaluación del método de separación**

Durante el desarrollo de los experimentos se evaluó el efecto que tiene la separación de linfocitos de intestino delgado proximal, tanto de la porción del epitelio, como de la lámina propia. Aproximadamente  $10\text{-}12 \times 10^6$  linfocitos obtenidos de sangre se suspendieron en HBSS con EDTA 1 mM (anexo I) y fueron sometidas al mismo proceso de agitación ( 200 rpm a 37°C durante 75 min.) que el intestino. Las células recuperadas se colocaron en una solución con colagenasa Tipo V a una concentración de 100 U/ml y fueron sujetas al mismo procedimiento de agitación.

Los linfocitos de sangre recuperados del tratamiento con HBSS con EDTA 1mM (SANW1) y los tratados con colagenasa Tipo V (SANW4) se cultivaron a razón de  $10 \times 10^4$  células por pozo con ConA a 2.5 µg/ml por 72 hrs a 37°C.

Los resultados obtenidos de los ensayos de proliferación para las células control de sangre con tratamiento con HBSS con EDTA 1 mM (SANW1) (gráfica 6A), mostraron pérdida de la cantidad de células recuperadas de los lavados de prueba, sin embargo la respuesta proliferativa promedio de estas células es generalmente aceptable (100 de I.E.) comparada con la respuesta promedio de células de sangre con ConA ( $\leq$  a 172 de I.E.) del tratamiento normal (cuadro 1A). En el caso de SANW4 (gráfica 6B) existe también disminución de la cantidad de células recuperadas con una respuesta promedio regular ( $\leq$  45 de I.E.) comparada de la misma manera con los valores mencionados para los linfocitos de sangre con ConA.



Gráfica 6. Valores promedio (en I.E.) de linfocitos de sangre de cerdo tratados con EDTA 1mM (SANW1) (A) y con colagenasa Tipo V (SANW4)(B) cultivados con Con A utilizados como controles de los lavados de separación de células de intestino. Las barras blancas corresponden a los animales control y las barras negras a los infectados.

## VI. DISCUSIÓN

*Trichinella spiralis* es un parásito importante para la especie humana y para la producción pecuaria por el decomiso de carne de cerdo infectada. Este parásito tiene una fase entérica y una sistémica dentro de su ciclo biológico.

En roedores se ha estudiado con detalle la respuesta inmune sistémica y se han hecho aproximaciones interesantes sobre la respuesta inmune local (Ramaswamy *et al.*, 1994 y 1996). Sin embargo en el cerdo, los estudios se han limitado al efecto de la infestación sobre las poblaciones celulares circulantes y a la respuesta inmune humoral (Gamble *et al.*, 1986; Marti y Murrel, 1987; Arriaga *et al.*, 1989 y Ivanoska *et al.*, 1990) y poco se conoce acerca de la respuesta inmune intestinal.

El estudio de la respuesta inmune en mucosas atrae la atención debido a sus amplias perspectivas en la inducción y manipulación de la exclusión inmune local y la generación de tolerancia sistémica, estas dos características tienen aplicación en el diseño de inmunógenos mucosales efectivos que resultarían de gran impacto tanto en salud humana como veterinaria.

Actualmente, apoyados en el conocimiento de la distribución de células del sistema inmune intestinal porcino (Vega-López *et al.*, 1993), se han diseñado protocolos para separar células intestinales de la zona del epitelio (LIE) y de la lámina propia (LLP) (Castillo, 1997) con el objetivo de estudiar su fisiología y su regulación. Así mismo, se han desarrollado una gran variedad de AbM contra diferentes receptores (CD) de células del sistema inmune del cerdo (Lunney, 1994), que son útiles para su inmunolocalización a nivel de tejidos. Esta herramienta nos puede ser útil para inferir la participación de estas células en la respuesta inmune.

Con estos antecedentes se propusieron como objetivos de este trabajo evaluar la maduración del sistema inmune intestinal en cerdos destetados de 6 a 12 semanas de edad, describir morfológicamente las poblaciones de células T del sistema inmune intestinal ante la infección con *T. spiralis* y analizar la respuesta *in vitro* de esas células a antígenos de la larva muscular del parásito.

Para el estudio morfométrico de las poblaciones de células T del sistema inmune del intestino, se utilizó como herramienta el analizador de imágenes por computadora, el cual permite hacer mediciones cuantitativas incrementando sustancialmente la precisión y confiabilidad en la comparación de resultados. De hecho, esta es una de las mejores formas que se han empleado para describir la estructura del sistema inmune mucosal.

Se eligió la evaluación de las células T, por la disponibilidad de clonas productoras de AbM contra éstas células y dadas las evidencias, particularmente en el ratón, que los linfocitos T efectores que confieren protección contra la infección por *T. spiralis* tienen un fenotipo CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>-</sup> y son capaces de elaborar *in vitro* citocinas del tipo T<sub>H</sub>2 como la IL-4 y la IL-5. La infección simultáneamente genera en esta especie poblaciones pequeñas de células CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>+</sup> que elaboran las citocinas del tipo T<sub>H</sub>1 como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  (Ramaswamy *et al.*, 1996). Así mismo, por estudios *in vitro*, se sabe que los linfocitos T de los GLM y de la mucosa intestinal regulan el número de células cebadas y eosinófilos de sangre periférica después de la infección o estimulación con antígenos del parásito, gracias a la producción de IL-3 (Alizadeh y Wakelin, 1982; Dillon y MacDonald, 1986 y Parmentier *et al.*, 1987).

En los resultados en cuanto a la maduración del sistema inmune valorada por los estudios de morfometría así como por los ensayos de proliferación de linfocitos en células de cerdos control de 6 a 12 semanas de edad, no se observaron diferencias significativas en cuanto a número de células a lo largo del experimento ni entre cerdos control e infectados. Esto nos sugiere que la mayoría de los animales en condiciones de normalidad ya han alcanzado cierta estabilidad en poblaciones celulares a nivel de intestino a esta edad. Aunque por estudios de citometría se ha podido determinar que las células del intestino sufren algunos cambios cualitativos (Romero *et al.*, 1997) con la edad que no son detectables por morfometría.

En observaciones hechas paralelamente a los experimentos, en las cuales se recuperaron porciones de intestino delgado proximal del día 2 y 5 de los animales infectados, se observó, por microscopía estereoscópica, que el número de parásitos en la mucosa era escaso y se encontraban focalizados en puntos discretos, por lo que es posible que la respuesta inmune también sea focal, lo que hizo difícil ubicarla en los cortes

histológicos tomados, dada la extensión de intestino del cerdo. Cuando se realizaron cortes histológicos de las porciones de intestino donde se localizó el parásito y se tiñeron con hematoxilina y eosina, se observaron focos delimitados de inflamación y un predominio de polimorfonucleares eosinófilos (fig. 6), lo que indica posiblemente que éstas células tengan una participación importante en el fenómeno de respuesta al parásito como se ha descrito anteriormente (Alizadeh y Wakelin, 1982).

Otra posibilidad sería que la dosis de larvas inoculadas a los animales (700 LM/kg de peso) hayan sido bajas y por lo tanto la respuesta inmune no fuera fácilmente detectada (Gerencer *et al.*, 1992). En estudios realizados previamente se ha demostrado que dosis desde 300 LM inoculadas son suficientes para ser identificadas en la digestión de diafragma y lengua en cerdos (Madden *et al.*, 1990). Sin embargo, para evaluar si efectivamente los animales se infectaron, se determinó el número de larvas por gramo de tejido, obtenidas a partir de diafragma de cerdos infectados con *T. spiralis* y sacrificados al día 25 y 40 post-infección de los 5 experimentos (E1 a E5), en donde se encontraron para el E1 de los días 25 y 40, 1250 y 1100 LM/g respectivamente, en el E2, 120 y 350 LM/g, en el E3, 525 y 350 LM/g respectivamente, en el E4, 212 y 130 LM/g y en el E5 en el día 25, 250 LM/g (el día 40 no se realizó la digestión), por lo que se considera que la infección fue suficiente para haber sido detectada por el sistema inmune.

En la separación de LIE y LLP del intestino para los ensayos de proliferación, se utilizó el método descrito por Castillo, en 1997, debido a que su tiempo de realización es más corto (10 hrs) con respecto a otros descritos (18 hrs)((Haverson *et al.*, 1994), lo que favorece la viabilidad de las células. Se realizaron cortes histológicos de cada lavado del intestino, los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina, para la evaluación de la representatividad de las células separadas de acuerdo al nicho de donde provenían. Así mismo, las poblaciones de células obtenidas, se caracterizaron fenotípicamente y se obtuvieron los porcentajes de las diferentes subpoblaciones por citometría de flujo (Romero-Ramírez *et al.*, 1996). Encontrándose que coincidieron con la descripción hecha para cerdos adultos a ese nivel (Vega-López *et al.*, 1993). Después de la obtención de poblaciones de células representativas de esos nichos nos sería posible evaluar las actividades funcionales de esas células intestinales.



La purificación de linfocitos por gradientes de Percoll 40-80% (Haverson *et al.*, 1994) retuvo en su interfase hasta 60% de linfocitos, mientras que en la parte superior del gradiente se encontraron gran cantidad de células epiteliales y hasta 40% de linfocitos atrapados en el moco que se secretó por el procedimiento de obtención (Castillo, 1997).

Se obtuvieron rendimientos de LIE de hasta  $75 \times 10^6$  células por segmento intestinal y de LLP de hasta  $100 \times 10^6$  células, los cuales son menores que los obtenidos por Haverson *et al* en 1994 sin embargo fueron suficientes para la realización de los cultivos y se obtuvieron en tiempos más cortos. Estos linfocitos siempre tuvieron una viabilidad >90% evaluada por medio de la tinción de azul de Tripano. Por citometría de flujo, utilizando yoduro de propidio, se encontró que la mayoría de células para cultivo estaban en fase G0 (vivas) del ciclo celular (Romero-Ramírez, comunicación personal).

Para comparar la respuesta inmune local de los LIE y LLP (representantes de la respuesta local), se incluyeron como controles linfocitos de sangre y bazo (representantes de la respuesta inmune sistémica) y linfocitos de GLM considerados como representantes de ambas respuestas.

En el cultivo de células se incluyeron como control de proliferación los mitógenos Con A y PHA que estimulan células T y PWM que estimula células B a una concentración de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  según lo recomendado por Castillo en 1997.

Para la evaluación de la respuesta a antígenos de *Trichinella spiralis* se utilizó el antígeno crudo de la LM a 50  $\mu\text{g/ml}$ , debido a que el método de obtención es sencillo y que existe reacción cruzada entre la LM y antígenos de otros estadios (adulto y LRN) además de que la respuesta inmune local a este antígeno no había sido valorada. La concentración utilizada se determinó en estudios previos por Castillo, en 1997, donde se encontró que producía mejor estimulación en linfocitos sistémicos que a dosis mas bajas (25  $\mu\text{g/ml}$ ).

En los resultados de la respuesta proliferativa, a nivel sistémico (sangre y bazo) hubo I.E.  $\leq 172.5 \pm 142.4$  cuando los linfocitos fueron estimulados con ConA y PHA y no se encontraron diferencias significativas debidas a la edad de los animales a lo largo del experimento, sin embargo se observaron diferencias individuales que no dependieron de la edad o del grupo al que pertenecían. Esto posiblemente se debió a algunas diferencias en

los receptores de la célula T reconocidos por los mitógenos ( $\alpha$ -man,  $\alpha$ -glc en ConA y oligosacáridos en PHA), lo que podría influir sobre la señalización transduccional (Liener *et al.*, 1986) y podría indicar una cierta inmadurez funcional de las células en algunos animales.

La respuesta en I.E. de los linfocitos sanguíneos con PWM fue mas baja que con Con A ó PHA, pero más homogénea. Cuando las células de bazo fueron estimuladas con PWM se obtuvieron I.E. muy bajos o nulos en la mayoría de los casos lo que podría deberse a que existieron diferencias en la cantidad de receptores con N-acetil glucosamina (Nac-glc)<sub>3</sub> en ese tejido comparado con los de las células sanguíneas.

También hubo casos en donde fueron observados I.E muy bajos ó nulos hacia mitógenos a nivel sistémico. Esto también pudiera estar asociado a las características individuales (variación genética), o al estrés a que se sometieron los animales durante los experimentos. En cuanto a bajas respuestas por estrés, Hessing *et al* en 1995, encontraron que la producción de hormonas como los glucocorticoides varía de acuerdo al carácter y comportamiento social entre cerdos y que esa diferencia influye de manera significativa en la reducción de la respuesta inmune celular y humoral.

En el caso de los linfocitos de GLM en general se presentaron respuestas en I.E. parecidas a las de LIE y LLP con ConA, sin embargo con PHA la respuesta fue más parecida a sangre ó bazo y con PWM se observaron respuesta altas de I.E., por lo que su papel parece combinar rasgos de la respuesta sistémica y de la local, tal vez debido a que se reclutan células de ambos sistemas.

La respuesta proliferativa local (LIE y LLP) a mitógenos (ConA, PHA y PWM) fue escasa o nula en la mayoría de los casos. Las diferencias fisiológicas entre la respuesta sistémica y la local podrían deberse a daños en las células debido a los procedimientos de obtención y separación, a inmadurez de las células o activación celular sin proliferación.

Para determinar el posible daño de los linfocitos debido al método de separación, se evaluó el efecto de las soluciones de lavado (HBSS con EDTA 1mM y RPMI 1640 con colagenasa tipo V) y se incluyeron linfocitos de sangre como controles. Al respecto se encontró que había una pérdida significativa de células al ser sometidas a este tratamiento lo cual ya se había descrito anteriormente (Wilson *et al*, 1986a), sin embargo, en estos

controles se obtuvieron valores de I.E. en un rango de  $2.8 \pm 2.2$  a  $100 \pm 142.2$  en SANW1 (EDTA) y de  $2.0 \pm 0.3$  a  $47.1 \pm 69.1$  en SANW4 (colagenasa) lo que nos indica que las células remanentes no perdieron su actividad por el tratamiento.

Cabe mencionar que antes de la realización de los cultivos de células, siempre se determinó que la viabilidad fuera  $> 90\%$  con la tinción de azul de tripano. Así mismo, se corroboró en algunos casos la viabilidad de los linfocitos por citometría de flujo mediante la utilización de yoduro de propidio, donde las células también aparecían viables (Romero-Ramírez, comunicación personal).

Otro punto a considerar con respecto a la escasa o nula respuesta proliferativa es que las células no estuvieran completamente maduras, ya que en la evaluación histoquímica durante la observación de las mismas, se detectó menor marcaje de la superficie de los linfocitos por la enzima peroxidasa en los animales de 6 semanas que en los animales de 12 semanas, lo que sugiere la existencia de un menor número de receptores en estos animales.

Por último otra de las posibilidades es que la activación de los LIE y LLP no necesariamente se vea reflejada en proliferación, lo cuál se tendría que evaluar por métodos distintos como por ejemplo la medición del AMPc intracelular después del estímulo. La activación de la adenilato ciclasa a través del complejo Gi (inhibidor) o Gs (estimulador), disminuye o incrementa la concentración intracelular de AMPc con resultados importantes en la activación celular (Rosenberg *et al.*, 1982 y Tsien *et al.*, 1983). Así mismo la determinación de la activación del sistema inmune intestinal por RT-PCR o hibridación *in situ*, para la identificación de respuestas de tipo  $T_H1$  (IL-2, IFN $\gamma$ ) y  $T_H2$  (IL-4, IL6 e IL-10), contribuiría a conocer aún mas la respuesta que se genera a este nivel.

La respuesta proliferativa hacia el AgTLMTsp en sangre y bazo (sistémica) ( $\leq 4.6$  y  $\leq 4.4$  respectivamente), en linfocitos de GLM ( $\leq 4.5$ ) y a nivel local en los LIE ( $\leq 3.8$ ) y LLP ( $\leq 4.9$ ), generalmente no fue detectable. Del mismo modo que con mitógenos, no se observaron diferencias significativas debidas a la edad ni entre los grupos control e infectados, sin embargo también se encontraron variaciones individuales importantes en algunos animales pero que fueron independientes al órgano.

Existen varias posibilidades para explicar estos resultados. Una de ellas es que el antígeno por sí mismo induzca directamente a las células a apoptosis por citotoxicidad. Así mismo es posible que la ausencia de proliferación se debiera a la utilización del antígeno de LM, por no tratarse del estadio específico del parásito que se relaciona estrechamente con la fase local intestinal (fase adulta y la de larva recién nacida), o bien que la duración del experimento (día 2 hasta el día 40 post-infección), sea determinante dado que según lo reportado por Murrell en 1985b, la eliminación de la fase adulta se puede evidenciar a partir del día 48 post-infección.

Otra hipótesis es que existiera una inadecuada presentación del antígeno debido a ausencia de células presentadoras MHC clase II+ y la proliferación no se induzca en LIE y LLP de la misma manera que en linfocitos sistémicos. Cabe mencionar que en la purificación de células de los lavados de intestino por gradientes de Percoll se pudieron haber eliminado la mayoría de las células presentadoras como macrófagos y células dendríticas. La ausencia de estas CPA profesionales podría ser crítica en la activación linfocitaria por el papel de las moléculas coestimuladoras como la B7 e ICAM-1 con el CD28 del linfocito (Mueller y Jenkins, 1995). Por último según lo reportado por Dillender y Lunney en 1993, también es posible que la respuesta proliferativa sea dependiente de citocinas (IL-2) y que para que se realicen adecuadamente los cultivos es necesario que sean mantenidos por más de cuatro semanas con adición de citocinas exógenas.

En experimentos preliminares, al cocultivar LIE y LLP con células de sangre se obtuvo una mayor proliferación que al cultivar las células por separado (Vega-López, 1996). Esto podría sugerir que los cultivos hechos requieren de citocinas del microambiente mucosal (como ejemplo la IL-2) para que ocurra la proliferación de los linfocitos (Bailey *et al.*, 1994), los cuales en cambio sufrirían apoptosis. En LLP de ratones se ha demostrado que éstos no producen IL-2, que promueve la activación y proliferación de células T (Cochrane y Williams, 1997), pero aún se requiere explorar más de cerca esta posibilidad, sobre todo en cerdos.

Otro aspecto que debe considerarse es que las células intestinales podrían recibir el estímulo antigénico por células presentadoras no profesionales, lo que derivaría en la inducción de apoptosis de las mismas por falta de coestimulación por células Clase II+ o

por la ausencia de citocinas (IL-2) en el microambiente intestinal. Uno de los hallazgos que se hicieron por citometría de flujo (Romero-Ramírez, 1997) fue que las células intestinales, después de cuatro días de cultivo, aparecieron apoptóticas. Lo que podría correlacionar con lo antes señalado. Evaluaciones de estos parámetros podrán dar más información al respecto.

Una observación que se hizo patente tanto a nivel local como sistémico a lo largo de los ensayos de proliferación, es que valores en I.E. lejanos a la generalidad de los casos, se encontraron tanto con el uso de mitógenos como de antígeno. Estos valores condujeron a la obtención de D.E. por arriba del 100%.

A pesar de no haberse detectado diferencias en el estudio morfométrico en cuanto al número de células entre los cerdos control e infectados a lo largo del experimento la ubicación de las mismas correspondió a la descripción hecha para los cerdos adultos por citometría de flujo se confirmó que la proporción global de las células inmunes locales no se afecta (Romero-Ramírez, 1997). Las variaciones individuales en funcionalidad, encontradas durante la respuesta proliferativa, sugieren que puede existir un gradiente de maduración en los animales, lo que se refleja en las diferencias detectadas. Esto correlaciona con los estudios realizados utilizando linfocitos de epitelio y de lámina propia intestinal de cerdos de 3 y 11 semanas de edad (Wilson *et al*, 1986b) cultivados con ConA y PHA, donde se encontró que en las células de animales de 3 semanas no había estimulación y fue hasta las 11 semanas cuando se manifestó una respuesta mínima. Lo anterior nos sugiere que los animales utilizados en este trabajo posiblemente se encontraban en el límite de la respuesta descrita y las variaciones observadas en las respuestas reflejan un evento natural de maduración en los cerdos que no pudo ser detectado por los estudios morfométricos. Esta circunstancia podría ser aprovechada por los patógenos para evadir el sistema inmune mucosal, lo que explicaría el hecho que los animales jóvenes tengan una mayor susceptibilidad a padecer infecciones.

El desarrollo del presente estudio, aporta datos básicos importantes en el estudio de la respuesta inmune intestinal del cerdo ante *T. spiralis*, por lo que algunas de las propuestas para estudios posteriores son:

En cuanto a las técnicas inmunohistoquímicas, analizar la distribución que tienen otras células como son los polimorfonucleares eosinófilos y las células cebadas y determinar moléculas características de estas células.

En los ensayos de proliferación, la utilización de poblaciones de cerdos genéticamente más homogéneas posiblemente disminuiría la variabilidad individual, o bien si se aumenta el número de animales con la finalidad de tener un mayor cantidad de datos que permitan observar tendencias en sus respuestas, lo que sin embargo representaría un costo muy elevado en cualquiera de los casos. Así mismo tratándose de la edad post-infección de los animales en que se valorarían estos parámetros, se puede sugerir que se adecue el intervalo de evaluación más allá de los 48 días post-infección con la finalidad de abarcar la etapa en que se expulsa el parásito adulto en el cerdo.

Así también se sugiere el estudio de la respuesta inmune intestinal hacia *T. spiralis* utilizando antígenos de la fase adulta y de LRN que están en contacto directo con la mucosa intestinal.

En cuanto a la presentación de antígenos se propone incluir en experimentos futuros células presentadoras de origen intestinal o de otros órganos ó adicionando a los cultivos IL-2 exógena que semeje las condiciones del microambiente intestinal. También se podría evaluar la apoptosis de las células de intestino utilizando técnicas confiables como la citometría de flujo con el empleo de yoduro de propidio, o la medición de la activación celular por medio de la determinación de AMPc intracelular después del estímulo.

Las propuestas planteadas hasta el momento para el seguimiento de este tipo de estudios nos darían información más precisa acerca de la fisiología y la regulación del sistema inmune intestinal del cerdo ante la infección con *Trichinella spiralis*.

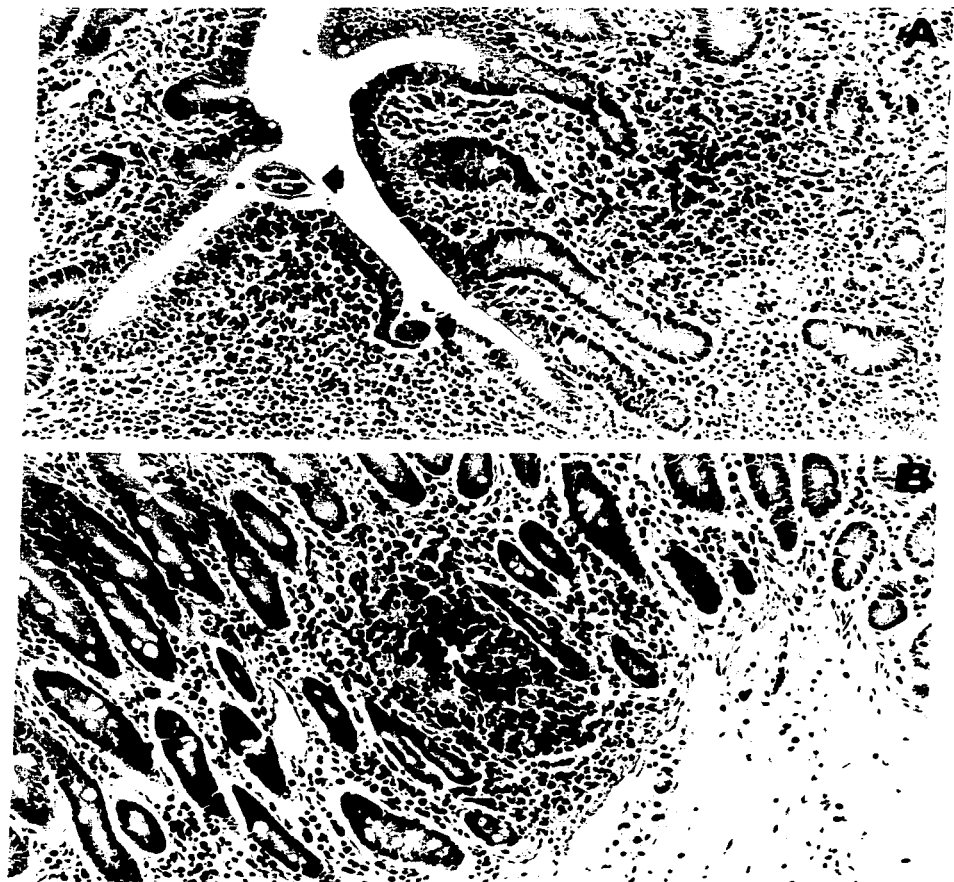


Fig. 6. Corte histológico de intestino delgado proximal de cerdo al día 5 post-infección con *T. spiralis*. (A) Se observa en el parásito cortado transversalmente próximo a la zona de las criptas (flecha). Del lado derecho se observa un foco de reacción inflamatoria (i) con eosinófilos evidentes. (B) Foco de reacción inflamatoria delimitado en la zona de las criptas adyacente a la serosa del órgano Hematoxilina y Eosina 200x.

## **VII. CONCLUSIONES**

En cuanto a la evolución con la edad de los animales, en el estudio morfométrico así como en la respuesta proliferativa a nivel sistémico y local, en general no existieron cambios significativos en cuanto a número de células, sin embargo algunos valores proliferativos individuales sugieren diferencias en la maduración de los animales, lo que permitiría al parásito pasar "inadvertido" por el sistema inmune del cerdo joven.

En el estudio morfométrico de intestino se encontró que no existieron diferencias significativas entre animales control e infectados con *T. spiralis* en cuanto a las subpoblaciones de células T (CD2+, CD4+ y CD8+).

La respuesta proliferativa hacia mitógenos en sangre y bazo fue buena ( $\leq 172.5 \pm 142.4$ ) comparativamente con lo observado en los LIE y los LLP (escasa o nula), por lo que las diferencias corroboran que se trata de dos nichos totalmente diferentes.

La respuesta proliferativa en ambos niveles (sistémico y local) generalmente no fue detectable con la utilización de antígeno crudo (AgTLMTsp).



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, P.P.A.; De la Rosa, A.J.L.; y Correa, B.M.D. (1992). Triquinelosis: Una parasitosis fuera de serie. Ed. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (INDRE), México (16): 1-56
- Alizadeh, H. y Wakelin, D. (1982). Genetic factors controlling the intestinal mast cell response in mice infected with *Trichinella spiralis*. Clin. Exp. Immunol. **49**: 331-337
- Almond, R.M. y Parkhouse, R.M. (1986). Immunoglobulin class specific responses to biochemically defined antigens of *Trichinella spiralis*. Parasite Immunol. **8** (4): 391-406
- Appleton, J.A.; Bell, R.G.; Homan, W. y van Knapen, F. (1991). Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. Parasitology Today. **7** (8): 190-192
- Arriaga, C.; Muñoz, E.; Morilla, A. y Ortega-Pierres, G. (1989). *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. Exp. Parasitology. **69**: 363-372
- Austyn, J.M. (1989). Antigen-presenting cells. IRL Press, Oxford, Reino Unido. pp 28-45
- Bailey, M.; Hall, L.; Bland, W. y Stokes, C.R. (1994). Production of cytokines by lymphocytes from spleen, mesenteric lymph node and intestinal lamina propria of pigs. Immunology. **82**(4): 577-583
- Barret, T.A.; Gajewski, T.F.; Danielpour, D.; Chang, E.B.; Beagley, K.W. y Bluestone, J.A. (1992). Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. J. Immunol. **149**(4): 1124-1130
- Bell, R.G.; McGregor, D.D. y Despommier, D.D. (1979). *Trichinella spiralis*: Mediation of the intestinal component of protective immunity in the rat by multiple phase-specific anti-parasite responses. Exp. Parasitology. **47**: 140-149

- Bianchi, A.T.J. y van der Heijden, P.J. (1994).** Antigen presenting cell and B-cells in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**: 63-68
- Bienenstock, J.; Ernst, P.B. y Underdown, B.J. (1987).** The gastrointestinal tract as an immunologic organ; state of the art. *Ann. Allergy.* **59** Part II: 17-20
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brandtzaeg, P. (1995).** Mucosal Immunology. A long way to the surface. *The Immunologist.* **3** (3): 75-77
- Bruschi, F.; Tassi, C. y Pozio, E. (1990).** Parasite-specific antibody response in *Trichinella sp.* 3 human infection: a one year follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**(2): 186-193
- Castillo, M. R. (1997)** Estandarización de técnicas de separación y cultivo de células del sistema inmune porcino. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. Benemérita Universidad autónoma de Puebla.
- Chu, R.M.; Glock, R.D. y Ross, R.F. (1979).** Gut-associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) of the small intestine. *Am. J. Vet. Res.* **40**: 1720-1728
- Cochrane, L. y Williams, N.A. (1997).** Characterization of T-cell responses from the lamina propria of the murine small intestine. 9<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology. *Immunol. Cell. Biol.* **75**:Suppl. 1: W 3.5.3
- Dennis, D.T. ; Despommier. D.D. y Davis, N. (1970).** Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Parasitol.* **56**(5): 974-977

Despommier, D.D.; Campbell, W. C. y Blair, L. S. (1977). The in vivo and in vitro analysis of immunity to *Trichinella spiralis* in mice and rats. *Parasitology*. **74**: 109-119

Despommier, D.D. (1983). Biology. En "*Trichinella* and trichinosis". W.C. Campbell. Plenum Press, New York. p.75-142

Despommier, D.D. (1990). *Trichinella spiralis*: The worm that would be virus. *Parasitology Today*. **6**(6): 193-196

Despommier, D.D. (1993). *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *J. Parasitology*. **79**(4): 472-482

Dick, T.A. y Silver, B.B. (1980). Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. *J. Parasitology*. **66**: 472-477

Dillender, J.M. y Lunney, J.K. (1993). Characteristics of T lymphocyte cell lines established from NIH minipigs challenge inoculated with *Trichinella spiralis*. *Vet. Immunol. Immunopathol*. **35**: 301-319

Dillon, S.B. y MacDonald, T.T. (1986). Limit dilution analysis of mast cell precursor frequency in the gut epithelium of normal and *Trichinella spiralis* infected mice. *Parasite Immunol*. **8**: 503-508

Fujihashi, K.; Taguchi, T.; McGhee, J.R.; Eldridge, J.H.; Bruce, M.G.; Green, D.R.; Singh, B. y Kiyono, H. (1990). Regulatory function for murine intraepithelial lymphocyte T cells abrogate oral tolerance. *J. Immunol*. **145**(7): 2010-2019

Gamble, H.R.; Murrell, K.D. y Marti, H.P. (1986). Inoculation of pigs against *Trichinella spiralis* using excretory-secretory antigens. *Am. J. Vet. Res*. **47**: 2396-2399

Gerencer, M.; Marinculié, A.; Rapié, D.; Frankovic, M. y Valpotié, I. (1992). Immunosuppression of in vivo and in vitro lymphocyte responses in swine induced by

- Trichinella spiralis* or excretory-secretory antigens of the parasite. Veterinary Parasitology. 44: 263-273**
- Grencis, R.K.; Hultner, L. y Else, K.J. (1991). Immunology. 74(2): 329-332**
- Guy-Grand, D.; Cerf-Bensussan, N.; Malissen, B.; Malassis-Seris, M.; Briottet, C. y Vassalli, P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T-cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. J. Exp. Med. 173: 471-481**
- Hamad, M. y Klein, J. R. (1994). Phenotypic and functional heterogeneity of murine intestinal intraepithelial lymphocytes defined by cell density: implications for route of differentiation and responsiveness to proliferation induction. Immunology. 82. 611-616**
- Haverson, K.; Bailey, M.; Higgins, V. R.; Bland, P. W. y Stokes, C. R. (1994). Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues. J. Immunol. Meth. 170 (2): 233-245**
- Hermanek, J.; Goyal, P.K. y Wakelin, D. (1994). Parasite Immunol. 16(2): 111-117**
- Hessing, M.J.C.; Coenen, G.J.; Vaiman, M. y Renard, C. (1995). Vet. Immunol. Immunopathol. Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. 45: 97-113**
- Husby, S. (1988). Dietary antigens: uptake and humoral immunity in man. APMIS 96 (Suppl. 1): 5-40**
- Ivanoska, D.; Cuperlovic, K. y Lunney, J.K. (1990). Peripheral blood mononuclear cell subsets during *Trichinella spiralis* infection in pigs. Res.Vet. Sci. 49: 92-97**
- Johnson, L.R. (1983). Physiology of the gastrointestinal tract. Edit. Raven Press, New York. USA vol 2.**

- Kiyono, H.; Bienenstock, J.; McGhee, J.R. y Ernst, P.B. (1992). The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg. Immunol.* **4**: 54-62
- Liener, I.E.; Sharon, N. y Goldstein, I.J. (1986). The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press, London and Florida
- Love, R.J.; Ogilvie, B.M. y McLaren, D.J. (1976). The immune mechanisms which expels the intestinal stage of *Trichinella spiralis* from rats. *Immunology* **30**: 7-15
- Lunney, J.K., y cols. (1994). Overview of the first international workshop to define swine leukocyte cluster of differentiation (CD) antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**: 193-206
- Maden, K.B.; Murrell, K.D. y Lunney, J.K. (1990). *Trichinella spiralis*: Mayor histocompatibility complex-associated elimination of encysted muscle larvae in swine. *Exp. Parasitol.* **70**: 443-451
- Marti, H.P. y Murrell, K.D. (1986). *Trichinella spiralis*: Antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Exp. Parasitology* **62**: 370-375
- Marti, H.P. y Murrell, K.D. (1987). *Trichinella spiralis*: Immunization of pigs with newborn larval antigens. *Exp. Parasitology.* **63**: 68-73
- Martínez-Marañón, R. (1985). ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría ésto ser una consecuencia inesperada de nuestro “desarrollo” ? *Sal. Pùb. Méx.* **27**: 40-41
- Matsuda, S.; Uchikawa, R.; Yamada, M. y Arizono, N. (1995). *Infect. Immun.* **63**(12): 4653-4660
- McGhee, J.R. y Kiyono, H. (1993). New perspectives in vaccine development: Mucosal immunity to infections. *Infect. Agents Dis.* **2**(2): 55-73

McLaren, D.J.; Ortega-Pierres, G. y Parkhouse, R.M.E. (1987). *Trichinella spiralis*: Immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibody probes. *Parasitology*. **94**: 101-104

McLean, I.W. y Nakane, P.K. (1974). Periodate-Lisine-Paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **22**(12): 1077-1083

Morilla, G. A. y Bautista, G.C.R. (1986). Manual de inmunología. Transformación blastoide o incorporación de Timidina tritiada. Ed. Diana pp 351-361

Mueller, D.L. y Jenkins, M.K. (1995) Molecular mechanisms underlying functional T-cell unresponsiveness. *Curr. Op. immunol.* **7**: 375-381

Murrell, K.D. (1985a). Strategies for the control of human trichinosis transmitted by pork. *Food Technology*. **39** (3): 65-68 ,110-111

Murrell, K.D. (1985b). *Trichinella spiralis*: Acquired immunity in swine. *Exp. Parasitology*. **59**: 347-354

Newby, T.J. y Stokes, C.R.(1984). The intestinal immune system and oral vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **6**: 67-105

Ortega-Pierres, G.; Chayen, A.; Clark, N.W.T. y Parkhouse R.M.E. (1989a). Protection against *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. **88**: 359-369

Ortega-Pierres, G. ; Muñiz, E. ; Coral-Vázquez, R. y Parkhouse R.M.E. (1989b). Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitol. Res.* **75**: 563-567

Parkhouse, R.M.E.; Philipp, M. y Ogilvie, B.M. (1981). Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasite Immunology*. **3**: 339-352

- Parmentier, H.K.; Teppema, J.S.; Van Loveren, H.; Tas, J. y Ruitenbergh, E.J. (1987). Effect of a *Trichinella spiralis* infection on the distribution of mast cell precursors in tissues of thymus-bearing and non-thymus-bearing (nude) mice determined by an *in vitro* assay. *Immunology*. **60**: 565-570
- Parrot, D.M.V. (1987). The structure and organization of lymphoid tissue in the gut. Food allergy and intolerance. J. Brostoff y S.J. Challacombe (Eds.), Bailliere Tindall, W.B. Saunders, Londres, Reino Unido. pp 3-26
- Patrick, M.K. y Gall, D.G. (1988). Protein intolerance and immunocyte and enterocyte interaction. *Pediatr. Clin. N. Amer.* **35**(1): 17-34
- Philipp, M.; Taylor, P.M.; Parkhouse, R.M.E. y Ogilvie, B.M. (1981). Immune response to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J. Exp. Med.* **154**: 210-215
- Ramaswamy, K.; Goodman, R.E. y Bell, R. (1994). Citokine profile of protective anti-*Trichinella spiralis* CD4+ OX22- and non-protective CD4+ OX22- thoracic duct cells in rats: secretion of IL-4 alone does not determine protective capacity. *Parasite Immunol.* **16**(8): 435-445
- Ramaswamy, K.; Negrao-Correa, D. y Bell, R. (1996). Local intestinal immune responses to infections with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* **156**(11): 4328-4337
- Robinson, K.; Bellaby, T. y Wakelin, D. (1996). *Appl. Parasitol.* **37**(1):23-31
- Romero-Ramírez, H.; Vega-López, M.A.; García-Reyna, P.B. y Ortega-Pierres, M.G. (1997) Flow cytometry analysis of intestinal lymphocytes in *Trichinella spiralis* experimentally infected pigs. *Proceedings del 9º International Congress on Trichinellosis*. México, D.F. (en prensa)
- Romero-Ramírez, H; Castillo-Martínez, R; Vázquez-López, R.; Vega-López, M.A. y Ortega-Pierres, M.G. (1996). Separation and identification of lymphocytes from intestinal

**epithelium and lamina propria. Memoria del IV Latin American Congress on Trichinellosis, México, D.F. (en prensa).**

**Romero-Ramírez, H. Comunicación personal**

**Rosemberg, N.; Pines, M. y Sela, I. (1982). FEBS Letts. 137: 105**

**Rothkotter, H.J.; Ulbrich, H. y Pabst, R. (1991). The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. Pediatric Res. 29: 237-242**

**Saalmuller, A.; Hirt, W. y Reddehase, M.J. (1989). Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 19: 2011-2016**

**Stokes, C.R. (1988). Immune systems in the porcine gut. Pig Vet. Soc. Proc. 20: 19-30**

**Stokes, C.R.; Bailey, M. y Wilson, A.D. (1994). Immunology of the porcine gastrointestinal tract. Veterinary Immunology Immunopathology. 43: 143-150**

**Swindle, M.M. (1992). Swine as models in Biomedical Research. Iowa State. University Press. U.S.A. pp. 121-160**

**Tsien, R. Y.; Pozzan, T. y Rink, T.J. (1982). Nature. 206: 68-71**

**Vega-López, M.A.; Telemo. E.; Bailey, M.; Stevens, K. y Stokes, C.R. (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunohistological evidence for an organised compartmentalisation in the lamina propria, Vet. Immunol. Immunopathol. 37: 49-60**

**Vega-López, M.A. (1994). Sistema Inmune Intestinal Porcino. Ciencia Veterinaria. 6: 146-168**



**Vega-López, M.A.; Bailey, M.; Telemo, E.; y Stokes, C.R. (1995). Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet. Immunology Immunopathology*. 44: 319-327**

**Vega-López, M.A. (1996) *Gac. Méd. Méx.* 132 (5): 507-513**

**Walker, R.I y Owen, R.L. (1990). Intestinal barriers to bacteria and their toxins. *Ann. Rev. Med.* 41: 393-400**

**Walker, W.A. (1987a). Pathophysiology of intestinal uptake and absorption of antigens in food allergy. *Annals of Allergy* 59: 7-16**

**Walker, W.A. (1987b). Role of the mucosal barrier in antigen handling by the gut. En: *Food allergy and intolerance*. J. Brostoff y S.J. Challacombe (Eds.), Bailliere Tindall, W.B. Saunders, Reino Unido, pp 209-222**

**Wilson, A.D., Stokes, C.R. y Bourne, F.J. (1986a). Morphology and functional characteristics of isolated porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology*. 59: 109-113**

**Wilson, A.D.; Stokes, C.R. y Bourne, F.J. (1986b). Responses of intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses. *Immunology*. 58: 621-625**

**Williams, N.A.; Wilson, A.D.; Bailey, M.; Bland, P.W. y Stokes, C.R. (1992). Primary antigen specific T-cell proliferative responses following presentation of soluble protein antigen by cells from the murine small intestine. *Immunology*. 75(4): 608-613**

**Wright, K.A., Weidman, E. and Hong, H. (1987). The distribution of cells killed by *Trichinella spiralis* in the mucosal epithelium of two strains of mice. *Journal of Parasitology*. 73 (5): 935-939**

## ANEXO I

### SOLUCIONES PARA ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

#### RPMI (Incompleto)

Medio RPMI-1640

Gentamicina

Agua desionizada

40µg/ml

c.b.p. 1000 ml

Esterilizar por filtración y ajustar pH 7.2

#### RPMI (Completo)

Medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. cat.

R-4130)

Penicilina

100,000UI

Estreptomicina

100mg

L-Glutamina

2mM

Suero Fetal Bovino (Hyclone, Lab. Inc cat.

A-2111-L)

10%

Agua desionizada

c.b.p. 1000 ml

Esterilizar por filtración y ajustar pH 7.2

#### Solución de Colagenasa

Medio RPMI incompleto

100 ml

Colagenasa Tipo V (Sigma Chemical Co.,cat.

C-9263)

100 U/ml

#### FICOLL-Diatrizoato de sodio (densidad= 1.076-1.077)

Ficoll (Sigma) al 9% en H<sub>2</sub>O destilada

12 partes

Diatrizoato de sodio (ácido 3,5-Bis[acetilamino]-2,4,-  
triyodobenzoico. Sal sódica al 34% en H<sub>2</sub>O destilada

5 partes

Esterilizar 15' 15lb de presión (120°C)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**HBSS sin Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>**

(Solución Salina Balanceada de Hanks )

Glucosa	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Cloruro de potasio (KCl )	0.40 g
Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.06 g
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.06 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	3.50 g
Rojo de fenol	50mg
H <sub>2</sub> Odestilada	c.b.p. 1000 ml

Esterilizar por filtración y ajustar el pH 7.2-7.4

**HBSS sin Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> con EDTA 1.0 mM**

(Solución Salina Balanceada de Hanks )

EDTA [Ácido etilendinitrilotetracetato disódico] (J. T. Baker, cat. 8993)

465mg

HBSS sin Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>

c.b.p. 100ml

**PERCOLL ISOTÓNICO (Sol. madre)**

Percoll (Sigma Chemical Co. cat. P-1644)

10 partes

HBSS s/Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> 10x

1 parte

HEPES pH 7.3±0.1 (In Vitro, S.A. cat. 950321)

0.1 parte

**PERCOLL ISOTÓNICO 80%**

Sol. madre de Percoll

8 partes

HBSS 1x (sin/Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>)

2 partes

**PERCOLL ISOTÓNICO 40%**

Percoll al 80%

1 parte

HBSS 1x (s/Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>)

1 parte

**Solución de Azul Tripano**

Azul de Tripano 2 g  
PBS c.b.p. 100ml

**LÍQUIDO DE CENTELLEO**

POPOP p-bis-[2-(5-phenyloxasolyl)]-Benzene (New  
England Nuclear., cat. NEF-902) 0.25 g  
PPO 2,5-Diphenyloxazole (Mallinckrodt, Inc., cat. 4964) 5.0 g  
Tolueno c.b.p. 1000 ml

**TIMIDINA-<sup>3</sup>H (Sol. madre)**

Timidina-<sup>3</sup>H [methyl, 1<sup>9</sup>, 2<sup>9</sup>-<sup>3</sup>H] Timidina de 185 Mbq 5mCi  
(B72 Amersham Life Science., cat. TRK565) 0.2 ml  
RPMI completo 20.0 ml

## ANEXO II

### SOLUCIONES PARA HISTOQUÍMICA

#### Poli-L-lisina 0.1 %

poli-L-lisina al 0.1 % en H<sub>2</sub>O destilada

#### Sol. de Bloqueo de Peroxidasa Endógena

Metanol absoluto	100 ml
Peróxido de hidrógeno 30%	2.5 ml

#### TRIS-HCl (0.05M pH 7.6)

Tris base	6.1g
HCl (1N)	37 ml
H <sub>2</sub> O destilada	c.b.p. 1000 ml

#### SOL. DIAMINOBENCIDINA

3,3'-Diaminobenzidine [3,3',4,4'- Tetraaminobiphenyl] (Sigma Chemical CO.,)	3 mg
Tris-HCl (0.05M)	5 ml
Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5 µl

Agregar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al momento de usarse y filtrar en membrana de 0.22µm antes de su uso.

#### PBS (0.1M)

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O)	2.9 g
Cloruro de potasio (KCl )	0.2 g
H <sub>2</sub> O destilada	c.b.p.1000 ml

Ajustar pH 7.2-7.4

**SALINA (NaCl 0.15 M)**

**Na Cl**  
**Agua destilada**

**8.5 g**  
**c.b.p. 1000 ml**

**TBS (Salina Tris-Bufferada)**

**Tris-HCl (0.05 M pH 7.6)**  
**Salina**

**100 ml**  
**900 ml**