

11661

6 *F2ej.*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN LECHONES COLONIZADOS CON UN PROBIOTICO



T E S I S

PARA OBTENER
LA MAESTRIA EN CIENCIAS
(MICROBIOLOGIA)
QUE PRESENTA
ANDREA RODRIGUEZ BOPON

DIRECTOR DE TESIS: M.C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE
ASESORES: M.C. EMERSONA SERDANO MIRANDA
M.C. SERGIO ESTRADA-PARMA



264810

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

INDICE

Agradecimientos

Abreviaturas

Resumen

1. Introducción	1
1.1 Adquisición de inmunidad pasiva	2
1.2 Sistema inmune	3
1.2.1 Ganglio linfático	5
1.2.2 Bazo	6
1.2.3 Recirculación de linfocitos	9
1.2.4 Ontogenia de la inmunidad activa	13
1.3 Estructura y ontogenia de la inmunidad del tracto gastrointestinal	16
1.3.1 Lámina propia	16
1.3.2 Linfocitos intraepiteliales	19
1.3.3 Placas de Peyer	21
1.4 Probióticos	26
1.4.1 Flora microbiana intestinal en el cerdo	27
1.4.2 Factores que influyen en el crecimientobacteriano en el intestino del cerdo	30
1.5 Mecanismos de acción de los probióticos	33
1.5.1 Antagonismo en contra de patógenos	33
1.5.2 Competencia de nutrientes	33
1.5.3 Competencia por los sitios de unión	33
1.5.4 Efecto inmunoestimulante	35
1.5.5 Otras actividades	37
2. Objetivos	38
3. Justificación	39
4. Hipotesis	39
5. Material y Métodos	40
5.1 Diseño experimental	40
5.2 Elaboración del probiótico	42
5.3 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica	44
5.3.1 Obtención de linfocitos de sangre periférica	44
5.3.2 Determinación de linfocitos T de sangre periférica por medio de la formación de rosetas E	44

5.3.3 Determinación de linfocitos B de sangre periférica por medio de la formación de rosetas EAC	45
5.3.4 Preparación de anticuerpos policlonales antigamma globulina de cerdo para la determinación de linfocitos B	45
5.3.5 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica por inmunofluorescencia directa e indirecta utilizando el citometro de flujo	47
5.3.5.1 Tinción de células para citometria de flujo	47
5.4 Estudio histológico de tejido linfoide e intestino	49
5.4.1 Determinación de estructuras histológicas relacionadas con el desarrollo del sistema inmune en tejido linfoide e intestino por la técnica de Hematoxilina y eosina	49
5.4.2 Determinación de células activadas en tejido linfoide e intestino por la técnica de Verde metil pironina	50
5.5 Determinación de linfocitos B y Subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfoide e intestino por técnicas inmunohistoquímicas	50
5.5.1 Determinación de linfocitos B por inmunofluorescencia directa de células linfoides de ganglio linfático mesentérico posterior	50
5.5.1.1 Obtención de células linfoides de GLMP	50
5.5.1.2 Tinción	51
5.5.2 Determinación de subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfoide e intestino por la técnica de inmunoperoxidasa	51
6. Resultados	55
6.1 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica	55
6.1.1 Determinación de linfocitos T y B por rosetas E y EAC	55
6.1.2 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica por inmunofluorescencia directa e indirecta utilizando el citometro de flujo	56
6.2 Estudio histológico de tejido linfoide e intestino	61
6.2.1 Determinación de estructuras histológicas relacionadas con el desarrollo del sistema inmune en tejido linfoide e intestino por la técnica de Hematoxilina y eosina	61
6.2.2 Determinación de células activadas en tejido linfoide e intestino por la técnica de Verde metil pironina	64
6.3 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfoide e intestino por técnicas inmunohistoquímicas	68
6.3.1 Determinación de linfocitos B por inmunofluorescencia directa de células linfoides de gangliolinfático mesentérico posterior	68

6.3.2 Determinación de subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfoide e intestino por la técnica de inmunoperoxidasa	69
7. Discusión	77
7.1 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica	77
7.1.1 Determinación de linfocitos T y B por medio de la formación de rosetas E y EAC	77
7.1.2 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica utilizando el citómetro de flujo directa en células linfoides de GLMP	78
7.2 Estudio histológico de tejido linfoide e intestino	83
7.2.1 Determinación estructuras histológicas relacionadas con el desarrollo del sistema inmune por medio de la técnica de hematoxilina y eosina	83
7.2.2 Determinación de células activadas en tejido linfoide e intestino	84
7.3 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfoide e intestino por técnicas inmunohistoquímicas	84
7.3.1 Determinación de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T por inmunofluorescencia directa en células linfoides de ganglio mesentérico posterior	84
7.3.2 Determinación de subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfoide e intestino por medio de la técnica de inmunoperoxidasa	85
8. Conclusiones	89
9. Bibliografía	90
Apéndice	

INDICE DE FIGURAS

FIG. 1.1 Estructura del bazo	8
FIG. 1.2 Detalle de centros germinales del bazo	9
FIG. 1.3 Esquema de moléculas de migración linfocitaria	12
FIG. 1.4 Esquema de placa de Peyer de murino	21
FIG. 1.5 Esquema de la célula M	23
FIG. 1.6 Relación de especies domésticas y silvestres en la adquisición de flora intestinal	28
FIG. 1.7 Posibles mecanismos de acción de los probióticos	34
FIG. 5.1 Diagrama de flujo del protocolo experimental	41
FIG. 5.2 Procedimiento para elaborar el probiótico	42
FIG. 5.3 Diagrama de flujo de la titulación del cultivo bacteriano	43
FIG. 6.0 Esquema de la localización de las regiones de linfocitos	56
FIG. 6.1 Bazo (H y E)	67
FIG. 6.2 Bazo -focos de células plasmáticas (H y E)	67
FIG. 6.3 GLMP (H y E)	67
FIG. 6.4 Vellosidad de duodeno (H y E)	67
FIG. 6.5 Placa de Peyer (H y E)	67
FIG. 6.6 GLMP (H y E)	67
FIG. 6.7 Bazo testigo de tinción (inmunoperoxidasa)	74
FIG. 6.8 Bazo -áreas CD2+ (Inmunoperoxidasa)	74
FIG. 6.9 GLMP testigo de tinción (inmunoperoxidasa)	74
FIG. 6.10 GLMP -áreas CD2+ (Inmunoperoxidasa)	74
FIG. 6.11 Placa de Peyer testigo de tinción (inmunoperoxidasa)	75
FIG. 6.12 Placa de Peyer, áreas interfoliculares CD2+ (Inmunoperoxidasa)	75
FIG. 6.13 Región de domo, células CD4+	75
FIG. 6.14 Folículos en placa de Peyer células CD4+	75
FIG. 6.15 Acercamiento de de centro folicular, células CD4+	76
FIG. 6.16 Yeyuno testigo de tinción (inmunoperoxidasa)	76
FIG. 6.17 Yeyuno CD2+ (Inmunoperoxidasa)	76

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.1	Subpoblaciones de linfocitos en el cerdo	5
CUADRO 1.2	Características de la respuesta inmune sistémica del lechón neonato	15
CUADRO 1.3	Características de las poblaciones de linfocitos encontradas en la mucosa de el intestino de los cerdos	19
CUADRO 1.4	Características fenotípicas de los linfocitos intraepiteliales de los cerdos	20
CUADRO 5.1	Protocolo de inmunización a conejos	46
CUADRO 5.2	Clonas utilizadas en la citometría de flujo	48
CUADRO 5.3	Estructuras histológicas revisadas con la tinción de hematoxilina y eosina	49
CUADRO 5.4	Estructuras histológicas revisadas con la técnica de inmunoperoxidasa	54
CUADRO 6.1	Determinación de linfocitos T y B en sangre periférica	55
CUADRO 6.2	Determinación de subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre periférica	57
CUADRO 6.3	Determinación de subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre periférica. Cálculo de linfocitos nulos (CD2- Igs-) y dobles negativos (CD2-CD4-CD8-)	59
CUADRO 6.4	Resumen de los resultados obtenidos en la determinación de subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre periférica	60
CUADRO 6.5	Determinación de células plasmáticas y manguito linfático periarteriolar en bazo	61
CUADRO 6.6	Determinación de folículos primarios y secundarios por campo en Ganglio Linfático Mesentérico Posterior	62
CUADRO 6.7	Células plasmáticas en criptas de duodeno y linfocitos intraepiteliales en duodeno y yeyuno	63
CUADRO 6.8	Determinación de linfocitos intraepiteliales, folículos y domos por campo en placa de Peyer de íleon	63
CUADRO 6.9	Determinación de células activadas en duodeno, yeyuno e íleon	64
CUADRO 6.10	Determinación de células activadas por campo en ganglio linfático mesentérico posterior	65
CUADRO 6.11	Determinación de células activadas por campo en bazo	65
CUADRO 6.12	Resumen de los resultados obtenidos de la determinación de estructuras histológicas relacionadas con el desarrollo del sistema inmune en tejido linfóide e intestino	66
CUADRO 6.13	Determinación de linfocitos B en ganglio linfático mesentérico posterior (inmunofluorecencia directa)	68
CUADRO 6.14	Determinación de áreas CD2+ en el manguito perivascular en bazo y en la paracorteza de ganglio linfático	69
CUADRO 6.15	Determinación de linfocitos CD2+,CD4+ y CD8+ en lámina propia de duodeno	70
CUADRO 6.16	Determinación de linfocitos CD2+,CD4+ y CD8+ en lámina propia de	70

	yeyuno	
CUADRO 6.17	Linfocitos CD2+ en epitelio de duodeno, yeyuno e Íleon	71
CUADRO 6.18	Determinación desubpoblaciones de linfocitos en áreas interfoliculares lámina propia, domos y folículos de Íleon	72
CUADRO 6.19	Resumen de los resultados obtenidos en la determinación de células B y subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfoide e intestino por técnicas inmunohistoquímicas	73

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Posgrado, en el laboratorio de Patología de la Carrera de Médico Veterinario Zootecnista en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM y en el laboratorio de Inmunología Molecular del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN

El entrenamiento en las técnicas de citometría de flujo e inmunohistoquímica se realizó en el laboratorio 2 del departamento de Genética del CINVESTAV

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias a las importantes aportaciones, entrenamiento y asistencia técnica del Dr. Marco Antonio Vega-López

Se agradece a la MVZ Yolanda Romero su indispensable apoyo en la realización de las técnicas histológicas

Para el diseño experimental de este trabajo se contó con la excelente asesoría de la C. Dr. Virginia Lara Sagahon

El trabajo de campo se llevo a cabo en La granja Tepatlaxco, se agradecen las facilidades prestadas por el Arq. Armando Ortiz y la MVZ Raquel Rosas

VERANO 1998

**Es necesario agradecer a todas aquellas personas que participaron de manera directa o indirecta con su apoyo para la realización de este trabajo, ya que sin ellas no habría sido posible.
Muchas gracias por su amistad.**

En particular a mi esposo por su comprensión y paciencia, así como a todos mis amigos, compañeros y maestros, con especial cariño al Dr. Sergio Estrada-Parra por su incondicional apoyo y ejemplo de inagotable energía, y a la M. C. Ernestina Serrano Miranda por sus sabios consejos.

ABREVIATURAS

ACTH. Hormona estimulante de la corteza adrenal

c-Kit. Tyrosine kinasa receptor for stem cell factor (receptor de tirosin-cinasa para el factor estimulante de células precursoras)

ConA. Conavalanina A

DAB. Diaminobenzidina

E. Rosetas E (espontáneas)

EAC. Rosetas EAC

FSC. Forward scatter (granularidad)

GC. Centro germinativo

GLMP. Ganglio linfático mesentérico posterior

H y E. Hematoxilina y eosina

HEV. High endotelial venule (vénula de endotelio alto)

IgS. Inmunoglobulina de superficie

IL. Interleucina

LAB. Bacterias ácido lácticas

LIE. Linfocitos intraepiteliales

LN. Linfonodo

LP. Lámina propia

MDP. Muramildipéptido

MHC. Complejo principal de histocompatibilidad

NK. Natural killer

PALS. Periarteriole lymphatic sheath (manguito linfático periarteriole)

PBS. Solución amortiguadora fosfatos

PCV. Vénula postcapilar paracortical

PHA. Fitohemaglutinina

PP. Placa de Peyer

PPD. Derivado proteico purificado

PWM. Poke weed mitogen

SIP. Puerto de inyección de la muestra

SCF. Stem cell factor (factor estimulante de células precursoras)

SSC. Side scatter (tamaño)

TNF. Factor de Necrosis Tumoral

VMP. Verde metil pironina

RESUMEN

Los sistemas intensivos de producción animal han condicionado la disminución de la eficiencia de los mecanismos de defensa, que han aumentado la incidencia de enfermedades, especialmente en la lactancia. Últimamente ha despertado grán interés el uso de probióticos buscando acelerar la maduración inmunológica del tracto gastrointestinal.

La evaluación del sistema inmune del lechón se realizó con el objetivo de establecer el efecto del probiótico sobre este.

Lechones recién nacidos recibieron el probiótico (*Lactobacillus casei* y *Streptococcus faecalis*) y el grupo testigo recibió un placebo, a los 15 días fueron sacrificados. Se tomaron muestras de bazo, ganglio linfático mesentérico posterior (GLMP), duodeno, yeyuno e íleon para el estudio histológico; se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) y con verde metil-pironina (VMP). En estos mismos tejidos se determinó la distribución y concentración de linfocitos T (CD2, CD4 y CD8) por la técnica de inmunoperoxidasa. A células linfoides extraídas de GLMP se les realizó inmunofluorescencia directa para determinar linfocitos B. En sangre se cuantificaron los linfocitos T y B por rosetas E y EAC, así como determinación de linfocitos CD2+, CD4+, CD8+ e Ig de superficie por citometría de flujo

Utilizando la técnica de H y E en los animales colonizados se observó lo siguiente: mayor cantidad de linfocitos intraepiteliales en duodeno. Con la técnica de VMP se observaron mayor cantidad de células activadas en la médula de GLMP. Por medio de la inmunohistoquímica se encontró que las áreas periarteriolares CD2+ de los lechones colonizados, están incrementadas. En los linfocitos de sangre periférica el hallazgo más sobresaliente fue la aparición de dos poblaciones de linfocitos, que no habían sido reportadas; aunque no se encontró diferencia entre los grupos experimentales. Los lechones colonizados con el probiótico experimental mostraron un mejor desarrollo en la composición y estructura de algunos tejidos linfoides.

1. INTRODUCCION

La mortalidad neonatal en los cerdos es una área pobremente entendida. Hay pocas respuestas para las graves pérdidas económicas en las granjas productoras de lechones. La industria porcícola es una de las que presentan mayor desarrollo tecnológico, a pesar de ello padece una alta mortalidad, aproximadamente un 12% de los lechones nacidos vivos y no ha sido substancialmente reducida desde los últimos 10 años (Varley, 1995). Alrededor de un 15-30% de los lechones no alcanzan las tres semanas de vida y algunas veces la mitad muere en la primera semana (Fahmy and Bernard 1971). En otras especies las pérdidas neonatales también ocurren, pero no son tan altas como las que se presentan en los cerdos. El cerdo al igual que otras especies políticas, se ha desarrollado permitiendo altas pérdidas neonatales como un mecanismo de selección natural (Varley, 1995)

Las causas de esta alta mortalidad probablemente son resultado de numerosas interacciones entre el lechón su medio ambiente y su disminuida capacidad inmunocompetente al nacimiento, lo que lo hace altamente susceptible a los patógenos (Varley, 1995).

Las pérdidas de lechones en las granjas comerciales continúan siendo muy altas y son inaceptables. En algunos casos resultan inevitables, como aquellas asociadas a factores genéticos letales, sin embargo, otras pérdidas pueden ser disminuidas aplicando la tecnología existente (Varley 1995).

FACTORES CAUSALES DE MORTALIDAD PREDESTETE

FACTORES HUMANOS: manejo

INMUNIDAD: pasiva y activa

PATOGENICOS: enfermedades, higiene

GENETICO: diferencias entre razas, híbridos

FACTORES FISICOS: traumatismos, equipo

NUTRICION: inanición y subalimentación

COMPORTAMIENTO: vigor, naturaleza competitiva

TEMPERATURA: termorregulación

Entre los factores inmunológicos, la adquisición de una inmunidad rápida y efectiva en contra de patógenos presentes en el medio inmediato al recién nacido, es esencial para su sobrevivencia. En el lechón esta protección proviene exclusivamente del calostro. No hay transferencia de inmunidad pasiva vía

placentaria, así que es absolutamente prioritario, que el lechón se alimente correctamente en las primeras dos horas posteriores al parto. El sistema inmune del recién nacido es funcional, pero anatómicamente inmaduro; son especialmente vulnerables a infecciones, durante los 20-35 días de edad, período durante el cual los anticuerpos maternos calostrales han disminuido, antes de que los mecanismos de inmunidad activa se hayan desarrollado (Varley, 1995).

El lechón durante las primeras semanas de vida depende del balance entre la inmunidad pasiva transferida vía calostro y su inmunidad activa (Gaskins and Kelley, 1995).

1.1 ADQUISICION DE INMUNIDAD PASIVA

Las cerdas, tienen placentación epiteliochorial, la IgG presente en el suero no atraviesa placenta, se concentra hacia el final de la gestación en el calostro (Holland 1990). Los anticuerpos calostrales son la primera fuente de protección inmune, por lo tanto la inmunidad del lechón esta condicionada a la cantidad y calidad de los anticuerpos en el calostro y a la cantidad que el neonato sea capaz de consumir y absorber (Holland 1990). Más aún, el espectro inmune del recién nacido esta restringido a aquellos antígenos contra los cuales la madre ha desarrollado células de memoria (Roth, 1992). La transición de un medio ambiente estéril en el útero a un medio rico en antígenos es una situación que puede poner en peligro la vida del neonato. La cerda provee de asistencia inmunológica transfiriendo anticuerpos en el calostro, que son transportados a la circulación del lechón (Tlaskasova-Hogenova 1994).

El isotipo predominante en el calostro es la IgG, que brinda protección en contra de muchos patógeno sistémicos, sin embargo, muchos de los agentes patógenos en el lechón se encuentran en las superficies mucosales donde la IgG rara vez se encuentra y es poco efectiva. Probablemente en respuesta a esta limitante, conforme avanza la lactación la IgG decrece en concentración y aumenta la IgA, hasta llegar a ser el isotipo predominante en la leche de la cerda (Varley, 1995).

La absorción máxima de inmunoglobulinas en el intestino del lechón ocurre durante las primeras 4-12 horas después del nacimiento (Weström et al., 1985). Las inmunoglobulinas son absorbidas a través del epitelio yeyunal por los vasos linfáticos (Holland 1990) y entran a la circulación por el conducto torácico (Roth, 1992)

El amamantamiento adecuado durante las primeras 24 horas de vida es crucial para para la futura sobrevivencia del lechón.

1.2 SISTEMA INMUNE

En el cerdo, como en todos los mamíferos, la inmunidad activa puede ser conceptualizada como un serie de mecanismos extremadamente complejos que han evolucionado de acuerdo a la naturaleza de los agentes patógenos que atacan esta especie (Gaskins and Kelley, 1995).

Los tejidos linfoides secundarios en el cerdo, muestran algunas propiedades distintivas en su estructura y fisiología. El sistema inmune porcino consta de tres compartimentos funcionales: 1) el tejido linfoide asociado a epitelios, especialmente mucosas, donde se encuentran los 4 tipos de placas de Peyer (PP), los tres tipos de amígdalas, el tejido linfoide asociado a los bronquios y tejidos similares en otras superficies, 2) los ganglios linfáticos (GL) que drenan la linfa de otros tejidos y 3) el bazo el cual actúa como un ganglio linfático en el torrente circulatorio, estos órganos linfoides representan los sitios de captura más eficientes de material antigénico, la presentación se da principalmente a linfocitos de fenotipo CD45 RA/C, por las células dendríticas con moléculas clase II, encontradas en la piel, células de Langerhans, en células en velo en el GL y células interdigitantes en el tejido linfoide interfollicular y células dendríticas foliculares (Rothkötter et. al., 1991; Binns and Pabst, 1994).

Las células presentadoras de antígeno (APC) "clásicas" son macrófagos, linfocitos B ó las ya mencionadas anteriormente; se asocian a la presencia de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), a células T que puede resultar en activación ó supresión de los mecanismos efectores humorales ó celulares del sistema inmune. El tipo de mecanismo efector inducido dependerá de el tipo de linfocito T cooperador que se active por la APC, Th1 ó Th2 (Bianchi, 1994).

Ciertas quimiocinas humanas el MIP α 1 (macrophage inflammatory protein-1 α), el MIP β y el MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1); tienen la capacidad de ejercer efecto quimiotáctico sobre algunas APC del cerdo como monocitos de sangre, macrófagos alveolares y células de la microglía, (Salak-Johnson et al., 1996).

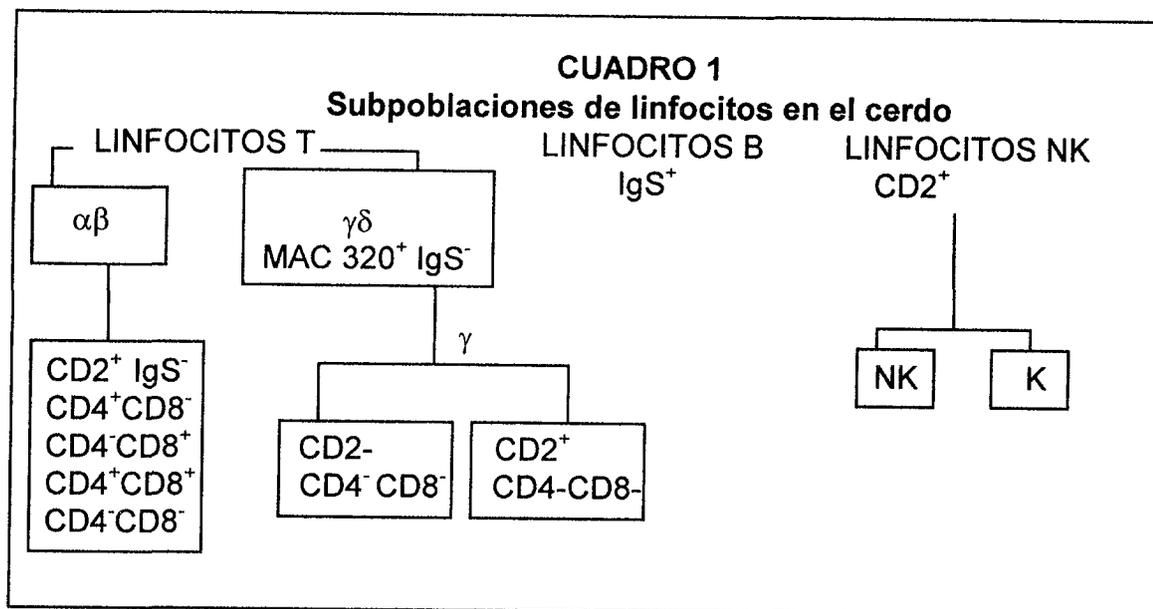
A lo largo de los años estudios en cerdos han revelado la existencia de tres familias principales de linfocitos en la sangre periférica T, B y células nulas, que fueron definidas inicialmente por anticuerpos policlonales, ensayos de rosetas y más tarde la aparición de anticuerpos monoclonales, estas poblaciones han sido definidas identificando 1) IgM en la superficie de la célula linfoide (Igs), para los linfocitos B y 2) por el CD2 ó receptor para glóbulos rojos de carnero; para los linfocitos T "clásicos", la tercera población se identificó por la ausencia de CD2 y de Ig de superficie. Recientemente se ha definido un nuevo antígeno por el monoclonal MAC320 y dicha población celular se divide en una gran población de células no adherentes al nylon y altamente **dependientes** del timo, NK-negativa llamada 'N' y una población menor **independiente** del timo no adherente al nylon, CD2- IgS-, que incluye algunas células NK llamada N'. Todas esta son llamadas células nulas que expresan el receptor de células T (TcR) $\gamma\delta$ y como

ya se menciona antes carecen de CD2, CD4, CD8 y de Ig de superficie (Licence et al., 1995; Zuckermann and Husmann, 1996). Se han caracterizado tres diferentes TcR $\gamma\delta$ todos definidos por una cadena δ de 40kDa pero se distinguen en la cadena γ , una de ellas con una peso molecular de 38kDa se expresa preferentemente en los linfocitos CD4⁻ CD8⁻ de la sangre periférica, otra cadena con una masa molecular de 37kDa también distribuida en linfocitos dobles negativos de sangre y tejido linfoide; la tercera cadena γ tiene una peso molecular de 46kDa pero se expresa en células CD2⁺ de tejidos linfoides. En síntesis en los cerdos existen subpoblaciones (ver cuadro 1) CD2⁻CD4⁻CD8⁻ y CD2⁺CD4⁻CD8⁻ y se caracterizan por la expresión de TcR del tipo $\gamma\delta$ (Thome et al., 1994).

Las subpoblaciones de células linfoides T en los cerdos maduros tienen propiedades muy singulares (ver cuadro 1) (Jonjic et al 1987; Lunney and Pescovitz, 1987; Saalmuller et al, 1989), mientras en otras especies los linfocitos T CD2⁺ pueden ser cooperadores CD4⁺ ó citotóxicos CD8⁺, el cerdo posee cantidades apreciables (10-60%) de linfocitos CD4⁺CD8⁺, dobles positivos, y CD4⁻CD8⁻, dobles negativos, (Pescovitz, et al 1985; Hirt et al., 1990; Binns et al., 1990; Zuckermann and Husmann, 1996) además una población relativamente grande de linfocitos CD8⁺ que presentan MHC clase II (Lunney and Pescovitz, 1987). Se han propuesto dos posibles orígenes de las células dobles positivas en humanos, primero que estas células representan precursores inmaduros emigrados del timo sin una diferenciación previa, segundo, que estas células representan linfocitos CD4⁺ que han adquirido el antígeno CD8 después de la sensibilización y que lo retienen después de su reversión a linfocitos pequeños. En el caso de los cerdos la primera situación no pudo ser comprobada; el tamaño de las células, la ausencia de CD1, una alta expresión de CD5 y la expresión de un marcador de células en reposo (8/1), hacen pensar que las dobles positivas pertenecen a una población de células maduras en reposo, pues son capaces de responder a reinfecciones virales y presentan $\beta 1$ integrina en su superficie; tienen características indiscutibles de células T como la presencia de CD2, la ausencia de inmunoglobulinas de superficie, la no adherencia a la lana-nylon, más aún proliferan en respuesta a un superantígeno (enterotoxina de estafilococo), lo que indica la presencia de un TcR funcionalmente maduro. *In vitro* se observó que linfocitos T CD4⁺ de cerdo hacen el cambio fenotípico a dobles positivas en respuesta a un aloantígeno (Zuckermann and Husmann, 1996; Zuckermann and Gaskins, 1996).

Las principales células efectoras de la respuesta innata son los neutrófilos, macrófagos, células T citotóxicas y las NK (natural killer) que son células linfoides cuya función es la citotoxicidad "natural", pueden eliminar una variedad de células nucleadas sin previa estimulación antigénica, pueden matar células tumorales y células infectadas por virus, en otras especies tienen receptores Fc para IgG y pueden mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, cuando esto ocurre se les llama células K (Roth., 1992). En el cerdo las células NK son linfocitos pequeños granulares CD2⁺ y como en otras especies responden al interferon gamma (Duncan, et al, 1989), hay evidencia que las células NK y las células con actividad K son diferentes poblaciones (Roth., 1992).

Se ha logrado aislar e identificar de las células NK y linfocitos T del intestino delgado, colón, sangre periférica, ganglios linfáticos y bazo del cerdo a un péptido llamado NK-lisina, con acción antimicrobiana, en contra de *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium*, y marcada actividad lítica sobre células de una línea tumoral (Anderson et al., 1996).



CUADRO 1.1 En este cuadro se observan las diferentes subpoblaciones de linfocitos presentes en la sangre y los tejidos de los cerdos, identificándolas por su principales marcadores de superficie.

Los subtipos de linfocitos incluyen: reposo/virgenes, activadas/memoria, linfoblastos/ efectoras, en otras especies la transformación de células en reposo prolonga el promedio de vida, se acompaña por la expresión de ciertas moléculas de adhesión y el cambio en el fenotipo de CD45R por CD45RA/C que identifica a las células virgenes y CD45RO que indica un cambio permanente a célula de memoria (Zuckermann, 1994).

1.2.1 GANGLIO LINFÁTICO

La principal función de los ganglios linfáticos o linfonodos es filtrar y atrapar antígenos y células que contienen antígeno en la linfa, que fluye hacia ellos por el linfático aferente, brinda un sitio para la expansión clonal de células linfoides. Los linfonodos son órganos donde se organizan células móviles, se distinguen dos regiones: una corteza y una médula (Anderson, 1990); excepto en el cerdo, donde como ya se mencionará más adelante, no hay corteza, ni médula, ni cordones de linfocitos, ni senos medulares característicos de este órgano, además la circulación linfática esta invertida de modo que la entrada es por el hilio linfático.

La linfa aferente drena a una cámara (seno subcapsular) el cual distribuye la linfa sobre toda la superficie superior de la corteza; células móviles y materiales solubles pasan a la corteza a través de poros en el piso del seno subcapsular,

aquí hay una gran actividad fagocítica y es la entrada de los antígenos al linfonodo. Los macrófagos se encuentran cerca de los poros, en la médula y difusos en la corteza profunda, no todos tienen funciones de presentación de antígeno, pero todos tienen capacidad fagocítica y participan en la ingestión y degradación de los antígenos. Las células dendríticas interdigitantes (IDC) muestran contacto físico con macrófagos y células T corticales. Las células reticulares fibroblásticas también unen antígeno sin fagocitosis (Anderson, 1990).

Los centros germinales (GCs) son compartimentos linfoides donde las células B son estimuladas por antígenos T dependientes, sufren división, cambio de isotipo y desarrollo de células de memoria (Anderson, 1990). Se distingue una zona central con linfoblastos células dendríticas foliculares y macrófagos, de un manto periférico con células B pequeñas que expresan IgM de superficie y algunas células T CD4+ y CD8+, el rearrreglo de las cadenas pesadas ocurre en los centros germinales; la zona de manto, ahí se almacenan linfocitos B antes del cambio de isotipo; dentro de los centros germinales las células B activadas "ven" al antígeno en las células dendríticas y reciben ayuda de linfocitos CD4+, la frecuencia de estas células es relativamente baja pero resultan más abundantes que las CD8+. Las células B se dividen y migran fuera del folículo como linfoblastos, dejan el nódulo y llegan a bazo, formando focos inflamatorios y pueden llegar a otros tejidos linfáticos (Anderson, 1990).

Las áreas paracorticales y corteza profunda, son zonas donde las células se distribuyen en forma difusa y se localizan un tipo especializado de estructuras vasculares, las vénulas de endotelio alto (HEV), es una área T dependiente y su tamaño varía con la estimulación antigénica, los linfocitos que ahí se encuentran pertenecen a las reservas recirculantes, el 75% son células T y el 25% son células B (Anderson, 1990).

1.2.2 BAZO

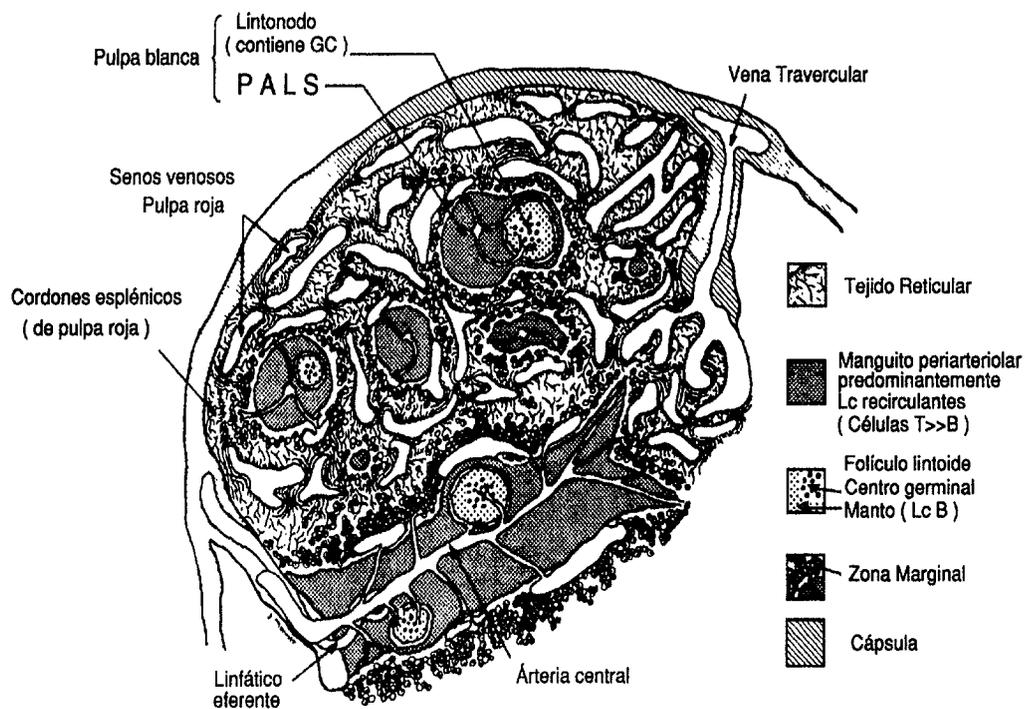
El bazo filtra sangre y es el órgano linfóide más grande de todo el organismo. Tiene una cápsula fibrosa con trabéculas musculares que se introducen en el tejido para subdividirlo en lóbulos. El bazo se puede dividir en pulpa blanca, formada por acumulos cilíndricos de linfocitos alrededor de las arterias y la pulpa roja que se compone de eritrocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y granulocitos en cordones esplénicos de tejido reticular que semeja una esponja, donde hay un paso casi libre a través del endotelio fenestrado de las paredes de los senos venosos esplénicos. La pared de los senos venosos del bazo está formada por células endoteliales elongadas que recuerdan en su forma a las tablas de un barril, unidas por haces de fibras reticulares. Toda la sangre que es liberada a los cordones esplénicos es filtrada por entre las células endoteliales, sale a los senos y retorna a la circulación. El bazo monitorea las células anormales en la sangre por la filtración en los senos venosos y por exploración de antígenos de superficie por fagocitos mononucleares (Anderson, 1990).

El bazo es irrigado por la arteria esplénica que se subdivide en brazos y pasa a través de las trabéculas como una arteria de mediano calibre, se rodea por tejido linfático (pulpa-blanca o periarteriolar lymphatic sheath, PALS), estos vasos terminan en pequeñas arteriolas que atraviesan a los PALS y se vacían en la pulpa roja; dentro de la pulpa blanca pequeños vasos perpendiculares de la arteriola central proveen de un anillo de senos en la zona marginal de los PALS, esta zona marginal es crítica para la recirculación de los linfocitos Fig 1.1(Anderson, 1990)

Este órgano recibe una gran proporción del total de la sangre circulante, lo que contribuye a su efectividad filtrando la misma y como sitio de recirculación linfocítica. La filtración de células seniles, desechos, microorganismos, ocurre principalmente en los cordones de la pulpa roja, las células reticulares sirven de anclaje para los fagocitos. La pulpa blanca del bazo es el primer sitio de iniciación de respuesta inmune a antígenos y patógenos que han invadido el torrente sanguíneo. Los mononucleares y linfoblastos que han estado en contacto con el antígeno liberados a la linfa eferente por otros tejidos linfoides llegan al bazo y forman zonas de proliferación T y B (Anderson, 1990). Los PALS son análogos a la paracorteza de los linfonodos por que contienen principalmente linfocitos T recirculantes y células B además de células dendríticas interdigitantes, la segregación de células T y B no siempre es rigurosa, los folículos se localizan en el límite entre los PALS y la zona marginal y contienen predominantemente células B y son idénticos a los que se encuentran en los linfonodos. La pulpa blanca de bazo provee de el microambiente para el atrapamiento de antígenos, colaboración, proliferación linfocítica, maduración de linfocitos B y producción de anticuerpos Fig. 1.1 (Anderson, 1990).

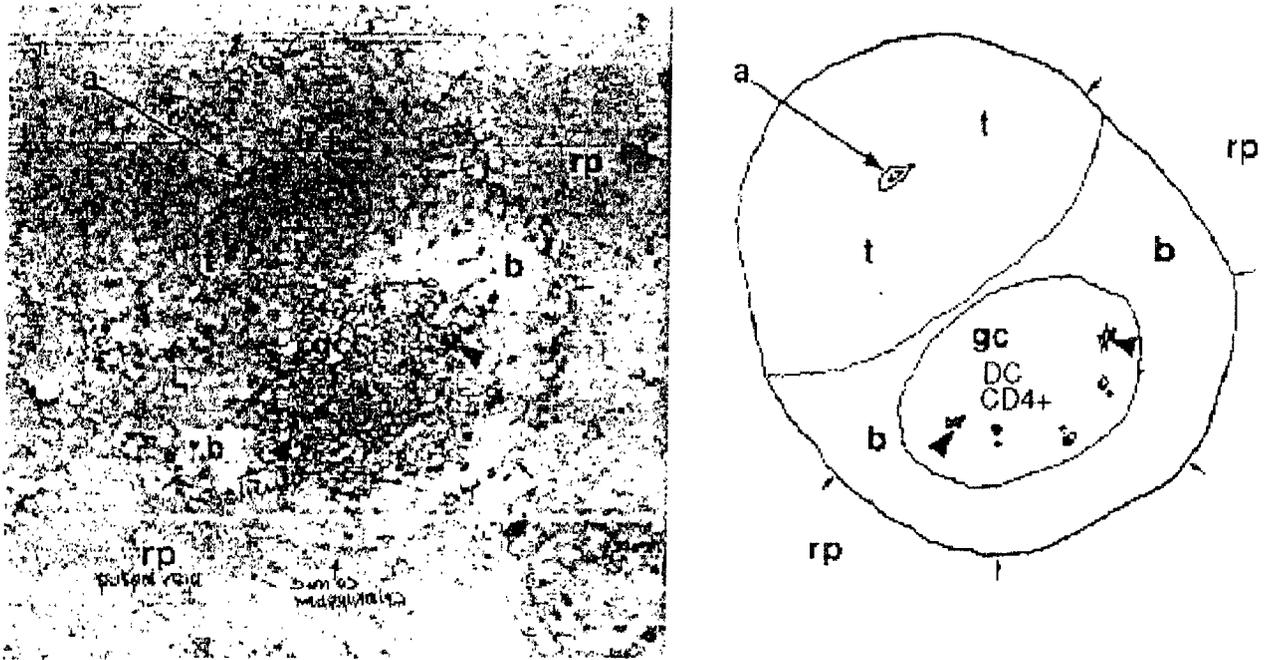
Las células B se activan en las zonas T y migran a las zonas B para formar los centros germinales (GC) con un retículo de células dendríticas foliculares (FDCs), que sirven de depósito de antígeno no procesado y son potentes estimuladores de los linfocitos B previamente activados. Los GC se organizan en una zona oscura que contiene centroblastos proliferantes y es la más próxima a los PALS y una zona clara con células en reposo (centrocitos), FDCs y unas pocas células T cooperadoras CD4+, como se observa en la figura 1.2 (Kelsoe,1996). En la actualidad se reconoce que el proceso de colaboración T y B mediante el CD40 y su ligando CD40L de las células T activadas, ocurre en los GCs (Kelsoe, 1996). Durante la respuesta inmune activa, linfoblastos B en diferenciación habitan en cordones y senos de la pulpa roja donde maduran y empiezan la secreción de anticuerpos (Anderson, 1990).

Los linfocitos entran al bazo por la arteria esplénica y salen por la vena del mismo nombre. Las arteriolas terminan en los senos venosos y en otras ocasiones en la zona marginal, este sitio contiene un grupo heterogéneo de células mononucleares cuya principal función es el atrapamiento de los antígenos, atraviesan la zona marginal y entran a los PALS (Anderson, 1990).



Tomado de Anderson 1990.

FIGURA 1.1 Estructura del bazo normal, se muestra la pulpa roja y la pulpa blanca y sus componentes. PALS: periaarterial lymphatic sheath, Lc: linfocitos.



Tomado de Kelsoe, 1996.

FIGURA 1.2

Detalle de los centros germinales en el bazo del ratón. a) arteriola central, b) Folículo linfoide, t) zonas de linfocitos T, rp) pulpa roja, gc) centro germinal, y dc) células dendríticas CD4+. Las flechas señalan los senos marginales.

1.2.3 Recirculación de linfocitos

La migración linfocitaria es un mecanismo por el que rápidamente se puede reconocer a sustancias antigénicas y distribuir la respuesta inmune (Butcher and Picker, 1996). Las principales finalidades de la recirculación en la defensa del organismo son: capacitar a los linfocitos adecuados para encontrar los epitopos inmunogénicos presentados a las células dendríticas, también localiza las subpoblaciones de leucocitos y células linfoides en los sitios de inflamación para ejercer las funciones efectoras y regulatorias, además la maduración de los precursores de células dendríticas, linfoides y leucocitos. El tráfico de linfocitos incluye la migración desde órganos hematopoyéticos primarios como la médula ósea, el hígado fetal, el bazo y el saco vitelino a sitios de diferenciación como el timo u órganos como las placa de Peyer y bolsa de Fabricio y dispersión hacia los focos periféricos funcionales (Binns et al., 1996).

La mayoría de los linfocitos maduros recirculan continuamente, de la sangre al tejido y de regreso a la sangre aproximadamente dos veces por día (Butcher and Picker, 1996), este movimiento es mediado por moléculas específicas en la superficie de las células; linfocitos y células endoteliales de las vénulas postcapilares de endotelio alto (HEV) de diferentes tejidos; en las áreas interfoliculares de los principales órganos linfoides organizados, este tráfico puede ser regulado por el antígeno, por citocinas como el $TNF\alpha$ ó ciertos

mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA) ó la concavalanina A (Holzman and Weissman, 1989; Osborn, 1990; Butcher and Pitcher 1996). Las células T, B y las APC localizadas en tejidos linforeticulares dispersos en todo el organismo mantienen la comunicación por recirculación constante de subpoblaciones de linfocitos, que pertenecerán por horas (timo) ó pocos minutos (bazo) en los principales tejidos linfoides organizados (Gaskins and Kelley, 1995).

El tráfico de linfocitos, involucra una cascada de interacciones entre selectinas y ligandos polisacáridos, quimiocinas tisulares y sus receptores, integrinas y moléculas de la superfamilia de las Ig, posiblemente CD44 y sus ligandos, que garanticen el anclaje, activación y diapedesis de las células (Binns et al., 1990). El proceso de reclutamiento ha sido separado en pasos sucesivos: la adhesión primaria, rodamiento de leucocitos y anclaje, mediado por selectinas y $\alpha 4$ integrinas, la cual es transitoria y reversible; quimiocinas y quizás epitopos de carbohidratos señalan a los leucocitos a través de sus receptores (Binns et al., 1996; Butcher and Picker, 1996).

El primer paso esta regulado por ligandos vasculares, el mejor ejemplo es la L-selectina (lectina tipo C) que se expresa en vénulas postcapilares especialmente en vénulas de endotelio alto (Butcher and Picker, 1996). La distribución topográfica y especialización molecular de esta selectina permite eficientar las interacciones de los linfocitos en sangre, evitando interacciones inapropiadas durante la estasis vascular y asegura la reversibilidad de la adhesión primaria en ausencia de los eventos subsecuentes (Butcher and Picker, 1996). La E-selectina media la entrada de neutrófilos, eosinófilos basófilos, monocitos, y células de memoria CD2+ a sitios de inflamación (Binns et al., 1996)

Una vez reclutados los linfocitos en los tejidos se distribuyen en dominios específicos, los folículos de células B y las zonas T en los tejidos linfoides secundarios (Butcher and Picker, 1996).

Quizás la dicotomía más significativa del tráfico de linfocitos sea la concerniente a la distribución diferencial de los linfocitos vírgenes *versus* linfocitos memoria/efectores. En general los linfocitos vírgenes están programados para recircular por los órganos secundarios (linfondos, PP, bazo y amígdalas). Estos órganos colectan los antígenos de las superficies epiteliales, tejidos y sangre y lo presentan a células vírgenes B y T en el contexto de microambientes linfoides especializados en donde hay una diferenciación inducida por el antígeno al mismo tiempo que se eliminan las células autoreactivas. La mayor parte de los linfocitos de memoria y efectores también circulan por los órganos linfoides, pero además entran a los sitios efectores como por ejemplo la pulpa roja del bazo, la médula del GL, la lámina propia del intestino, el intersticio pulmonar, la piel inflamada y las articulaciones (Rothkötter et al., 1991; Gaskins and Kelley, 1995 ; Butcher and Picker, 1996).

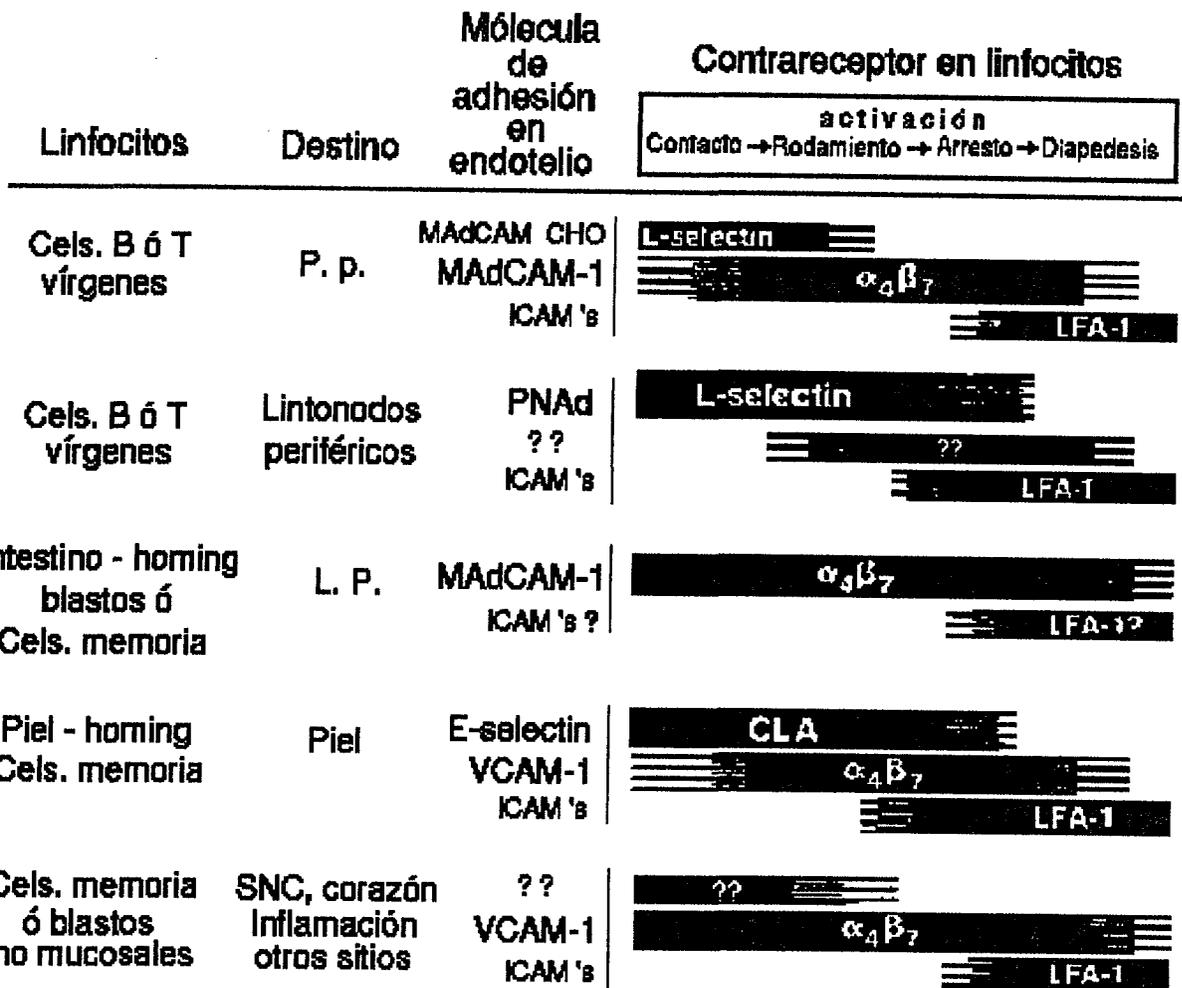
El control de la especificidad tisular, parece estar programada genéticamente, y se presenta en el feto inmunocompetente y aislado de los antígenos externos, desde el segundo tercio de la gestación (Binns and Licence 1985).

El cerdo posee aspectos únicos en su sistema inmune, que brindan un especial desafío para el entendimiento de la recirculación linfocítica y el desarrollo de la inmunidad activa, por ejemplo los linfonodos están invertidos con una densa médula donde no existen senos medulares ni los cordones de linfocitos característicos de otras especies (Binns, 1982). Los linfocitos recirculantes ingresan a los linfonodos desde las HEV (Mcfarlin and Binns 1973) y presentan ligando para L-selectinas (Binns et al., 1996) y por linfáticos aferentes (Mcfarlin and Binns 1973) los linfocitos en lugar de emigrar a través de los linfáticos eferentes (Binns, 1982), salen de estos tejidos directamente con la sangre vía vénulas postcapilares paracorticales (PCV). Los linfocitos T y B utilizan este sistema de recirculación (Binns and Pabst, 1994). Mientras los linfocitos T $\gamma\delta$ utilizan otra ruta (Binns et al., 1996) la linfa eferente contiene muy pocos linfocitos. Estudios recientes con microscopía electrónica de los linfonodos de los cerdos muestran células que forman puentes intravascularmente, lo que podría ser la base morfológica del inusual tráfico de linfocitos en los ganglios linfáticos (Gaskins and Kelley, 1995).

El regreso de los blastos generados en PP de intestino delgado a duodeno y yeyuno que regresan ocurre por vías diferentes a otras especies (Binns and Pabst 1994). El tráfico de la PP al linfonodo mesentérico ocurre vía sanguínea directamente por la vena porta y llega a la sangre arterial a la arteria aorta y hasta el intestino pasando por la microvasculatura pulmonar y hepática que presenta abundantes macrófagos intravasculares (Gaskins and Kelley, 1995). La migración constitutiva a través de órganos tan importantes como bazo, hígado y médula ósea es de corta duración y provee de depósitos celulares y sitios efectorios con rápido acceso al torrente sanguíneo, los pulmones y el hígado representan un importante sitio de remoción de complejos inmunes; el bazo presenta uno de los mayores niveles de tráfico, se ha encontrado la expresión constitutiva en cerdos jóvenes de VCAM-1 en este órgano, además en médula ósea y pulmón (Binns et al., 1996).

En otras especies el tráfico de linfocitos (fig. 1.3), en mucosas está regulado por una serie de receptores y contrareceptores que se localizan en los linfocitos y en las HEV, una adhesina (mucosal addressin adhesion molecule 1) MadCAM-1 se localiza en las HEV de PP y linfonodos mesentéricos, no se encuentra en los linfonodos periféricos, el contrareceptor es la $\alpha_4\beta_7$ integrina (CD49d/ β_7) que se expresa en los linfocitos que transitan en las superficies mucosas, el tráfico de linfocitos vírgenes por las PP requiere la L-selectina y $\alpha_4\beta_7$ integrina. En contraste la interacción única de $\alpha_4\beta_7$ MadCAM-1 para el tráfico de células activadas/memoria en la lámina propia, esto concuerda con el hallazgo de que las células de la lámina propia no tienen L-selectina (Kagnoff, 1996).

En cerdos se sabe que es probable que este involucrada la vía L-selectina y LFA-1/ICAM; antiVLA-4 inhibe la entrada a la PP, presumiblemente interrumpe la interacción $\alpha_4\beta_7$ con la aún no identificada molécula MadCAM pero se inhibe la entrada al timo (Binns et al., 1996)



Tomada de Buchter, 1996

Figura 1.3

Esquema de las moléculas que están relacionadas con la migración linfocitaria y su localización en el ratón.

En resumen el resultado de la activación de los linfocitos y la mitogénesis es el desarrollo y exportación a partir de los tejidos linfoides de linfoblastos precursores de células linfoides y su relocalización y acumulación en los sitios apropiados ya sea como células plasmáticas ó linfocitos citotóxicos ó células de memoria (Binns and Pabst 1994).

1.2.4 Ontogenia de la Inmunidad Activa

El limitado número de estudios dirigidos a evaluar el desarrollo de la inmunidad activa del cerdo indican reducida cantidad de células efectoras y una respuesta disminuida, lo que explica la inmunodeficiencia en los cerdos jóvenes (Gaskins and Kelley, 1995).

En estudios realizados en cerdos libres de patógenos específicos evaluados desde los dos días antes del nacimiento, por técnicas inmunohistoquímicas, se encuentra un número detectable de linfocitos B inmaduros que están presentes en bazo, GL, PP y timo (Biachi et al 1992).

Se han estudiado los patrones de migración de linfocitos en los fetos porcinos donde, la transferencia de linfocitos en cerdos uniformes genéticamente indica, que en la mayor parte de los tejidos, la adquisición de patrones tisulares específicos de "homing", aparecen en ausencia de antígenos exógenos y es probable que sea uno de los primeros eventos de desarrollo del cerdo (Binns and Licence, 1985). La expresión de genes que codifican para las moléculas que median la migración de linfocitos a tejidos específicos, se desarrolla en etapas muy tempranas del desarrollo, sin necesitar de células efectoras inmunocompetentes (Gaskins and Kelley, 1995).

Al nacimiento los animales, experimentan una amplia gama de cambios fisiológicos que desembocan en la autonomía del individuo. Las adaptaciones fisiológicas son necesarias para alcanzar la independencia y quizá sea más evidente en el sistema inmune y en el aparato digestivo. Normalmente hay una abrupta transición de un medio ambiente seguro y protegido con un aporte suficiente de nutrientes a un ambiente donde el animal debe aprender rápidamente a defenderse por sí mismo y contener a los agentes potencialmente dañinos. Generalmente el animal es incapaz de montar una respuesta inmune efectiva, pero desarrolla esta capacidad en las primeras semanas de vida (Schwager and Schulze, 1997)

La actividad leucocitaria durante las etapas tempranas de la vida del lechón, esta influenciada por los niveles de cortisol, prostaglandinas, leucotrienos y péptidos vasoactivos intestinales, por lo que algunos investigadores sugieren que el sistema inmune del neonato se encuentra deprimido más que inmaduro (Hoskinson et al., 1990)

Algunos marcadores son muy cercanos a los observados en los adultos como Ig de superficie, MHC clase I, mientras otros están mucho más bajos (CD4 y CD8) los cambios más dramáticos se observan el día 7 de vida postnatal (Schwager and Schulze, 1997).

Una gran proporción de células carecen de los marcadores clásicos de linfocitos T y B, esta población no responde a PHA y a Con A ni a estímulos antigénicos, de estas células una proporción presenta TcR $\gamma\delta$. Por lo menos una parte de las células que carecen de marcadores pertenece al grupo de células nulas (Schwager and Schulze, 1997).

En animales recién nacidos un alto porcentaje de leucocitos mononucleares presentan marcadores como MHC I, IgM de superficie, a la semana de vida estas células no expresan otro marcador. Presumiblemente las células nulas e inmaduras son "sembradas" en el sistema inmune durante este período (Licence and Binns, 1995). Puede ser que estos cambios se aumenten con el estrés del nacimiento, como se ha visto en otras especies, por ejemplo en el borrego (Hein et al., 1990).

La respuesta humoral de los cerdos neonatos es muy deficiente hasta la cuarta semana de vida y demuestran tener una escasa producción de Ig *in vivo* por la inoculación de un antígeno T dependiente (lisozima de huevo), así como *in vitro* por la estimulación de una lectina (pokeweed mitogen), sin embargo los linfocitos B son totalmente competentes si se les administran altas dosis del antígeno ó si se enfrentan a antígenos timo independientes como el lipopolisacárido, por otro lado los linfocitos T son capaces de responder a mitógenos (fitohemaglutinina, PHA). Los linfocitos T alcanzan niveles de respuesta a mitógenos semejantes a los de los adultos a las dos semanas de vida y los linfocitos B hasta las 4 ó 5 semanas (Schwager and Schulze, 1997). La escasa respuesta humoral quizá se debe a una sutil deficiencia en la cooperación de las células T (Hammerberg et al., 1987). Así mismo la respuesta de células B a LPS esta claramente retardada, este daño puede implicar la incapacidad de producir anticuerpos en respuesta a patógenos en la vida temprana del lechón. La proporción de linfocitos T y B maduros esta disminuida durante la primera semana de vida y las células circulantes tienen una pobre capacidad de producir interleucinas y responder a mitógenos. La producción de IL-2 por células activadas con Con A esta virtualmente ausente en los recién nacidos, mientras que a las dos ó tres semanas de vida ya se producen altas concentraciones de esta interleucina por los linfocitos T activados. En contraste la IL-6 se produce en la primera o segunda semana, por las células T activadas del sistema inmune del neonato. La IL-6 actúa en la activación y diferenciación de linfocitos T y B al igual que en la diferenciación de células hematopoyéticas (Schwager and Schulze, 1997). En ratones la IL-6 aumenta la expresión de receptores para IL-2 y la producción de IL-2 (Van Snyck, 1990), presumiblemente la baja producción IL-2 e IL-6 inciden en la escasa frecuencia de células productoras de Ig *in vivo* e *in vitro* (Suganuma et al., 1986)

En lo que respecta a los linfocitos T se ha encontrado una deficiencia en el número total de células (Hammerberg et al., 1987) y en cuanto a los dobles positivos, a la semana de nacidos representa menos del 2% del total de la población de linfocitos, al mes representa el 4.6%, la población seguirá aumentando hasta constituir un 10% de los linfocitos de la sangre en cerdos de 5 meses, y el 15% en cerdos 12-20 meses. En las células CD4+CD8- o CD4-CD8+ no hubo cambios asociados a la edad, sin embargo hay una tendencia a incrementar los niveles de CD8 (Zuckermann and Husmann, 1996). Alrededor de la semana 3 o 4 de vida del lechón, la proporción relativa de las diferentes subpoblaciones de linfocitos es muy semejante a la que se observa en los animales adultos (Schwager and Schulze, 1997)

A diferencia de los linfocitos, los macrófagos, monocitos y granulocitos al nacimiento tienen totalmente desarrollada la capacidad de activarse durante la fagocitosis y liberar grandes cantidades de intermediarios reactivos del oxígeno que matan a los patógenos fagocitados, esta capacidad permanece constante hasta las 6 ó 7 semanas (Schwager and Schulze, 1997).

En muchos casos, las enfermedades neonatales de los porcinos causan graves pérdidas económicas, cualquier deficiencia de parte del lechón para montar una efectiva respuesta inmune lo predispone a sufrir enfermedades infecciosas, el período de mayor susceptibilidad abarca las tres ó cuatro primeras semanas de vida, donde los mecanismos específicos celulares están claramente deficientes, aunque se compensan por la gran actividad de la respuesta inespecífica (Schwager and Schulze, 1997)

Cuadro 1.2
Características de la respuesta inmune sistémica del
lechón neonato

CELULAS T	CELULAS B
deficiencia en marcadores no responden a mitógenos no responden a estímulos antigénicos alta proporción de células $\gamma\delta$ alta proporción de células nulas baja producción de interleucinas ausencia de IL-2 producción de IL-6 menos del 2% de dobles positivos deficiencia en el número total	deficiencia en marcadores no responden a mitógenos no responden a estímulos antigénicos escasa producción de Ig a Ag timo dependientes respuesta retardada a LPS baja proporción

Se muestran algunas características que se presentan en los lechones recién nacidos que alcanzan los niveles de adultos hasta las 3-4 semanas de vida.

1.3 Estructura y Ontogenia de la Inmunidad del Tracto Gastrointestinal

Se estima que la superficie mucosal del tracto gastrointestinal en un humano adulto en el tracto gastrointestinal es de 200-400 m², por lo que es la superficie más grande del organismo expuesta al medio externo. El sistema inmune en el intestino es por tanto el sitio inmunológico más grande del organismo, es capaz de montar respuesta inmune primaria y secundaria en contra de antígenos potencialmente patógenos, además puede evitar expresar respuestas dañinas en contra de proteínas alimentarias (Stokes et al., 1996).

El sistema inmune mucosal tiene dos funciones primordiales paradójicamente opuestas, amplifica el desarrollo de células B encargadas de la respuesta IgA secretoria contra antígenos ambientales pero en contra de otros antígenos induce una tolerancia (Anderson, 1990).

Se ha determinado la magnitud del tejido linfoides asociados al intestino incluyendo los linfonodos mesentéricos y contiene el 43% del total de los linfocitos, es rebasado solo por los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea que contienen el 51%). Se considera que el intestino ha desarrollado un complejo sistema inmune que monitorea el ingreso de antígenos y combate los intentos de invasión de los patógenos. Anatómicamente el sistema inmune intestinal esta dividido en compartimentos linfoides organizados y difusos (Binns and Pabst, 1994)

1.3.1 LAMINA PROPIA

El epitelio intestinal es una extensa superficie para la absorción de nutrientes y simultáneamente representa una barrera a un sin número de antígenos que continuamente pasan a través del tracto digestivo. La lámina propia es la región del intestino que comprende el tejido entre el epitelio y la capa muscular de la mucosa, incluye el centro de la vellosidad cubierta de células epiteliales que migran de las criptas a la punta de las mismas. Contiene una gran cantidad de macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas, eosinófilos y otros granulocitos, también existen los fibroblastos con actividad biológica y fibras musculares que conforman la estructura básica de las criptas y las vellosidades (Vega-Lopez et al., 1993; Viney and Macdonald, 1992). La migración linfocítica de la sangre a la lámina propia ocurre en los vasos especializados de la base de las vellosidades, los linfocitos de la lámina propia poseen receptores de "homing" que los unen selectivamente al HEV mucosal. El infiltrado de la lámina propia no depende específicamente del antígeno, ya que las células están presentes en el feto, aunque se incrementan después del nacimiento (Viney and Macdonald, 1992).

En la lámina propia hay una alta proporción de linfocitos CD45 (Stokes, 1994). En el humano hay gran cantidad de CD45RO+, lo que sugiere que las

células son de memoria o han sido activadas, parece ser que en el cerdo ocurre lo mismo (Stokes, 1996). Aproximadamente en igual proporción hay CD2+ y macrófagos/granulocitos (Vega-López et al., 1993). Al nacimiento, los macrófagos de la lámina propia cuya función predominante es presentar antígenos, están en muy baja proporción y se distribuyen por igual en las vellosidades y en las criptas (Vega-López et al., 1993). Poco después del nacimiento los macrófagos incrementan su número y empiezan a acumularse en las criptas hasta que alrededor de las 5 semanas alcanzan los niveles de animales adultos, (Vega-López, et al., 1995). El número de células dendríticas también se incrementa con la edad, acumulándose en lámina propia como lo hacen los macrófagos (Stokes et. al., 1992).

Aunque los linfocitos B y T están presentes desde el nacimiento en la lámina propia, las células se duplican en las primeras cuatro semanas después del nacimiento (Rothkötter et. al., 1991; Bianchi et al., 1992). Al nacimiento son células CD2+, CD4-,CD8- localizadas en la lámina propia de vellosidades, alcanzan su máximo número a las 5-7 semanas (Vega-Lopez et al., 1995). Paralelamente con este incremento, los linfocitos inmaduros se diferencian en las CD4+ ó CD8+ mostrando patrones diferentes; durante la primera semana de vida postnatal hay un dramático incremento de linfocitos T CD4+, mientras que los niveles de linfocitos CD8+ son bajos al nacimiento y se incrementan hasta las 5-7 semanas de vida (Rothkötter et al., 1991; Stokes et al., 1992; Vega-Lopez et al., 1995). En los cerdos adultos los linfocitos T CD8+ son los predominantes en la lámina propia, igual que en la sangre. Además los linfocitos CD4+ se encuentran predominantemente en el centro de la vellosidad y los CD8+ cerca de la membrana basal (Gaskins and Kelley, 1995).

En la lámina propia habita un significativo número de células que tienen un marcador común para macrófagos/granulocitos (74-22-15), la mayoría de estos son eosinófilos y un 10% son células cebadas, además de esta población hay una baja densidad de células que tienen características de macrófagos y células dendríticas. Localizadas muy superficialmente en las vellosidades del intestino delgado se ha logrado identificar células en velo (Stokes, 1996). En estudios de citofluorometría de doble color los eosinófilos de cerdo muestran grados variables de moléculas clase II (SLA-DR), que aumentan significativamente el número de células presentadoras de antígeno no profesionales en la lamina propia del intestino (Magyar et al., 1995; Stokes, 1996). En la superficie del eosinófilo humano también se pueden detectar otras moléculas de importancia: CD43, CD44, CD45 Fc γ RII, Fc ϵ RII, CR1 y CR3; el interferón γ induce la expresión de Fc γ RIII (Hartnell et al., 1992), también tiene receptores para la fracción Fc de la IgM e IgA (Gleich and Adolphson, 1986), expresa constitutivamente LFA-1, VLA-4 (Hartnell et al., 1990; Weller, 1992) y L-selectina y después de activación ICAM-1, IL-2R y CD4 (Lucey et al., 1989; Riedel et al., 1990). En el cerdo el 50% de los eosinófilos mucosales y de tejidos linfoides han perdido la molécula LFA-1 y parece ser que el monoclonal reconoce la forma inactiva de la molécula, por lo que los eosinófilos negativos pudieran ser células transmigrantes que expresan la forma activa de LFA-1 (Magyar et al.,

1995). Se sabe ahora, que los glucocorticoides y la ACTH causan migración en masa a los tejidos linfoides de eosinófilos, por lo que también pudiera ser que esta población de eosinófilos LFA-1 negativos sean recién llegados dirigidos por el estrés (Magyar et al., 1995).

En el intestino del cerdo en el subepitelio de la lámina propia hay muchas células con moléculas clase II, generalmente asociadas a APC no profesionales, por ejemplo el endotelio capilar, incluso en otras localizaciones como el pulmón, riñón, piel y otros órganos parenquimatosos. El endotelio capilar del intestino forma una red de vasos en la lamina propia inmediatamente debajo de la membrana basal del epitelio (Stokes, 1996)

Usando análisis de tres colores los linfocitos intraepiteliales (LIE) CD2+ son clase II negativos y los linfocitos en la vellosidad son clase II positivos, estudios con microscopía electrónica muestran el íntimo contacto que hay entre los linfocitos en la luz del capilar y la célula endotelial. La interacción entre la célula endotelial clase II positiva y linfocitos T CD4+ podría indicar un papel en la presentación del antígeno, pero no se sabe de la presencia de señales coestimuladoras, por lo que el resultado puede ser la anergia, quizá a esto se deba la alta concentración de células CD45RO+ y la escasa producción de IL-2 (Stokes, 1996)

Muchos estudios se han encaminado al conocimiento de la distribución de los linfocitos B, porque la vía de entrada de la mayor parte de las enfermedades infecciosas es por las mucosas (Biachi et. al. 1992). Las células que contienen Ig son diez veces más numerosas en las criptas (Brown and Bourne, 1976; Butler et. al., 1981; Brandtzaeg et. al. 1985). En el cerdo como en el humano la IgA y la IgM son la respuesta más importante en el intestino (Biachi and Heijden, 1994). La presencia de células plasmáticas si depende del antígeno, porque al nacimiento están ausentes (Viney and Macdonald, 1992).

La barrera inmunológica mejor estudiada es la IgA secretoria que es sintetizada por linfocitos B que fueron expuestos a el antígeno en la PP, la célula T en este microambiente secreta citocinas que favorecen el cambio de isotipo, linfocitos IgA+ salen de la PP a la circulación sistémica, regresan a la lámina propia del intestino, donde se diferencian en células plasmáticas capaces de producir IgA, que es transportada a la luz intestinal atravesando el epitelio, y se deposita en la superficie mucosal. La IgA mucosal protege evitando la adherencia de bacterias ó toxinas a las células epiteliales ó matando a los microorganismos patógenos, vía citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (Lamm, 1997).

CUADRO 1.3
Características de las poblaciones de linfocitos encontradas
en la mucosa de el intestino de los cerdos

FENOTIPO Y LOCALIZACION		AL NACIMIENTO	ADULTOS
CD2 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	LIE	+	+++
CD2 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	LIE	muy escasas	+++
CD2 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	LP	muy escasas	+++
CLASE II	LP	algunas	++
IgS ⁺	CRIPAS	muy escasas	+++

LIE: linfocitos intraepiteliales, LP: lámina propia

Desarrollo del sistema inmune mucosal del cerdo y distribución de los diferentes tipos celulares, conforme el lechón crece su sistema inmune va madurando y alcanza los niveles de adulto entre las 5 y 7 semanas de vida.

1.3.2 LINFOCITOS INTRAEPITELIALES

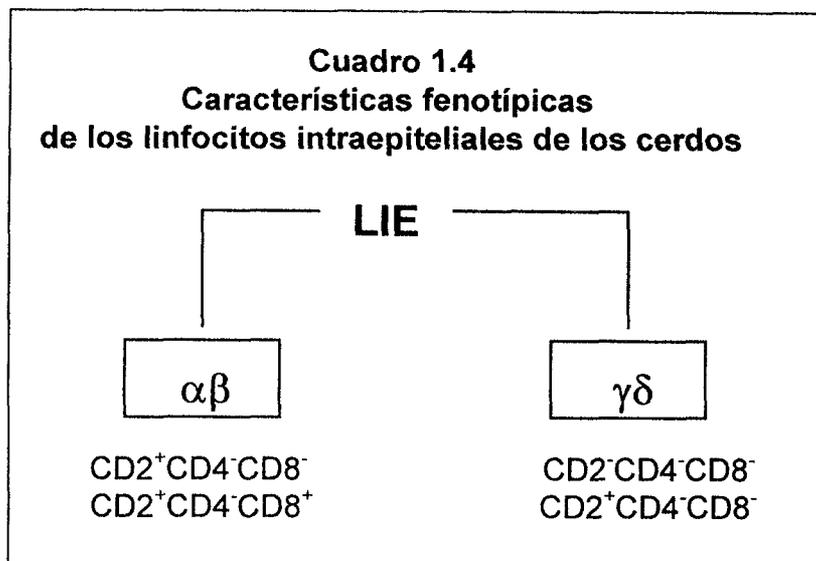
Los linfocitos intraepiteliales (LIE) generalmente están situados abajo de la membrana basal y en medio de las células epiteliales que cubren las vellosidades y las criptas, la posición de estos linfocitos es única ya que solo están separados de la gran carga de antígenos del lumen intestinal por las uniones de las células epiteliales (Viney and Macdonald, 1992). En otras especies se ha aclarado el mecanismo por el cual logran esta localización tan especial, estos presentan en su superficie una integrina (CD 103) por medio de la cual se adhieren a la E- cadherina de las células epiteliales, el CD103 tiene además funciones de trasducción de señales vía tirosin cinasa (Kagnoff 1996)

En el cerdo hay este tipo de linfocitos (Gaskins and Kelley, 1995); al nacimiento el número de LIE aumenta desde 3.3 % hasta 38.9 % a los 31 días de edad y se localizan en intestino delgado (Redman et al., 1979). La mayoría de los LIE en humanos y roedores son CD8⁺ y expresan el receptor de células T $\alpha\beta$; últimamente se ha descrito la forma $\gamma\delta$ para el receptor de células T (Viney and Macdonald, 1992). Al nacimiento los LIE son CD2⁺ y casi se duplican a la séptima semana principalmente en la porción distal del intestino delgado (Vega-López, et al., 1995). En los cerdos jóvenes muchos de los LIE tienen el fenotipo CD4⁻CD8⁻, alrededor de la siete semanas se encuentra ya un significativo número de CD8⁺ (Stokes et al., 1992). Los LIE no tienen la capacidad de responder a mitógenos hasta las 9-11 semanas (Wilson et al., 1986).

El número de LIE refleja el grado de estimulación antigénica del lumen intestinal. Ultraestructuralmente estudios en roedores revelan que los linfocitos entran y salen del epitelio a la lámina propia (Viney and Macdonald, 1992). En ratones esta bien establecido que los LIE provienen de médula ósea sin educación tímica, este fenómeno se ha demostrado por la presencia de LIE en ratones atímicos y en ratones irradiados y con la médula ósea reconstituida y en

animales timentomizados, los linfocitos son CD8+ γ/δ (Viney and Macdonald 1992; Lefrancois and Puddington, 1995). Además existe otra población de células timo dependientes, que se originan de un precursor en PP que migran vía linfonodos mesentéricos y regresan al epitelio mucosal, son células CD8+ y expresan receptor para células T $\alpha\beta$ (Viney and Macdonald 1992).

La propiedades funcionales de los LIE incluyen mecanismos no convencionales de reconocimiento de antígenos, mecanismos nuevos de señalización del CD3, regulación por citocinas y hormonas y selección local positiva y negativa (Klein 1995). Entre las citocinas que producen están la IL-7, SCF (factor estimulante de células precursoras o stem cell factor); expresan receptores para c-kit, para SCF, para IL-7. En ratones atímicos se demostró que los LIE $\gamma\delta$ regulan la respuesta mucosal de IgA (Kagnoff 1996).

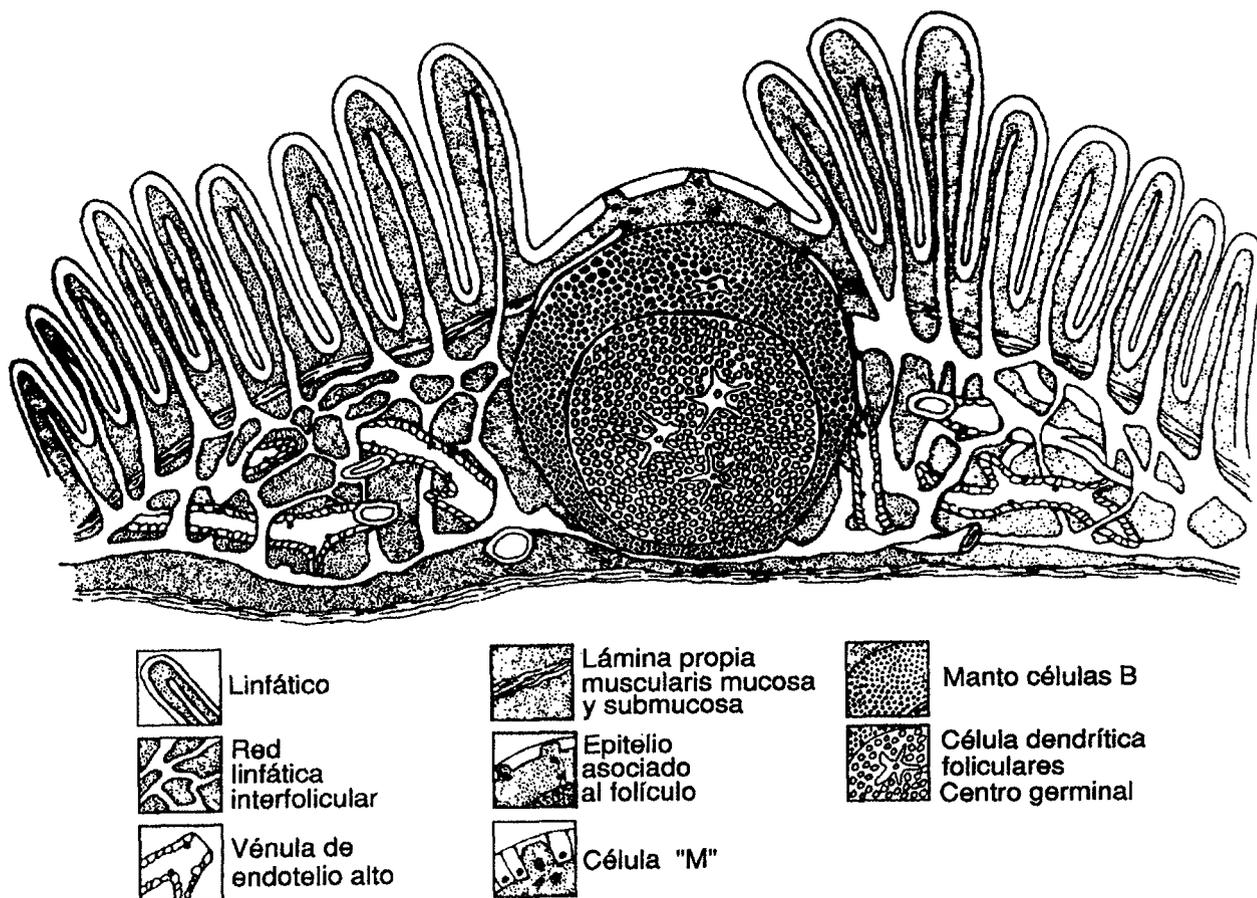


1.3.3 PLACAS DE PEYER

Las placas de Peyer son agregados de folículos linfoides superpuestos en un linfoepitelio especializado (Pabst et al., 1988). En cerdos, rumiantes y perros la masa de PP en el ileon es del 80% y se desarrollan desde la etapa prenatal. (Griebel and Hein, 1996)

En el feto porcino antes de los 80 días de gestación no se observa tejido linfóide asociado a la mucosa intestinal, sin embargo, antes de esta edad el feto es capaz de producir anticuerpos y no es sino hasta los 90 ó 100 días cuando se observan folículos linfoides en intestino, en donde no hay separación cortico-medular solo hasta el nacimiento, sin embargo después del quinto día de nacido es prácticamente idéntica a la de un adulto (Chapman et al., 1974).

Se encuentran aproximadamente a los 80 días de gestación células que contienen inmunoglobulinas en el intestino, después de la aparición de los folículos, abajo de las criptas y a los 5 días de nacidos se observan células IgM+ e IgG+ en la médula de los folículos, la distribución es muy similar a la observada en cerdos adultos (Chapman et al., 1974).



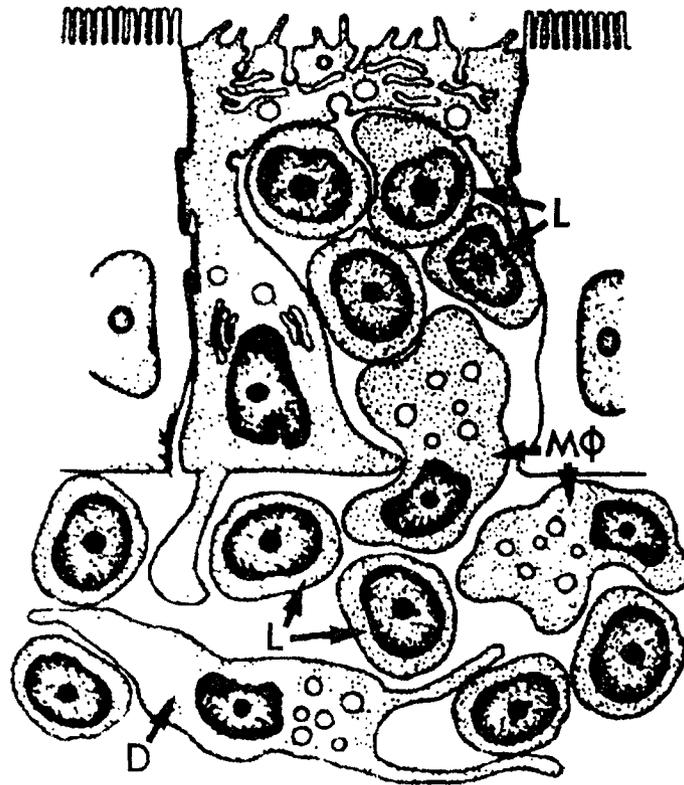
Tomado de Anderson, 1990

Figura 1.4 Esquema de una placa de Peyer de murino. Con las características comunes a las otras especies.

Las placas de Peyer yeyunales e ileales comprenden folículos rodeados de tejido conectivo donde se observa una compleja red de senos linfáticos que tienen múltiples conexiones con los vasos linfáticos que drenan las vellosidades, linfáticos muy finos drenan la base de los folículos (fig. 1.3), transcurren a través de la serosa y se unen para formar el vaso linfático aferente que finalmente converge al linfonodo mesentérico local, de este modo cada folículo es bañado por un flujo de linfa que corre desde la mucosa hacia la serosa (Griebel and Hein , 1996).

Los folículos linfoides de la placa de Peyer están separados de la luz intestinal por una capa simple de células columnares. Este epitelio rodea cada folículo, se genera en las criptas, las células se mueven atravesando la superficie del folículo hacia el centro, desarrollando características que no tiene el epitelio de las vellosidades. Aunque es un poco más cuboidal, la mayoría de las células se asemejan a los enterocitos pues tienen microvellosidades con borde de cepillo y glicocalix; un 20 a un 30% presentan micropliegues en la superficie luminal y se han denominado células M (Pabst et al., 1987).

Ultraestructuralmente las células M tienen escasas y muy largas vellosidades, que varían en forma, tamaño y número, presentan numerosas interdigitaciones laterales y uniones desmosomales con las células adyacentes y un moderado número de organelos citoplasmáticos (Redman et al., 1979b). La superficie basolateral de la célula M tiene una profunda invaginación formando una "bolsa" dentro de la cual ocurre transcitocitosis de macromoléculas y partículas antigénicas tomadas de la luz intestinal (Pabst, 1987; Kagnoff, 1996); dentro de esta "bolsa" migran linfocitos T y B y en ocasiones macrófagos (fig 1.4). La célula M posee interdigitaciones en su parte basal que tienen contacto directo con células linfoides y APC (Neutra et al., 1996).



Tomado de Neutra et al., 1996

FIGURA 1.5

Esquema de la célula M. Se muestra la "bolsa", que contiene (L) linfocitos, (MΦ) macrófagos y bajo esta (DC) célula dendríticas (MΦ) macrófagos y linfocitos.

Las células con importancia inmunológica en el intestino no se restringen a las que están localizadas en la PP, células que expresan moléculas clase II, están en el epitelio de varias especies incluyendo al humano y a roedores, estas moléculas están restringidas a las dos terceras partes superiores de la vellosidad, pero pueden ser inducidas en las criptas por una variedad de procesos inflamatorios. Estudios efectuados en cerdos han revelado que no existen estas moléculas en el epitelio del intestino delgado (Stokes, 1994).

Las células epiteliales se reconocen ahora como centrales en la regulación de la inmunidad natural y adquirida, estudios en humano revelan que células epiteliales de colon regulan la producción de un vasto número de citocinas, así como prostanoïdes en respuesta a invasiones bacterianas; el epitelio intestinal provee de las señales tempranas para la iniciación y regulación de la inflamación mucosal. Estas células pueden ser vistas como sensores tempranos de invasión, otra estrategia de protección es la producción de material proteico por los exocriñocitos que protege a las células epiteliales del daño externo por agregación de mucinas. También se ha postulado que las células epiteliales instruyen a los linfocitos a desarrollar el fenotipo mucosal (Kagnoff, 1996).

Los folículos localizados bajo el epitelio del domo, tienen un manto de células B pequeñas que rodean a los centros germinales. El centro germinal contiene una gran cantidad de linfoblastos B intermedios, células dendríticas, macrófago

s y muy escasas células T; precursores de células B entran a la PP vía HEV y migran a la zona del manto, donde tienen contacto con células dendríticas y linfocitos T cooperadores. Las células B "inmaduras" salen de la PP por los vasos linfáticos mesentéricos a los linfonodos regionales donde tienen contacto con otras células inmunoregulatoras. En otras especies la mayoría de las células B pasan del linfonodo mesentérico vía linfa eferente a la sangre, temporalmente se almacenan en el bazo, después de proliferar y madurar regresan a la lámina propia de otros sitios, una vez que la célula alcanza la mucosa se divide una vez más y madura a célula plasmática que elabora IgA secretoria (Anderson, 1990).

Las áreas interfoliculares presentan un infiltrado difuso de linfocitos pequeños y medianos, usualmente de origen T, pero algunos son células B, en estos sitios están las HEV fig. 1.3 (Anderson, 1990).

Bajo el epitelio del domo existen células T cooperadoras, linfoblastos, APC (macrófagos, dendríticas), estas poblaciones presumiblemente tienen actividad en la fagocitosis y muerte de los patógenos que ingresan, así como en el procesamiento, presentación y quizás almacenamiento del antígeno (Neutra, 1996)

Las placas de Peyer presentan características muy peculiares en esta especie, los cerdos jóvenes tienen PP yeyunales con una estructura contienen una gran cantidad de linfoblastos B intermedios, células dendríticas, macrófagos y muy escasas células T; precursores de células B entran a la PP vía HEV y migran a la zona del manto, donde tienen contacto con células dendríticas y linfocitos T cooperadores. Las células B "inmaduras" salen de la PP por los vasos linfáticos mesentéricos a los linfonodos regionales donde tienen contacto con otras células inmunoregulatoras. En otras especies la mayoría de las células B pasan del linfonodo mesentérico vía linfa eferente a la sangre, temporalmente se almacenan en el bazo, después de proliferar y madurar regresan a la lámina propia de otros sitios, una vez que la célula alcanza la mucosa se divide una vez más y maduran a célula plasmática que elabora IgA secretoria (Anderson, 1990).

Las áreas interfoliculares presentan un infiltrado difuso de linfocitos pequeños y medianos, usualmente de origen T, pero algunos son células B, en estos sitios están las HEV fig. 1.3 (Anderson, 1990).

Bajo el epitelio del domo existen células T cooperadoras, linfoblastos, APC (macrófagos, dendríticas), estas poblaciones presumiblemente tienen actividad en la fagocitosis y muerte de los patógenos que ingresan, así como en el procesamiento, presentación y quizás almacenamiento del antígeno (Neutra, 1996).

Las placas de Peyer presentan características muy peculiares en esta especie, los cerdos jóvenes tienen PP yeyunales con una estructura convencional, PP en íleon continuas, de 1-3.5 m dependiendo de la edad. En el cerdo joven difieren en la escasez de células T, áreas interfoliculares y tráfico de linfocitos (Binns and Licence 1985; Rothkötter et al., 1991). Bajo la unión ileocecal hay una tercera PP (Binns, 1992). El nivel de circulación a través de las PP continuas es muy bajo en un 80% de su longitud pero al final se incrementa progresivamente (Binns and Licence, 1985). Las PP yeyunales individuales tienen niveles de migración medios o altos y difiere de los niveles de la PP vecina, estas observaciones indican una fuerte influencia local (Binns and Licence 1985); las PP yeyunales y la ileales, persisten a lo largo de toda la vida y son alrededor de 25 a 30 y las ileales son una sola, que se extiende a lo largo del íleon e involuciona al año de edad. (Pabst et al., 1988).

En las PP yeyunales hay casi igual número de linfocitos B y de CD2⁺ en el íleon hay 10 veces más linfocitos B (IgM⁺) que linfocitos T (Rothkötter and Pabst, 1989; Pabst et al., 1988; Griebel and Hein, 1996).

En las placas ileales un 35% de las células son CD2⁻ y no tienen ningún marcador para B, son células nulas. En cerdos gnotobióticos un 20% de los linfocitos de las PP en íleon son CD2⁺CD4⁻CD8⁻ (Rothkötter and Pabst, 1989). La distribución histológica de los linfocitos T y B en las PP esta caracterizada por la presencia de linfocitos T CD4⁺ y TCD8⁺ en las áreas interfoliculares y de domo y la distribución de las células B en la corona ó manto de los folículos y áreas de domo, (Zuckermann and Gaskins, 1996). El porcentaje de CD4⁺ y/o CD8⁺ es más alto en las PP yeyunales que en las ileales, alrededor del 50% para las yeyunales y un 20% en la parte media de las ileales. La proporción de células B en las PP ileales es mayor que en las yeyunales pero decrece drásticamente alrededor de los 12 meses de edad y aumentan las células CD4⁺ y/o CD8⁺ en ambos tipos de PP (Zuckermann and Gaskins, 1996). En la región de domo conviven macrófagos y linfocitos B CD40, lo que indica la posibilidad de que en este sitio ocurra selección dependiente de antígeno y de células T; algunas observaciones muestran que una combinación de citocinas con CD40L apoya la expansión de las células B (Griebel and Hein; 1996)

Ya ha sido establecida una diferencia funcional entre las PP en yeyuno y en íleon en el cerdo, se observó que había menos migración en las PP de íleon que en las de yeyuno, las primeras muestran áreas interfoliculares menores y por lo tanto mayor número de células B, estos resultados sugieren que las PP ileales pueden tener un función de órgano linfoide primario (Binns and Licence 1985) como ya se ha descrito en los borregos (Reynolds 1987). También se ha observado que en las PP de íleon aumentan los folículos no solo en número, sino en tamaño (Pabst et. al. 1988), sin embargo en ambas PP aumentan los niveles de producción de linfocitos con la edad (Griebel and Hein; 1996).

En ratones inmunizados oralmente se determinaron las citocinas producidas en PP: demostrándose bajas cantidades de IL-4, IL-5 e IL-6 pero altos niveles de IL-2 e interferon γ y las secretadas en LP: altos niveles de IL-4, IL-5, IL-6 y bajos niveles de IL-2 e interferon γ , en comparación con las células de bazo

que producen todas las interleucinas excepto IL-5, por lo que no es sorprendente que la producción de anticuerpos por la LP y la PP sea principalmente el isotipo IgA, mientras que en el bazo es el isotipo IgG, estas observaciones indican que la lámina propia es un reservorio de células memoria y la placa de Peyer es el sitio central en la inducción de respuesta en células vírgenes (Stokes, 1996).

Se puede concluir que las PP son las generadoras de precursores específicos de IgA secretoria, que migran a otras regiones de la lámina propia del intestino; a las PP se les ha adjudicado el papel de inducción y diseminación de la respuesta inmune mucosal (Griebel and Hein, 1996)

Es necesario implementar estrategias para amplificar la inmunocompetencia en el cerdo joven y enfocarse al desarrollo de la inmunidad mucosal que ayudaría a combatir a los patógenos entéricos que constituyen el mayor reto económico en la industria porcina.

1.4 PROBIOTICOS

La cría del cerdo ha llegado a ser una de las industrias pecuarias semi-intensivas ó intensivas más desarrolladas, el riesgo de mayores pérdidas económicas debidas a una disminución en el desempeño productivo, es de suma importancia y se han hecho esfuerzos para encontrar diferentes caminos que ayuden a una mejor producción. Como paliativo a estos problemas se han utilizado productos como, los antibióticos y quimioterapéuticos con gran éxito; el uso de dosis bajas de antibióticos, parece ser que ha facilitado la producción animal a gran escala, permitiendo buenos niveles de crecimiento, muchas veces en condiciones subóptimas (Jonsson and Conway, 1992).

A la presencia de bacterias anaeróbicas intestinales se le ha adjudicado un efecto protector (Hentges, 1992). Los sistemas modernos de crianza causan efectos notables sobre el equilibrio de la flora normal que resulta en un incremento en la incidencia de algunas infecciones por ejemplo: la excesiva higiene y desinfección o los antibióticos como promotores del crecimiento pueden causar desbalance en la flora normal permitiendo la colonización por bacterias indeseables; durante el estrés el número de bacterias, principalmente lactobacilos tiende a disminuir y los coliformes se incrementan en las regiones anteriores del intestino delgado, en estas situaciones la restauración de la flora por el uso de probióticos es de gran valor (Fuller, 1989).

En los consumidores y en algunas autoridades se ha incrementado el interés en lo que concierne a los riesgos a la salud que involucran el consumo de carne que contiene residuos de aditivos alimenticios, como un riesgo potencial de diseminar los factores de resistencia por el indiscriminado uso de antibióticos (Jonsson and Conway, 1992). En Suiza esta prohibida la administración de antibiótico en dosis bajas, desde 1986

La amplia destrucción de la flora intestinal provocada por el uso de antibióticos deja al hospedador susceptible al ataque por infecciones de oportunistas. En la actualidad el uso indiscriminado de antibióticos de amplio

espectro en animales y humanos, esta impulsando el concepto de probiosis, que se refiere al hecho de que la flora microbiana normal actúa previniendo el sobrecrecimiento de otras cepas ajenas al hospedador (Stewart and Chesson, 1993).

El concepto fue inicialmente propuesto por Metchnikoff en 1907, quien atribuyó la longevidad de los pueblos Búlgaros a los efectos benéficos de los microorganismos ingeridos en la leche fermentada con una especie de bacteria que identificó como *Bacillus bulgaricus* y después fue reclasificada como *Lactobacillus acidophilus* (Maxwell and Stewart, 1995; Montes and Pugh, 1993).

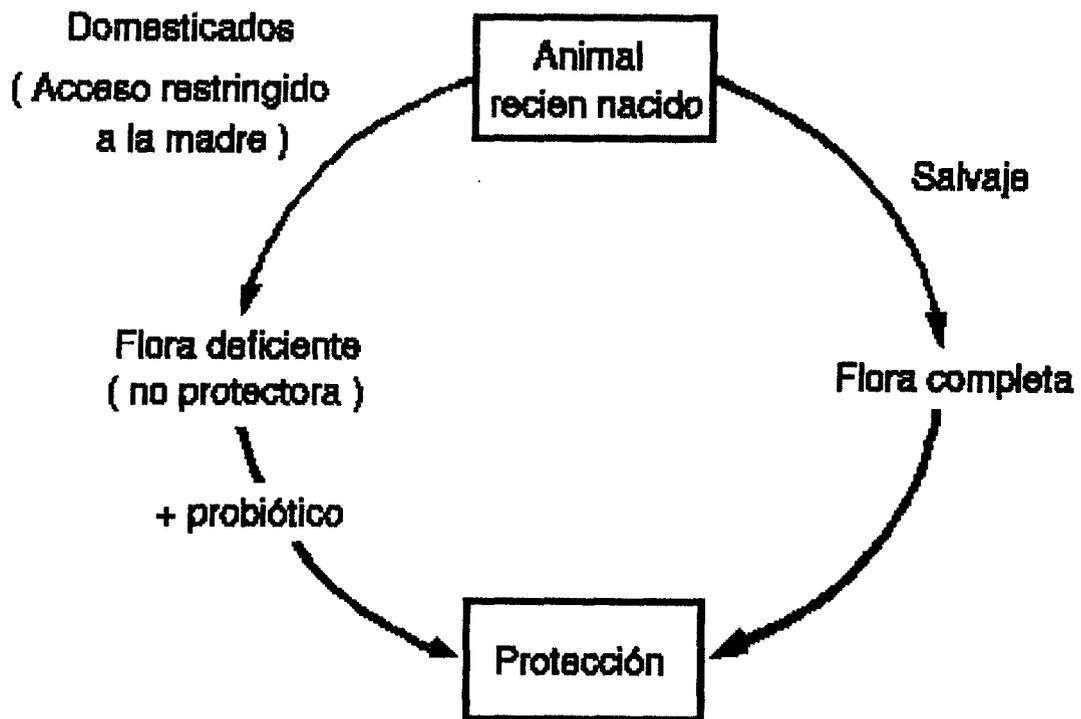
Los probióticos están considerados como productos diseñados para reforzar y ayudar a restablecer la probiosis (Stewart and Chesson, 1993). La definición más comúnmente utilizada para los probióticos es que son microorganismos vivos y sus metabolitos, que se administran como suplementos alimenticios, con efectos benéficos en el hospedador dados por el mejoramiento del balance microbiano (Fuller, 1989). Más aún, la probiosis es una propiedad de la población total microbiana en un intestino sano, que trabaja en conjunción con el sistema inmune local (Stewart and Chesson, 1993). Otra definición incluye productos que contienen organismos y sustancias, de este modo, otros compuestos como: enzimas y la hormona del crecimiento, podrían ser considerados como probióticos (Jonsson and Conway, 1992).

La mucosa gastrointestinal es una superficie que tiene contacto constante con un vasto número de antígenos alimentarios, aproximadamente 70 toneladas en una vida promedio de humano, y la flora residente se compone de por lo menos 400 especies diferentes de bacterias. En el tracto intestinal superior del humano la cuenta bacteriana es mayor de 10^5 unidades formadoras de colonia por ml^{-1} , pero se incrementa al llegar al íleon y colon hasta 10^{11} ml^{-1} , sin embargo la mucosa intestinal es el mayor sitio inmunológico, la lámina propia y el epitelio constituyen el mayor reservorio de células T y la transferencia de IgA secretoria hacia el lumen intestinal es mayor a la producción de IgG (Stokes, 1996).

1.4.1 FLORA MICROBIANA INTESTINAL EN EL CERDO

El establecimiento de esta flora protectora como ya se ha dicho, proviene principalmente de la madre por vía directa e indirecta, este proceso es muy eficiente en los animales silvestres, sin embargo en la crianza de animales domésticos en muchas ocasiones al neonato se le restringe el contacto con la madre evitando la adquisición completa de la microbiota, el mejor ejemplo son las gallinas, donde el huevo es retirado de la madre e incubado en un medio relativamente aséptico, no hay contacto del pollito con la gallina y este adquiere su flora de la incubadora (fig. 1.5). En cuanto a los mamíferos, la separación es menos completa pero la tendencia persiste, especialmente en el bebé humano, para minimizar la transferencia de bacterias de la madre al bebé se practica la

excesiva higiene y el sobre uso de desinfectantes, mientras la excesiva higiene evita la adquisición de flora, la administración de antibióticos por vía oral suprimen su actividad aún después de ser adquiridos (Fuller, 1989).



TOMADO DE FULLER, 1989

FIGURA 1.6 Relación de las especies domesticas y silvestres con la adquisición de flora intestinal

El cerdo es un animal monogástrico colonizado por una flora relativamente rica, en el intestino delgado existen entre 10^7 y 10^9 bacterias por ml, la microflora es dominada por bacterias ácido lácticas (LAB), las más frecuentes son *Lactobacillus* y *Streptococcus sp*, que se encuentran en la ingesta y unidos al epitelio. (Jonsson and Conway, 1992).

Las LAB ayudan al cerdo joven a bajar el pH del estómago, por la formación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos a partir de la lactosa de la leche de la cerda. El pH bajo en el antro pilórico es importante porque disminuye el ingreso de bacterias al intestino delgado, también se ha observado que ayudan en la digestión de la fibra (Jonsson and Conway, 1992).

El establecimiento de la flora bacteriana en el intestino porcino, ocurre desde el primer día de vida, se favorece cuando el recién nacido pasa por el canal de parto y es expuesto a las heces maternas, el tracto vaginal generalmente contiene: bifidobacterias, lactobacilos, estafilococos y corinebacterias. Mediante el uso de plásmidos se demostró que la flora vaginal y fecal pasan al producto

(Tannock, 1990); en las primeras horas las bacterias con ventajas competitivas colonizarán, el tracto gastrointestinal mientras el pH del estómago es alto; conforme el pH gástrico baja, los lactobacilos predominan en el intestino delgado. El pH controla el número de bacterias en el intestino y provee de las condiciones necesarias para el crecimiento de bacterias tolerantes a medios ácidos como los lactobacilos (Stewart, 1993).

En el intestino delgado de lechones 12 horas después del nacimiento, se encuentran especies como *E. coli*, *Clostridium perfringens*, lactobacilos y estreptococos, en grandes cantidades (más de 10^6 bacterias/ml); en contraste con el intestino grueso que no se coloniza en ese momento (Stewart, 1994). En el período de los 3 a los 150 días de edad, la *E. coli* esta en mayor proporción en el intestino delgado posterior que en la partes anteriores, los lactobacilos son sin embargo las especies predominantes (Stewart, 1993). El desarrollo de una flora normal en el lechón ocurre solo si nace en un ambiente convencional, si posteriormente se cambia a un medio sin microorganismos, la flora seguirá desarrollándose normalmente, tampoco tiene un efecto importante la leche de la cerda, la microflora no cambia en su composición, aún en lechones alimentados con leche de vaca, tampoco se observa ninguna alteración al destete. Sin embargo durante ayunos prolongados se ha demostrado una marcada disminución en lactobacilos y bifidobacterias (Jonsson and Conway 1992).

Existen variaciones en la cantidad y tipo de bacterias a lo largo del tracto intestinal del cerdo, se ha establecido que existen macroambientes, como el tracto alimentario y los microhábitats, las superficies epiteliales, las células productoras de mucina, la capa de mucina y el contenido digerido (Roze, et al. 1982; Maxwell and Stewart, 1995). Los lactobacilos son la especie dominante en la mucosa duodenal, aunque otros autores también mencionan a bacteroides y clostridios (Jonsson and Conway 1992).

La importancia metabólica del tracto intestinal no se puede soslayar, en condiciones de salud, una considerable proporción de los nutrientes ingeridos se usan para apoyar las actividades metabólicas del intestino. Se ha estimado que en un cerdo de 25kg, el intestino representa un 25% de la proteína corporal total, mientras que los requerimientos para el recambio de mantenimiento son de 30-40% de la proteína ingerida, este valor solo es sobrepasado por el músculo esquelético, el cual en términos de masa representa dos terceras partes de la proteína del animal; así mismo la demanda de energía del intestino también es muy alta, este intenso nivel metabólico es consecuencia natural del proceso digestivo (Stewart and Chesson, 1993).

Muchas de las cepas bacterianas en el intestino son patógenos oportunistas y otras cepas comensales mantienen una constante presión, cuando la carga microbiana aumenta y la probiosis empieza a fallar, el número de patógenos potenciales se eleva o cuando la capacidad del intestino para responder a un desafío normal esta comprometida, bajo estas circunstancias ocurren efectos muy marcados en el metabolismo intestinal: un incremento en el recambio de proteína como resultado de un aumento en la proliferación de las células de las criptas y un incremento en la masa intestinal. Se requiere más

proteína para sostener una respuesta inmunológica, también se incrementan las pérdidas de nitrógeno por secreción de mucina y células descamadas (Maxwell and Stewart, 1995).

Las reacciones de defensa conllevan un alto precio metabólico, y la inevitable consecuencia de que habrá menor disponibilidad de nutrientes para otros tejidos y el desempeño productivo del animal se ve deteriorado. Desafortunadamente en este delicado equilibrio es difícil definir la carga microbiana en términos de número y organismos específicos o su localización, aunque intuitivamente se reconoce que los microorganismos asociados a la mucosa son más importantes que los que están en el lumen, algunos de estos microorganismos despiertan una respuesta inmune muy limitada y el hospedador los tolera mientras que otros inducen respuestas muy agresivas que lo dañan (Stewart and Chesson, 1993).

Por todo lo anterior es de suma importancia mantener el equilibrio en la microbiota intestinal y evitar las infecciones del tracto digestivo porque las consecuencias que resultan pueden ser muy graves para el metabolismo general del animal.

En la producción de carne de cerdo, uno de los principales objetivos es prevenir la mortalidad, que puede llegar a ser de un 41% en el período de lactancia en aquellos lechones particularmente susceptibles a la diarrea en la primera semana de vida y al destete. Las causas son un grupo amplio de microorganismos que incluyen *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Cryptosporidia*, *Clostridios*, *Coccidias*, *Rotavirus* y *Virus de la gastroenteritis*. La *E. coli* es una de las causas más comunes de diarrea, se ha estimado que existen de 50000 a 100000 serotipos (Stewart and Chesson, 1993; Jonsson and Conway 1992).

1.4.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO EN EL INTESTINO DEL CERDO

La composición de la microbiota nativa está determinada por un número de factores impuestos por el hospedador e incluyen: pH, peristaltismo y flujo de la ingesta, concentración de oxígeno, potencial de óxido-reducción, enzimas, bilis, urea, recambio epitelial, dieta y factores del sistema inmune (Fuller, 1982); las interacciones entre bacterias, tales como el antagonismo, el sinergismo y la transferencia de información genética (Maxwell and Stewart, 1995).

El intestino posterior se considera que es anaerobio y la energía para el mantenimiento de los microorganismos proviene de la fermentación del alimento no digerido ó de secreciones intestinales. Los polisacáridos de paredes celulares de plantas, azúcares no absorbibles y oligosacáridos son una importante fuente exógena de nutrientes, mientras la mucina es una fuente endógena (Cummings and Macfarlane 1991). La competencia metabólica por estos substratos determina el mejor mecanismo de control en el tamaño de las poblaciones bacterianas en el intestino grueso (Freter, 1992).

Lo valores más altos del potencial de óxido-reducción se encuentran en el estómago y en el intestino delgado y disminuyen en el intestino grueso anterior, para volver a elevarse cerca del recto. En el intestino del lechón hay considerables cantidades de oxígeno disuelto, es probable que en estas condiciones algunos azúcares se oxiden a CO₂ y agua, por bacterias capaces de utilizar el oxígeno como último aceptor de electrones, tales reacciones explican la baja recuperación de productos reducidos (Millard and Chesson, 1984; Zhu et al., 1993).

Los microorganismos en preparaciones probióticas deben sobrevivir y ser activas en el tracto gastrointestinal, deben ser capaces de resistir los mecanismos protectores del hospedador y el bajo pH en el tracto digestivo anterior. El mecanismo más importante de defensa del individuo en el aparato digestivo es el rápido flujo de la ingesta que previene el sobrecrecimiento microbiano a menos de que estos puedan unirse al epitelio (Jonsson and Conway, 1992).

La entrada al estómago es por la *pars esofagea* un área queratinizada no secretora, varía de 1-2 cm² en neonatos a 10-15 cm² en adultos, estas células planas constantemente sufren descamación, así que se liberan cubiertas de lactobacilos y exponen a nuevas células epiteliales a la colonización (Barrow, 1980).

En el estómago la composición del jugo gástrico varía con el tipo de dieta; materia seca, alimento líquidos y el tamaño de las partículas. El pH también varía con el sitio, los valores más bajos se encuentran en el antro pilórico cerca de la salida hacia el intestino delgado, el contenido cerca de la *pars esofagea* es el que tiene el pH más alto. En los neonatos el pH del antro pilórico es de 5.2-5.9, pero a los 4-10 días de edad alcanza 4.1-4.4 y sigue cayendo proporcionalmente con la edad hasta llegar aproximadamente a 2 (Barrow, 1980).

La ingesta sale del estómago y en el duodeno se mezcla con las sales biliares y jugo pancreático, que contienen enzimas y sustancias amortiguadoras, el pH se incrementa a lo largo del paso por el intestino, aunque las diferencias no son tan pronunciadas como en el estómago, ni tampoco hay variaciones significativas con el cerdo adulto. En el duodeno anterior el pH es de 2-6 y en el íleon es de 7-7.5. La escasez de secreciones biliares afecta la cuenta bacteriana, principalmente bifidobacterias y aumenta las enterobacterias en la flora fecal (Kobayashi et al., 1988)

El pasaje a través del intestino es muy rápido en la parte anterior pero se hace más lento a medida que avanza hacia el ano; normalmente la ingesta tarda 2.5 horas en pasar por el intestino delgado, a este nivel el flujo es muy rápido y es muy difícil para las bacterias evitar ser lavadas, por lo tanto la adhesión a las células epiteliales es virtualmente un requisito para colonizar (Conway et al., 1990). Los microorganismos deben tener un movimiento contrario al peristaltismo en el intestino ya sea por multiplicación para mantener la población en el lumen ó por asociación con la pared intestinal o el moco. Las bacterias tienen mecanismos muy diversos para mantener su posición en el intestino en contra del flujo, como por ejemplo desarrollo de filamentos y motilidad; las bacterias

patógenas han desarrollado mecanismos altamente específicos de adhesión (Roze et al., 1982; Conway et al., 1990)

Esta bien reconocido que los microorganismos tienen un marcado efecto en la estructura y función del intestino, aunque aún se desconoce el mecanismo. El tracto digestivo de animales recién nacidos y gnotobióticos es muy delgado, la lámina propia poco desarrollada, los ciclos de renovación celular son más cortos, la actividad de enzimas digestivas es más alta y tiene una reducida demanda metabólica si se compara con animales adultos ó sus contrapartes convencionales (Stewart and Chesson, 1993).

Los probióticos disponibles para su uso en cerdos abarca un amplio grupo de bacterias. En general se prefieren mezclas de cepas en lugar de cultivos puros, aunque no existe consenso en cuanto a el mecanismo por el cual ejercen sus efectos benéficos (Stewart and Chesson, 1993).

ESPECIES MICOBIANAS UTILIZADAS COMO PROBIOTICOS

Lactobacillus acidophilus
L. casei
L. reuteri
L. plantarum
L. lactis
L. fermentum
L. brevis
L. delbrueckii
Enterococcus faecalis
E. faecium
Streptococcus salivarius
Bifidobacterium bifidum
B. pseudolongum
B. thermophilus
B. subtilis
B. toyoi
Clostridium butyricum

TOMADA DE JONSSON and CONWAY 1992

1.5 MECANISMOS DE ACCION DE LOS PROBIOTICOS

1.5.1 ANTAGONISMOS EN CONTRA DE PATOGENOS

Durante el crecimiento de LAB se producen ácidos orgánicos como ácido láctico, fórmico y acético que reducen el pH intestinal, la producción de peróxido de hidrógeno y el bajo potencial de óxido-reducción generan un medio poco favorable para el crecimiento de organismos aerobios; la *E. coli* es especialmente susceptible a los ácidos orgánicos (Havenaar et al.,1992, Montes and Pugh 1993). Algunas bacterias producen sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos, tales compuestos incluyen bacteriocinas u otros compuestos antibacterianos de alto peso molecular. Las verdaderas bacteriocinas actúan en contra de cepas muy cercanas a la cepa productora; sin embargo los cultivos de lactobacilos pueden producir diferentes tipos de bacteriocinas como: acidolina, bulgaricina, acidofilina y reuterina que inhiben el crecimiento de un amplio grupo de patógenos, por ejemplo la reuterina actúa en contra de bacterias, hongos, levaduras y protozoarios (Havenaar et al.,1992); la acidolina tiene excelente actividad antimicrobiana en contra de algunas cepas de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y otros organismos formadores de esporas (Montes and Pugh, 1993).

La actividad inhibitoria in vitro de la acidofilina ha sido reportada en contra de *Shigella spp*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomona spp* y *Bacillus spp*. Los lactobacilos también producen sustancias anti-*E. coli*, que detoxifican sus toxinas, pueden prevenir la síntesis de aminas tóxicas, producir enzimas digestivas y sintetizar vitamina B (Montes and Pugh, 1993).

1.5.2 COMPETENCIA DE NUTRIENTES

El número relativo de las principales cepas bacterianas en el intestino se debe a su capacidad para competir por los nutrientes; se ha asumido que los probióticos compiten por los nutrientes con los patógenos, los substratos por los que compiten son azúcares como lactosa, u oligosacáridos, palatinosa, xiloligosacáridos, inulooligosacáridos y otros compuestos como el hierro libre unido a proteína y manganeso (Pollman et al., 1980; Vandevoorde, 1990; Maxwell and Stewart 1995)

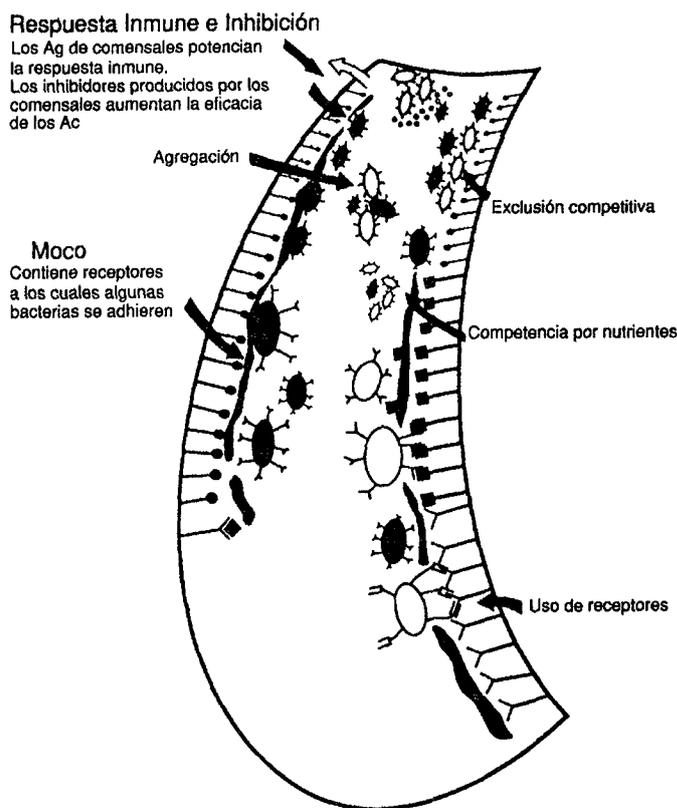
1.5.3 COMPETENCIA POR LOS SITIOS DE UNION

Una de las propiedades más importantes de los probióticos es la exclusión competitiva de las bacterias patógenas por los sitios de unión (Fuller, 1992;

Jonsson and Conway, 1992; Stewart and Chesson, 1993). Para que los microorganismos puedan sobrevivir y ejercer sus efectos patógenos, es necesario que penetren se adhieran y multipliquen en las células epiteliales del intestino delgado (Montes and Pugh, 1993). Para que ocurra la exclusión competitiva de estos patógenos se piensa que es imprescindible la capacidad de adherencia de las bacterias probióticas, sin embargo las pruebas *in vitro* no predicen el comportamiento de las cepas para adherirse *in vivo*; la asociación con el epitelio es un factor importante para la colonización del tracto digestivo (Pollman et al., 1980).

Los lactobacilos retardan o evitan la adhesión de bacterias patógenas ocupando los sitios epiteliales de unión o por la producción de una película que físicamente protege las células epiteliales en contra de bacterias enteropatógenas y virus (por ejemplo coronavirus y rotavirus) (Montes and Pugh, 1993).

Se ha demostrado en líneas de cultivo de enterocitos humanos que la *E. coli*, se adhiere específicamente, por que poseen factores de colonización (Darfeuille-Michaud et al., 1990). En los lactobacilos se encontró un factor de adhesión de naturaleza proteíca (Coconier et al., 1992), también se puede adherir al moco secretado por los exocinocitos (Chauviere et al., 1992).



TOMADO DE MAXWELL AND STEWART 1995
 FIGURA 1.7 Esquema de los posibles mecanismos de acción de los probióticos

1.5.4 EFECTO INMUNOESTIMULANTE

Recientemente se le han atribuido a los probióticos efectos inmunoestimulantes como una parte de su mecanismo de acción. La administración de probióticos por diversas vías afecta diferentes aspectos del sistema inmune: la respuesta innata, humoral, celular y mucosal.

En contra de infecciones inespecíficas el tipo celular involucrado es principalmente el macrófago y los polimorfonucleares, encargados de la fagocitosis, se ha observado que en cerdos después del nacimiento los granulocitos circulantes se incrementan gradualmente hasta las 8 semanas de vida postnatal, en los cerdos libres de gérmenes se ha observado que no alcanzan los niveles de los cerdos criados convencionalmente, además la actividad fagocítica esta seriamente dañada, estos polimorfonucleares se incrementan substancialmente con la monoasociación intestinal con bacterias ó suspensiones de bacterias muertas administradas por vía intraperitoneal . La asociación de *Enterococcus faecalis* al intestino de cerdos libres de gérmenes favoreció el aumento de los granulocitos en sangre hasta aumentar un 400% (Tlaskanova-Hogenova, 1994). Después de la aplicación intragástrica de bacterias muertas, se detectaron células productoras de anticuerpos no solo en el tejido linfoide intestinal, en linfonodos mesentéricos y bazo, sino en suspensiones celulares de lavados bronquiales (Tlaskanova-Hogenova, 1994); esto indica que el sistema mucosal del cerdo permite una estimulación local y la migración a sitios distantes. Al inicio la respuesta es mayormente de IgM después ocurre el cambio de isotipo principalmente a IgA (Tlaskanova-Hogenova, 1994).

La inoculación de *L. casei*, por vía peritoneal, activa los macrófagos peritoneales, incrementa la actividad fagocítica y la actividad enzimática (Kato, 1983). Observó el incremento en la eliminación de carbón coloidal por el sistema mononuclear fagocítico (Kato, 1983). Otros autores obtuvieron resultados similares administrando por vía oral lactobacilos (Ianello, 1984). Aunque se ignoran los mecanismos por los cuales las LAB estimulan a los macrófagos, se puede concluir que: *L. casei*, *L. delbrueckii*, *subsp bulgaricus*, y ciertas dosis de *L. salivarius susp thermophilus* son capaces de activar a las células involucradas en la respuesta no específica. Las bacterias capaces de sobrevivir y proliferar en el intestino como *L. casei* y *L. acidophilus* son más eficientes en la activación. La administración oral de la LAB es tan efectiva como la administración por vía intraperitoneal (Perdigon and Alvarez , 1992).

Las LAB usadas por otros autores cuando fueron administradas oralmente no inducen anticuerpos séricos contra sus propios epitopes, este hallazgo es muy importante pues indica que el consumo de alimentos que incluyen LAB pueden tener efectos benéficos por activación del sistema inmune sin la producción de anticuerpos antibacterias ácido lácticas; este efecto podría ser causado no solamente por la escasa inmunogenicidad de estos microorganismos sino por la presencia de muramildipéptido (MDP) en la pared celular, este es un factor común de las bacterias gram positivas que inducen la activación de células linfoides sin inmunogenicidad (Lowy et al., 1980). Otros estudios indican que el MDP actúa directamente en la estimulación de macrófagos y linfocitos (Jonsson and

Conway, 1992) y suprime selectivamente la respuesta de IgE (Kishimoto et al., 1979).

La administración de *L. casei* por vía subcutánea induce un incremento en la producción de anticuerpos circulantes en contra de glóbulos rojos de carnero, y en la producción de IgM reflejada por el aumento en el número de células formadoras de placa (Saito et al., 1983).

La administración intraperitoneal de *L. plantarum* viables, estimula la hipersensibilidad retardada, mientras bacterias no viables actúan como adyuvantes en la producción de anticuerpos (Jonsson and Conway, 1992), lo que indica la activación de la respuesta celular (Perdigon and Alvarez 1992).

La inoculación de *L. casei* por vía intravenosa o intraperitoneal, induce la activación de células NK (Kato et al., 1984). El *L. acidophilus* y *S. lactis* combinados tuvieron un fuerte efecto en la producción de interferón e índice de citotoxicidad de células NK (Perdigon and Alvarez, 1992)

La administración de suplementos alimenticios a humanos produjo un aumento en la producción de interferón gamma sérico, más aún en cultivo de linfocitos de sangre periférica suplementados con el lactobacilo y estimulada con un mitógeno (concavalanina A) mostraron también incremento en la producción de interferón γ , comparado con los medios de cultivo testigo (De Simone et al., 1986)

Para determinar el efecto de los lactobacilos en la producción de IgA secretoria se midió la concentración de Inmunoglobulinas en el fluido intestinal por radioinmunoensayo, después de la administración oral de lactobacilos por 7 días consecutivos; se encontró mayor cantidad de inmunoglobulinas totales (Perdigon et al., 1990).

Los lactobacilos también han demostrado tener otros efectos sobre la respuesta mucosal aumenta la proliferación de esplenocitos y linfocitos de PP inducida por un mitógeno, se incrementa la capacidad antibacteriana en una infección con *Salmonella typhimurium* (Jonsson and Conway , 1992).

En resumen la suplementación de cepas probióticas tiene efectos inmunoestimulantes porque activa y aumenta la capacidad fagocítica de los macrófagos, activa la inmunidad humoral, aumentando la producción de anticuerpos, activa inmunidad celular medida por hipersensibilidad retardada, citotoxicidad y producción de interferón γ , favorece la proliferación de linfocitos de PP y bazo.

Aunque se requieren más estudios para la elucidación de los mecanismos a través de los cuales los lactobacilos producen un incremento en la respuesta inmune, es indudable el hecho de estas bacterias ejercen un efecto adyuvante sobre la inmunidad general (Perdigon and Alvarez 1992).

1.5.5 OTRAS ACTIVIDADES

La intolerancia a la lactosa es una deficiencia congénita en la enzima β -galactosidasa, lo que resulta en la incapacidad de digerir la lactosa, es sabido que la gente con intolerancia a la lactosa puede digerir mejor la lactosa del yoghurt que la misma cantidad de lactosa en la leche; ratas alimentadas con yoghurt tuvieron niveles mayores de la β -galactosidasa en el intestino delgado, esta enzima resultó ser de origen bacteriano (Fuller, 1989). Hay reportes desde 1962 de que el *L. bulgaricus* produce sustancias que actúan en contra de los tumores, todo parece indicar que los lactobacilos inhiben las células cancerígenas, destruyen de compuestos cancerígenos como nitrosaminas y suprimen la nitroreductasa involucrada en la síntesis de nitrosaminas (Fuller, 1989). Leche cultivada con *L. acidophilus* mostró un efecto antimutagénico en contra de N-metil-N'-nitro-N-nitroguanosa (Hosoda et al., 1992).

Los niveles de colesterol en sangre se vieron disminuidos en humanos que recibieron yoghurt o leche fermentada. Algunos lactobacilos tienen efectos sobre los niveles de colesterol por remoción y asimilación de colesterol del medio de cultivo y en cerdos también se ha observado el mismo efecto (Fuller, 1989). El colesterol se reduce por la intermediación del coprostanol, coprostatona y colesteno de origen bacteriano en el intestino grueso (Tannock, 1988).

Existe poca información del mecanismo de acción de los probióticos en los cerdos a pesar de que se utilizan en algunas granjas convencionales y de que existen muchos productos a nivel comercial, este trabajo trata de investigar los efectos de un probiótico experimental sobre el sistema inmune del lechón, especialmente a nivel del sistema inmune del tracto gastrointestinal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar los efectos de la administración de un probiótico experimental sobre parámetros del sistema inmune del lechón.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar el efecto de la administración de un probiótico experimental sobre:

- I. La concentración de linfocitos T y B en sangre periférica de lechones.
- II. La morfología de intestino y órganos linfoides de lechones.
- III. La distribución y concentración de subpoblaciones de linfocitos T en el intestino y órganos linfoides de lechones.
- IV. La concentración de linfocitos B en ganglio linfático mesentérico posterior de lechones.

JUSTIFICACION

Estudios anteriores del efecto de los probióticos sobre el sistema inmune, indican que estos aumentan algunos parámetros inmunológicos, hasta la fecha no existen trabajos que demuestren este efecto sobre sistema inmune mucosal y órganos linfoides de lechones en condiciones de campo. El probiótico experimental que se utilizó en este estudio ha demostrado efectos clínicos muy favorables, en esta investigación se trató de comprobar si tiene alguna influencia benéfica sobre el sistema inmune del lechón.

HIPOTESIS

La administración de un probiótico experimental, tiene una influencia positiva sobre el desarrollo del sistema inmune inmaduro de lechones. La población de linfocitos B y subpoblaciones de T rebasarán los niveles de inmadurez presentes a esta edad. La estructuras histológicas en tejido linfoide e intestino estarán más desarrolladas en aquellos animales colonizados así como en la distribución de subpoblaciones de linfocitos T se comportarán de manera semejante a la de los adultos.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo se eligió cuidadosamente una granja de ciclo completo con sincronización de partos, clínicamente libre de enfermedades y con baja mortalidad durante la lactancia. Todas las camadas experimentales que se eligieron provenían de hembras de primer parto y con el fin de homologar la población experimental se "hermanaron" a las camadas; es decir media camada de la cerda A se le transfirió a la cerda B y media camada de la cerda B se le transfirió a la cerda A antes de la administración del probiótico. Así como se mantuvieron las mismas condiciones de manejo entre las camadas.

En la presente investigación se trabajaron dos camadas simultáneamente, una para cada tratamiento, los lechones de una de ellas recibieron una mezcla de *Lactobacillus casei* y *Streptococcus faecalis* por vía oral desde el primer día hasta el tercer día de nacido, la otra camada solo recibió caldo de cultivo, permanecieron con la madre y el día quince se eligió al azar un lechón de cada camada y se sacrificó por electrocución y/o se le tomó una muestra de sangre con heparina como anticoagulante (5 000 U.I./ml).

Este procedimiento se repitió 9 veces, los primeros 5 pares de animales experimentales (5 lechones testigos y 5 lechones colonizados = 10 animales experimentales) se sacrificaron y se sangraron al término del período ya mencionado, a los otros 4 pares de lechones (4 lechones testigos y 4 lechones colonizados = 8 animales experimentales) solo se les extrajo 5 ml de sangre con heparina.

Únicamente en los 10 primeros animales experimentales se les determinaron los linfocitos T totales por mediante la formación de rosetas E y los linfocitos B, por mediante la formación de rosetas EAC. En los 18 animales experimentales se cuantificaron los linfocitos B y las subpoblaciones de linfocitos T (CD2, CD4 y CD8) usando la técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta y las células fluorescentes se cuantificaron en un citófluorómetro de flujo.

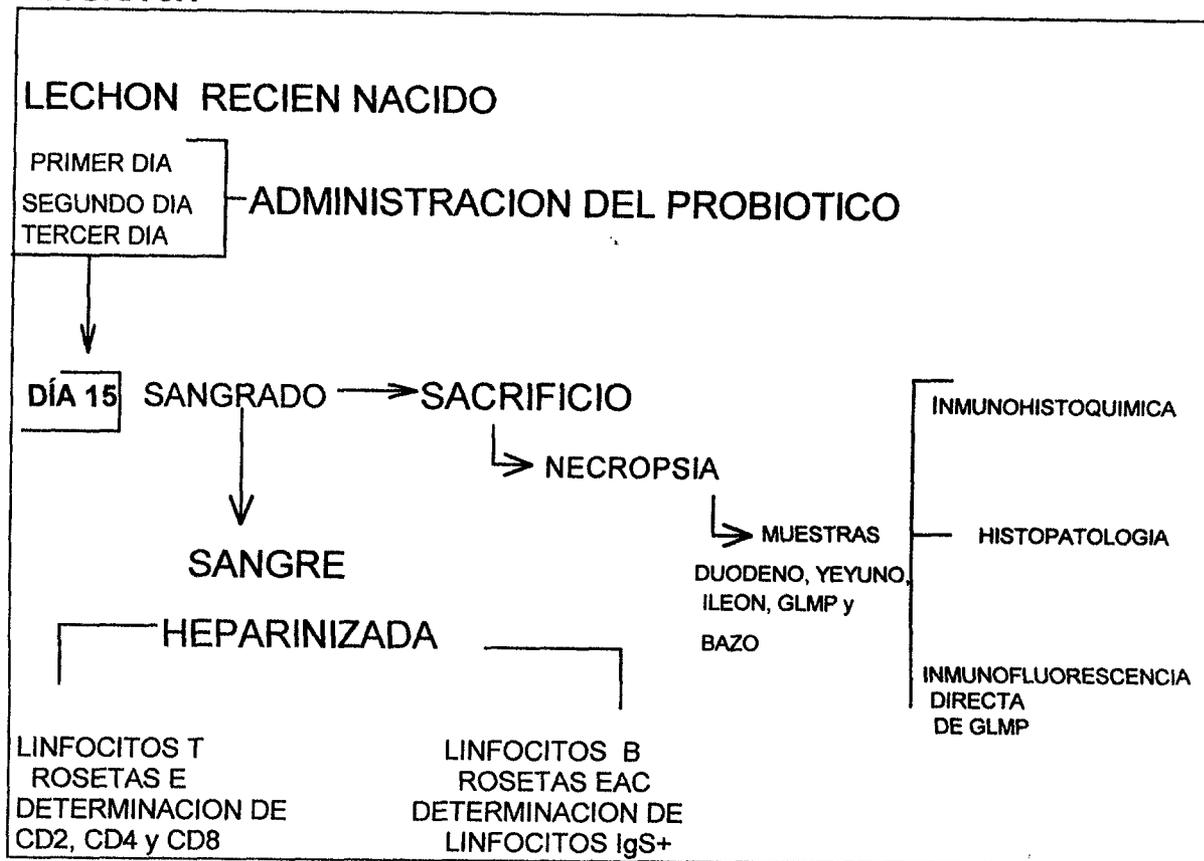
A los 10 animales que se sacrificaron se les tomaron muestras de bazo, ganglio linfático mesentérico posterior (GLMP), duodeno, yeyuno e íleon que fueron procesadas para el análisis histológico y para la determinación de las subpoblaciones de linfocitos T utilizando la técnica de inmunoperoxidasa y se determinaron los linfocitos B en GLMP utilizando inmunofluorescencia directa. el diagrama de flujo del protocolo experimental puede verse en la figura 5.1.

Los resultados que se obtuvieron de la determinación de linfocitos en sangre periférica son los porcentajes individuales de cada subpoblación de linfocitos. Los resultados obtenidos del análisis histológico son el promedio de 5 campos elegidos al azar y están expresados en células /campo (excepto en la determinación de LIE donde esta expresado en porcentaje), los datos obtenidos del estudio inmunohistoquímico (excepto en la determinación de linfocitos B en el

GLMP donde se maneja el porcentaje individual) son el promedio de 10 campos elegidos al azar y están expresados en linfocitos/mm² o en micras² para el caso de áreas positivas. Todos estos datos se compararon entre ambos grupos utilizando el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System. Se utilizó la estadística no paramétrica, específicamente la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes .

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

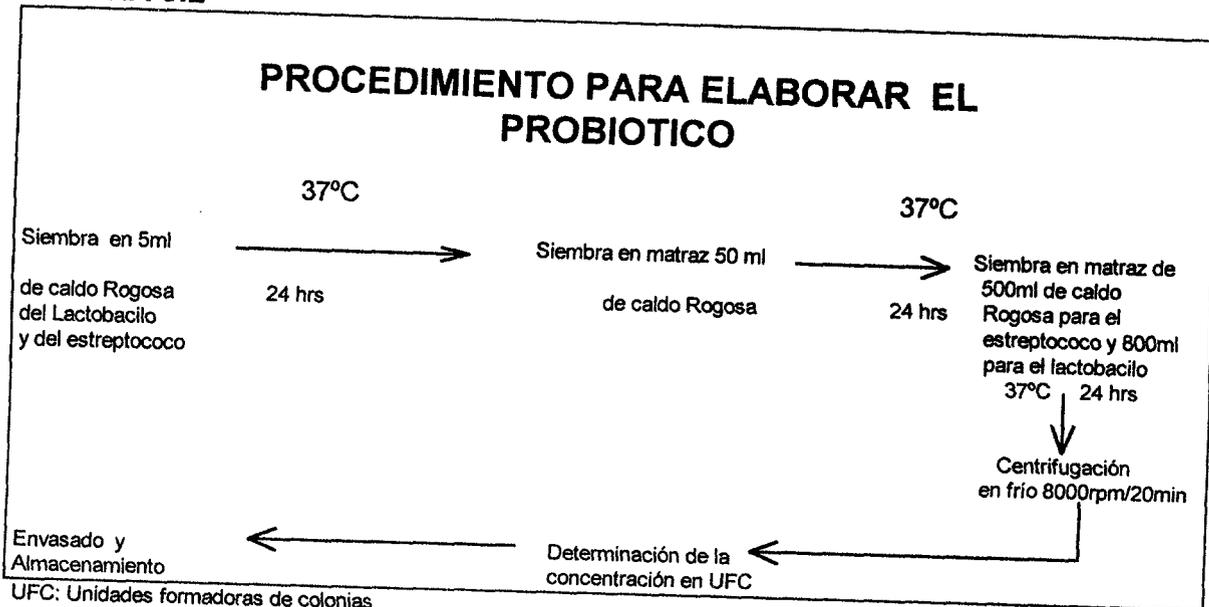
FIGURA 5.1



5.2 ELABORACION DEL PROBIOTICO

El primer día se sembraron en tubo con caldo Rogosa el *Streptococcus faecalis* y en otro el *Lactobacillus casei*, se dejaron en incubación durante 24 h a 37° C en baño María, al segundo día estos tubos se resembraron en matraces con 50 ml de caldo Rogosa uno para el lactobacilo y otro para el estreptococo, se incubaron a 37°C durante 24 horas y se hicieron subcultivos consecutivos hasta obtener un volumen final de 800ml de *Lactobacillus casei* y 500 ml de *Streptococcus faecalis*. A continuación el cultivo se centrifugó en frío en botellas de 250 ml a 8000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se retiró y se repitió la operación hasta terminar con todo el cultivo, al final se obtuvo un sedimento que fue resuspendido en un poco del sobrenadante, a continuación se muestra un diagrama de flujo del proceso (figura 5.2)

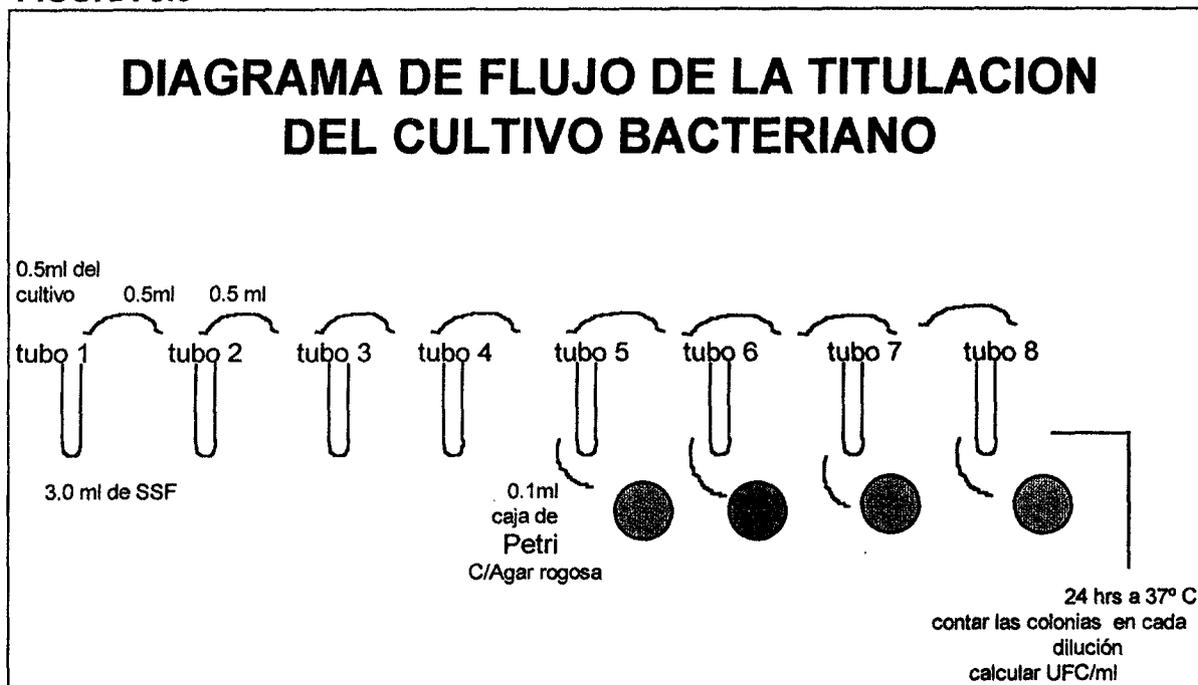
FIGURA 5.2



Al concentrado de lactobacilos y estreptococos, por separado, se le sometió a titulación por dilución, se tomaron 0.5 ml del concentrado obtenido anteriormente y se inoculó en un tubo con 3 ml de solución salina fisiológica (SSF), se agitó para homogeneizar la suspensión, y se tomaron 0.5 ml de esta y se pasaron a otro tubo con 3 ml de SSF, esta operación se repite 8 veces. De cada uno de los últimos cuatro tubos se tomaron 0.1 ml y se sembraron en cajas de Petri con agar Rogosa, se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de este período se contaron las colonias en cada caja de Petri y se hicieron los

cálculos para obtener las unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml), el procedimiento se muestra en la figura 5.3.

FIGURA 5.3



La concentración final que se preparó fue de 1×10^9 UFC/ ml de *Lactobacillus casei* y de 1×10^8 UFC/ml de *Streptococcus faecalis*. Se envasó y conservó en refrigeración, un mes máximo; a los animales se les administró por vía oral 2 ml de la suspensión de lactobacilos y 1 ml de la suspensión de estreptococo, durante 3 días.

5.3 DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN SANGRE PERIFÉRICA

5.3.1 OBTENCION DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (ENCB IPN, 1989, Morilla y Bautista, 1986)

A 10 ml de sangre heparinizada se le agregaron 2 ml de gelatina al 3% en sol. Alsevers, se dejó incubar a 37° C durante 45 min, se obtuvo el plasma rico en leucocitos, y se mezcló con hierro carbonilo se dejó reposar en forma horizontal durante 45 min a 37° C, los macrófagos fagocitaron al hierro y se separaron utilizando un imán. El líquido que resultó era rico en linfocitos. A continuación a un tubo lleno hasta la tercera parte con Ficoll-hypaque se le agregó suavemente, el plasma que contenía los linfocitos, se centrifuga durante 30 min a 1500 rpm, el resultado es la formación de un gradiente, los linfocitos se encuentran en la interfase entre el ficoll y el plasma, se obtuvo la interfase con una pipeta y se lavó en sol. de Alsevers a 1500 rpm durante 10 min para eliminar el ficoll contaminante. Se realizó un conteo en cámara de Neubauer para conocer la concentración de linfocitos en la suspensión obtenida y se ajustó a 4×10^6 linfocitos /ml.

Los linfocitos obtenidos por este método fueron utilizados para determinar los linfocitos T y B por la formación de rosetas E y EAC y para determinar subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos B por citometría de flujo.

5.3.2 DETERMINACION LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA POR MEDIO DE LA FORMACION DE DE ROSETAS E (ENCB IPN 1989, Morilla y Bautista 1986)

Los linfocitos T espontáneamente se unen a los g.r. de carnero por medio del CD2.

- 1.-Se tomaron 250 μ l de la suspensión de linfocitos y 250 μ l de g.r. (ver apéndice)
- 2.- Se incubaron a 37.° C durante 15 min se centrifugaron a 500 rpm durante 2 min.
- 3.- Se refrigeró durante toda la noche.
- 4.- Al día siguiente se hizo la lectura, se consideraron rosetas si un linfocito estaba rodeado de más de tres entrocitos, se contaron por lo menos 100 linfocitos y se reportó el porcentaje de rosetas.

5.3.3 DETERMINACION DE LINFOCITOS B EN SANGRE PERIFERICA POR MEDIO DE LA FORMACION DE ROSETAS EAC (ENCB IPN 1989, Morilla y Bautista, 1986)

Los linfocitos B forman rosetas siempre y cuando los glóbulos rojos de carnero estén cubiertos con anticuerpos y el subcomponente C3b del complemento.

1.- De la suspensión de linfocitos obtenida y ajustada a 4×10^6 células/ ml, se tomaron 250 μ l, y 250 μ l de la suspensión de g.r. sensibilizados (ver apéndice)

2.- Se centrifugaron a 50 rpm por 2 min.

3.- Se dejó reposar a temperatura ambiente 15 min.

4.- Se retiró la mitad del sobrenadante y se resuspendió el botón muy suavemente, se tomó una gota y se colocó sobre un portaobjetos y se hizo la observación al microscopio.

Se consideraron rosetas si un linfocito estaba rodeado de más de tres eritrocitos, se contaron por lo menos 100 linfocitos y se reportó el porcentaje de rosetas.

5.3.4 PREPARACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTIGAMMA GLOBULINA DE CERDO PARA LA DETERMINACION DE LINFOCITOS B (ENCB IPN 1989, Morilla. y Bautista 1986)

Para obtener un policlonal que permitiera detectar linfocitos B de cerdo primeramente se procedió a la purificación de gamma globulina de cerdo.

La precipitación de la gammaglobulina por el método que a continuación se describe se debe a el fenómeno de *salting out*, el cual consiste en que las moléculas de agua que solvatan a la molécula de anticuerpo son desplazadas por iones sulfato de amonio, que además neutralizan los grupos cargados de la proteína, con lo que se insolubiliza y se precipita. Generalmente se considera que con cinco reprecipitaciones se obtiene una gamma globulina con un alto grado de pureza.

A 47 ml de suero de cerdo se le agregó 23.5 ml de una sol. de sulfato de amonio saturada a pH 7.8, el precipitado formado se centrifugó a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y se disolvió en 15 ml de solución salina amortiguada (SSA), este proceso se repitió 3 -5 veces, el precipitado obtenido la última vez se disolvió en la tercera parte del volumen original, en solución salina- boratos. Se dializó durante tres días, con tres cambios de solución salina boratos.

Una vez finalizada la diálisis, se determinó la cantidad de proteína que contenía por el método de Lowry (ver apéndice).

Con el fin de obtener antigamma globulina de cerdo se procedió a inmunizar dos conejos con la proteína purificada, con un calendario de inmunización para antígenos solubles en dosis múltiples (ver cuadro 5.1)

CUADRO 5.1

PROTOCOLO DE INMUNIZACION A CONEJOS

Primer día

5 mg de proteína / ml + 1ml de adyuvante completo de Freund vía subcutánea

Día 15

5 mg de proteína / ml + 1ml de adyuvante incompleto de Freund vía subcutánea.

Día 30

3 dosis solubles de 250 mg, 500 mg y 1mg de proteína soluble vía intravenosa

Día 41

Sangrado. En el suero se determina la respuesta obtenida por precipitación en tubo capilar

Día 49

5 mg de proteína / ml + 1 ml de adyuvante incompleto de Freund
Si la respuesta no es buena se recomienda reinmunizar a los animales.

Día 57

Sangrar al conejo.

El suero de los conejos se tituló por precipitación en tubo capilar como a continuación se describe:

- 1.- Se tomaron 0.25 ml del suero de cerdo (Ag) y se hicieron diluciones al doble en tubos de ensayo con solución salina al 0.85%
- 2.- Se tomó el anticerdo (Ac) se llenó hasta la primera marca del tubo capilar, se limpió y se giró 180° y se llenó con el suero de cerdo hasta una segunda marca se agitó bien y se clavó en plastilina, se repitió esta operación en las diluciones, se colocaron también dos testigos uno únicamente con suero de cerdo y otro de antisuero.
- 3.- Se incubó 24 h a temperatura ambiente y se hizo la lectura.
- 4.- Se midió el precipitado formado a una mayor respuesta se obtenía mayor cantidad de precipitado.

Una vez titulado el suero anticerdo se sometió a precipitación de la fracción gammaglobulina, como ya se explicó en pasos anteriores, a este precipitado se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (ver apéndice).

Se preparó una solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC) en solución boratos pH 7.8, en una proporción de 0.5mg de FITC por cada mg de proteína.

Se disolvió y se ajustó el pH hasta 8.5, se agitó en frío y se dializó hasta que no eliminó fluoresceína, con solución salina fosfatos. Una vez concluido este

proceso se obtuvo un anticuerpo antigamma globulina fluoresceinado de cerdo que fue utilizado para detectar linfocitos B en sangre periférica y en células linfoides procedentes de ganglio linfático.

5.3.5 DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA E INDIRECTA UTILIZANDO EL CITOMETRO DE FLUJO (modificado de ENCB IPN, 1989)

La citometría de flujo es una tecnología que permite medir diferentes características en una célula de manera simultánea. Estas características son relativas, no absolutas, el tamaño (FSC), granularidad ó complejidad interna (SSC) y la intensidad de la fluorescencia (FL1, FL2, FL3), no se mide en unidades de medición sino se comparan unas con otras. Esto se hace por medio de la detecciones de señales de la dispersión de la luz de láser y la emisión de fluorescencia.

El rayo láser penetra un área con un índice de refracción diferente al del aire en el cual se mueve y se produce una dispersión del rayo que se detecta por detectores axiales (forward scatter FSC). El FSC mide la luz que se dispersa en ángulos pequeños (difracción).

Dentro de la dispersión de la luz hay reflexión de la luz dada por las membranas citoplasmática y del núcleo y los gránulos; esta da el tamaño también hay refracción (cuando la luz se dispersa en ángulos de 90 °) da la granularidad o complejidad de la célula. En resumen midiendo la luz dispersada en dos ángulos diferentes tenemos:

1.- FSC. Luz difractada en ángulos pequeños entre 1° y 10°, generalmente proporciona el tamaño celular y es detectado por filtros axiales que se encuentran en la misma dirección del rayo.

2.- SSC: Luz refractada en ángulos mayores, proporcional a la granularidad ó complejidad interna de la célula y es detectada por filtros axiales situados a 90°.

Otra característica que se puede medir en el citofluorómetro es la fluorescencia, la luz láser de argón 488 nm de salida, excita a el fluorocromo que este unido a un Ac específico y emite una luz de diferente longitud de onda. La energía se libera en forma de luz y calor. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos a las células.

5.3.5.1 TINCION DE LAS CÉLULAS PARA CITOMETRIA DE FLUJO

1.- Se colocaron 2 ml de PBA (solución salina-fosfatos-albúmina) en cada tubo de poliestireno

2.- Se agregaron $0.5 - 1 \times 10^6$ células/ ml de la suspensión de linfocitos de lechón

3.- Se centrifugó a 1500 rpm por 4 min en una centrifuga refrigerada 4° C

4.- Se retiró el sobrenanadante.

5.- Se resuspendió el botón en PBA

6.- Se agregó el anticuerpo monoclonal antiCD2, antiCD4, y antiCD8 en las diluciones y cantidades previamente establecidas y el policlonal antigammaglobulina de cerdo a cada tubo respectivamente.

Los monoclonales utilizados en esta técnica fueron donados por el Dr. Marco Antonio Vega López adscrito al Departamento de Genética del Centro de Investigaciones Avanzadas (CINVESTAV-IPN). Las clonas utilizadas fueron las que se muestran en el cuadro 5.2.

CUADRO 5.2 CLONAS DE UTILIZADAS EN LA CITOMETRIA DE FLUJO

CLONA	ESPECIFICIDAD
MSA4	ANTICD2
76-12-4	ANTICD4
76-2-11	ANTICD8

Para cada animal se tenían dos tubos testigo, un testigo de células no se le agregó monoclonal ni el segundo anticuerpo. El otro tubo testigo contenía células y el antiratón fluoresceinado.

7.- Se incubó a 37° C 30 min.

8.- Se lavó dos veces con PBA centrifugando a 1500 rpm 4 min

9.- Se agregó PBA al control de células

10.- Se agregó al resto de los tubos el anticuerpo antiratón fluoresceinado

11.- Se incubó 30 min a 37° C, protegiendo los tubos de la luz.

12.- Se lavó dos veces con PBA a 1500 rpm 4 min

13.- Se agregó 1 ml de paraformaldehído al 1%

Terminado este proceso la muestra se encontraba lista para adquirirse en el citómetro de flujo.

5.4 ESTUDIO HISTOLOGICO DE TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO

5.4.1 DETERMINACION DE ESTRUCTURAS HISTOLOGICAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNE EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO POR LA TECNICA DE HEMATOXILIONA Y EOSINA (Kiernan, 1989)

Las muestras de tejido fueron fijadas colocándolas en una solución de peryodato-lisina-p-formaldehído (ver apéndice), durante 24 horas y posteriormente se conservaron en alcohol al 70% hasta su utilización.

Después se procedió a su inclusión en parafina (ver apéndice) y se realizaron cortes transversales de los órganos en un microtomo American Optical, con un grosor de 4 μ .

Se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina (ver apéndice).

Con esta técnica se revisaron en el microscopio óptico (marca CARL ZEISS) las estructuras enlistadas en el cuadro 5.3

CUADRO 5.3 ESTRUCTURAS HISTOLOGICAS REVISADAS CON LA TINCION DE HEMATOXILINA Y EOSINA

ORGANO	ESTRUCTURA
BAZO	PALS, células plasmáticas
GLMP	Folículos primarios y secundarios
DUODENO	Linfocitos intraepiteliales (LIE), células plasmáticas
YEYUNO	LIE, células plasmáticas
ILEON	LIE, placas de Peyer (PP), regiones de domo

Para la cuantificación de PALS, folículos primarios, secundarios, se eligieron 5 campos al azar con el objetivo seco débil y se contaron las estructuras presentes. Se contaron el total de folículos en placas de Peyer y regiones de domo, con el objetivo seco débil. Para contar las células plasmáticas se eligieron al azar 5 campos con el objetivo seco fuerte. Se determinó el porcentaje de LIE, contando enterocitos y LIE hasta completar 100 células, en la punta de 5 vellosidades elegidas al azar; con el objetivo seco fuerte. Se obtuvieron los promedios por campo de cada estructura revisada, en cada animal.

5.4.2 DETERMINACION DE CELULAS ACTIVADAS EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO POR LA TECNICA DE VERDE METIL PIRONINA (modificado de Kiernan, 1989)

En esta técnica se observan DNA y RNA. El verde metil es un colorante básico que se combina con los grupos fosfóricos del DNA y bajo condiciones controladas la pironina se une específicamente con el RNA, el pH es un punto crítico de esta tinción, así como las concentraciones de los colorantes. La técnica da una coloración verde al DNA y una coloración roja al RNA.

- 1.- Los cortes se desparafinaron, por inmersión en xilol durante 20 min.
- 2.- Los tejidos se hidrataron pasándolos por etanol en concentraciones decrecientes (100,96, 80 y 70%), 2 minutos en cada alcohol.
- 3.- Se sumergieron en la solución de tinción por 5 minutos.(ver apéndice)
- 4.- Se lavó en agua destilada dos veces (solo unos segundos)
- 5.- Se sacudió hasta retirar todo el exceso de agua.
- 6.- Se deshidrató agitando vigorosamente en cada uno de los tres cambios de 2-butanol.
- 7.- Se aclarará 6 minutos en xileno .
- 8.- Se montó con resina.

El DNA se tiñe de verde y el RNA de rosa brillante ó rojo. Algunos carbohidratos sulfatados (gránulos de las células cebadas, matriz cartilaginosa y algunos tipos de moco) se colorean metacromáticamente (naranja), por la pironina.

Se eligieron al azar 10 campos y se contaron las células positivas en cada uno de ellos con el objetivo seco fuerte, en bazo, en corteza y médula de linfonodo y en lámina propia de duodeno, yeyuno e íleon.

Se obtuvo el promedio por animal de células positivas/campo en cada órgano examinado.

5.5 DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN TEJIDOS LINFOIDES E INTESTINO POR TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

5.5.1 DETERMINACION DE LINFOCITOS B POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA EN CELULAS LINFOIDES DE GANGLIO LINFATICO MESENTERICO POSTERIOR ENCB IPN, 1989)

5.5.1.1 OBTENCION DE CELULAS LINFOIDES DE GANGLIO LINFATICO MESENTERICO POSTERIOR

Se retiró el tejido conectivo del linfonodo y se cortó en pequeños trozos, a continuación se maceró para hacerlo pasar por una malla de metal, se utilizó

medio de cultivo RPMI, para facilitar la operación y suspender a las células, se recogió todo el líquido rico en linfocitos y se pasó por organza, la suspensión celular se cuantificó, como en el caso de los linfocitos de sangre.

5.5.1.2 TINCION

- 1.- Se preparó p-L-lisina en una dilución de 1:5000
- 2.- Los portaobjetos tenían un papel adhesivo que formaba 4 pozos, estos se sensibilizaron: en cada pozo se colocaron 20 μ l de poli-L-lisina, y se dejó incubar 20 min, después se hicieron lavados con solución salina amortiguada
- 3.- Se agregaron 20 μ l de la suspensión de linfocitos con 4×10^6 linfocitos por ml, se incubó durante 20 min, a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces.
- 4.- Se fijaron las células con formaldehído al 1%, durante 5 min y se lavó.
- 5.- Se agregó el conjugado antigammaglobulina, se incubó durante 30 min.
- 6.- Se hicieron lavados, para retirar el anticuerpo que no reaccionó.
- 7.- Se agregó una gota de solución de montaje, se retiró el papel adhesivo y se colocó el cubreobjetos.
- 7.- La observación se realizó en un microscopio CARLS ZEISS de LUV se localizaron las células y con el objetivo de inmersión se contaron los linfocitos fluorescentes y no fluorescentes hasta completar 200 y se calculó el porcentaje de células fluorescentes.

5.5.2 DETERMINACION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO POR LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA

(modificado de Haines and Chelack, 1991)

Esta es una técnica indirecta que utiliza un segundo anticuerpo, una antigammaglobulina conjugada con una enzima para detectar la unión del anticuerpo primario con el antígeno en el tejido, aunque resulta más complejo e implica un mayor gasto de tiempo, presenta dos claras ventajas, sobre los métodos directos: aumentan la sensibilidad para la detección del antígeno, ya que los anticuerpos secundarios se unen a los anticuerpos primarios intensificando, los signos visibles producidos por la unión del anticuerpo primario, además no se requiere la conjugación del anticuerpo primario y existen disponibles comercialmente antisueros conjugados con títulos muy altos. Una de las técnicas más versátiles es el COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA (ABC). Este método está fundado en la alta afinidad de la biotina con la proteína del huevo avidina, los antígenos en el tejido son detectados por un anticuerpo primario no marcado, seguido de un segundo anticuerpo marcado con biotina, después de este segundo anticuerpo el tejido es expuesto a complejos preformados de avidina, cada avidina tiene cuatro sitios de unión para la biotina, el complejo garantiza por lo menos tres sitios de unión para complejos del anticuerpo biotinilado asociados a tejidos, las moléculas de avidina están marcadas con una enzima, la peroxidasa. Tanto en el método directo como en el indirecto se le añade el sustrato de la enzima y si es necesario un cromógeno como indicador de la reacción de óxido-reducción aparece un producto colorido en los sitios de unión

del anticuerpo y el complejo enzimático. En la presente investigación se utilizó un paquete comercial *HISTOMARK*.

TOMA DE MUESTRAS Y FIJACION DE LOS TEJIDOS

Se realizó la necropsia y se tomaron las muestras de: bazo, ganglio linfático mesentérico posterior (GLMP); duodeno (3 cm después de la unión piloroduodenal), yeyuno (se consideró aproximadamente a la mitad del tubo intestinal), íleon (5 cm antes de la unión ileocecal); para los estudios de inmunohistoquímica e histopatología

El manejo y conservación de la muestra debe garantizar la integridad de los receptores celulares, por lo que debe procederse rápidamente. Después del sacrificio se tomaron muestras de bazo, LNMP y fragmentos de duodeno, yeyuno e íleon.

Estas muestras se depositaron en viales de plástico de 1.5 ml que contenían Tissue-Tek y se congelaron en nitrógeno líquido, posteriormente se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

Los cortes de los tejidos se hicieron en un criostato American Optical a -20°C con un grosor de $6-8\mu$ se colocaron sobre portaobjetos que previamente se sensibilizaron (ver apéndice) y posteriormente fueron fijados en acetona a 4°C durante 10 min, se dejaron secar y se protegieron de la luz y la humedad, se congelaron -70°C hasta su procesamiento.

ENZIMAS ENDOGENAS

Las enzimas endógenas de los tejidos pueden resultar un sustrato para la enzima del complejo en ausencia de unión específica con el anticuerpo. Esta interacción puede evitarse inactivando las enzimas propias del tejido antes de la inmunotinción. El tratamiento más común es la exposición a peróxido de hidrógeno en metanol.

- 1.- Los portaobjetos con el tejido se colocaron en una solución de H_2O_2 al 2.5% en metanol, se dejaron por 1 hora.
- 2.- Se retiró el metanol residual con 5 lavados en PBS (solución amortiguadora salina-fostatos) de 5 minutos cada uno.

ANTICUERPOS PRIMARIOS

La adherencia no específica de inmunoglobulina a los tejidos fue minimizada por la aplicación de la dilución más alta posible del anticuerpo monoclonal que resultó en la mejor apreciación de la tinción.

La adherencia inespecífica se reduce tratando a los cortes de tejido con suero normal, antes de la exposición al anticuerpo primario, el suero normal actúa saturando los sitios de unión de inmunoglobulina, evita la unión de el anticuerpo específico. Generalmente se utiliza suero normal de la especie en la cual el segundo anticuerpo fue preparado.

- 3.- Los cortes fueron incubados con suero normal de cabra durante 1 hora, es importante que desde este paso las incubaciones fueron en cámara húmeda .

Se utilizaron anticuerpos monoclonales hechos en ratón, donados por el Dr. Marco Antonio Vega-López adscrito al departamento de Genética en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), que se enlistan en el cuadro 5.2.

4.- Los tejidos se incubaron con el anticuerpo correspondiente monoclonal a la dilución previamente determinada, durante dos horas.

5.- Se hicieron 5 lavados en PBS de 5 minutos cada uno.

ANTICUERPO SECUNDARIO

El anticuerpo secundario biotinilado esta dirigido contra ratón y fue preparado en cabra, es uno de los reactivos del kit que se utilizó.

6.- Los tejidos se incubaron con una gota este reactivo durante una hora.

7.- Se lavaron 5 veces durante 5 minutos con PBI.

COMPLEJO STREPTAVIDINA- PEROXIDASA

Este reactivo también forma parte del kit con que se trabajó.

8.- Una gota del complejo estreptavidina-peroxidasa se colocó sobre los tejidos y se incubó durante una hora.

9.- Se realizaron cinco lavados en PBS.

CROMOGENO

Es la fuente de color que revela las reacciones que han ocurrido, se utilizó 3,3diaminobenzidina-HCl, (DAB) que genera un precipitado color café oscuro, las ventajas de utilizar a la DAB es que produce intensos depósitos, no es soluble en solventes orgánicos ni acuosos, por lo que la preparación es estable indefinidamente.

10.-A cada corte de tejido se le colocó una gota de la solución de DAB al 0.05%, en TRIS HCl (ver apéndice), se observó al microscopio óptico con el objetivo seco débil.

11.- En el momento en que se distinguieron claramente las células positivas se detuvo la reacción, colocando las preparaciones en PBS.

12.- Se realizaron 5 lavados en PBS para eliminar el exceso de DAB.

MONTAJE

En este momento fue posible observar la reacción que se ha llevado a cabo, con el procedimiento de montaje se garantizó la duración de la preparación en óptimas condiciones para su observación posterior.

13.- Se contratiñó con hematoxilina de Harris con la finalidad de teñir el fondo y resaltar a las células positivas.

14.- Se deshidrató el tejido al pasarlo por etanol en concentraciones crecientes, dejándolo 2 minutos en cada alcohol, hasta llegar al etanol absoluto.

15.- Se aclaró con xilol (6 minutos)

16.- Se colocó una gota de resina sobre los cortes y un cubre objetos, estas preparaciones estaban listas para observarse al microscopio.

17.- Observación: Las células positivas se observaron de un color café dorado. Se contaron diez campos para cada estructura y en cada órgano.

La medición se realizó en un microscopio óptico y un analizador de imágenes semiautomático (VIDS IV), Analytical Measuring Systems, Saffron Walden UK.

Se obtuvieron los promedios de cada animal de linfocitos/ mm² o el promedio en micras² cuando se trataba de áreas.

Se contaron los linfocitos positivos o las áreas con la reacción positiva, en 10 campos, para cada una de las subpoblaciones de linfocitos T en las estructuras y órganos que se enlistan en el cuadro 5.4

**CUADRO 5.4 ESTRUCTURAS HISTOLOGICAS REVISADAS
CON LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA**

ESTRUCTURA	ORGANO
Lámina propia Epitelio	duodeno, yeyuno, íleon
Áreas interfoliculares (placa de Peyer) Folículos (placa de Peyer)	íleon
Manguito periarteriolar (PALS-periarteriolar lymphatic sheath)	bazo
Paracorteza	GLMP

Se obtuvieron los promedios de cada animal y de cada órgano y estructura observados.

6. RESULTADOS

6.1 DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN SANGRE PERIFÉRICA

6.1.1 DETERMINACION DE LINFOCITOS T Y B DE SANGRE PERIFERICA POR ROSETAS E y EAC

Se determinó el porcentaje de linfocitos T utilizando la técnica de rosetas E y el porcentaje linfocitos B usando la técnica de rosetas EAC, en sangre periférica de 5 lechones testigos y 5 lechones colonizados con el probiótico. En este estudio se encontró que los valores de linfocitos T medidos por rosetas E mostraron un promedio de $23.6\% \pm 6.22$ en los lechones testigos y un promedio de $21.2\% \pm 7.98$ en los animales colonizados con el probiótico. El porcentaje de linfocitos B medidos por rosetas EAC fue en promedio en los animales testigos de $25\% \pm 12.1$ y de $36.8\% \pm 12.9$ los resultados individuales de cada animal pueden consultarse en el cuadro 6.1

CUADRO 6.1
Determinación de linfocitos T y B
en sangre periférica

ROSETAS E (linfocitos T)				ROSETAS EAC (linfocitos B)			
TESTIGOS		COLONIZADOS		TESTIGOS		COLONIZADOS	
lechón 1	34	lechón 2	29	lechón 1	24	lechón 2	46
3	20	4	12	3	20	4	23
5	18	6	19	5	24	6	42
7	24	8	16	7	46	8	50
9	22	10	30	9	15	10	23
x	23.6	x	21.2	x	25	x	36.8
s	6.22	s	7.98	s	12.1	s	12.9

n= 5 testigos y 5 colonizados. Rosetas E: espontaneas, rosetas EAC: rosetas . x= PROMEDIO s= DESVIACION ESTANDARD

Se muestran los porcentajes individuales de linfocitos T y B determinados mediante la formación de rosetas E y EAC en sangre periférica de lechones testigos y colonizados con un probiótico

6.1.2 DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN SANGRE PERIFERICA POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA E INDIRECTA UTILIZANDO EL CITOMETRO DE FLUJO

Las determinaciones de linfocitos B se hicieron utilizando un anticuerpo policlonal antigammaglobulina de cerdo fluoresceinado, las determinaciones de linfocitos T CD2+, CD4+, CD8+, se hicieron utilizando un anticuerpo monoclonal uniéndolo a un segundo anticuerpo fluoresceinado, la fluorescencia en los linfocitos positivos fue medida usando un citofluorómetro de flujo (BECKTON-DICKINSON FACSCALIBUR),

Inicialmente se trabajaron 18 animales, al final solo se obtuvieron resultados de 7 animales testigos y 7 animales colonizados con el probiótico. En 4 animales testigos y 2 lechones colonizados se distinguieron en la gráfica de puntos (dot plot) y en la gráfica de contorno (contour plot) del citómetro, dos regiones de condensación de células, localizadas en la parte media pero hacia abajo muy cerca del eje de las abscisas a esta población se le llamó **región H** (HG cuando son animales con dos regiones). La otra población de células se situó en una zona más hacia el centro y hacia la parte superior, se le denominó **región G**. Otro grupo de 3 animales testigo y 5 animales colonizados solo tuvo una población de células que corresponde con la ya descrita **región H** (HU, porque presentaron una región única). La localización de estas poblaciones se puede ver en la figura 6.0.

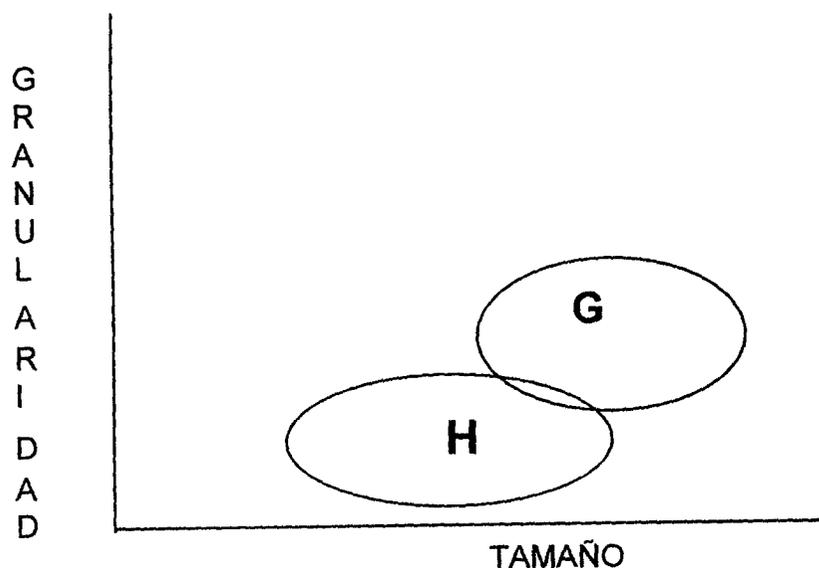


FIGURA 6.0 Gráfica (obtenidas mediante la citometría de flujo) de la localización de las regiones de linfocitos, que se observaron en los animales testigos y colonizados. Región G (linfocitos grandes/ muy granulares), región H (linfocitos de tamaño y granularidad intermedia).

CUADRO 6.2
Determinación de subpoblaciones de linfocitos
T y B en sangre periférica

TESTIGOS					COLONIZADOS				
lechón	CD2%	CD4%	CD8%	IgS%	lechón	CD2%	CD4%	CD8%	IgS%
5 ^H	49.7	0	26.8	0	4 ^H	ND	16.5	29.7	1.3
5 ^G	34.4	5.11	16.9	54.7	4 ^G	NEG	NEG	NEG	NEG
7 ^H	13.3	ND	11.5	9.31	6 ^H	ND	46.3	26.28	6.7
7 ^G	89.0	ND	15.6	3.0	6 ^G	NEG	NEG	NEG	NEG
9 ^H	80.6	8.2	5.1	16.8	8 ^H	50.8	ND	55.26	4.0
9 ^G	NEG	NEG	NEG	NEG	8 ^G	NEG	NEG	NEG	NEG
21 ^H	ND	8.22	35.1	3.4	10 ^H	29.2	5.7	16.7	9.3
21 ^G	ND	0	49.0	4.7	10 ^G	NEG	NEG	NEG	NEG
22 ^H	60.5	60.6	65.0	1.2	11 ^H	66.2	14.5	29.1	5.0
22 ^G	59.4	29.5	59.4	11.9	11 ^G	NEG	NEG	NEG	NEG
23 ^H	24.3	27.9	20.7	1.39	12 ^H	86.5	56.2	37	0
23 ^G	NEG	NEG	NEG	NEG	12 ^G	75.22	19.4	34.1	13.4
24 ^H	ND	48.9	67.5	16.6	13 ^H	52.8	15.9	45.4	3.3
24 ^G	NEG	NEG	NEG	NEG	13 ^G	85	5.8	49.4	22.2
x	45.15	20.9	33.8	11.1	x	63.68	22.5	36.1	7.24
s	21.7	22.1	22.7	15.4	s	20.7	18.5	13.06	6.93

n= 7 lechones testigos y 7 lechones colonizados, x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD G= región de linfocitos grandes , H = región de linfocitos intermedios. CD: Cluster Differentiation, IgS: Inmunoglobulina de superficie, ND no determinada, NEG no presentó la región de linfocitos correspondiente.

 Lechones que presentaron las regiones H y G en linfocitos en sangre periférica.  Lechones que presentaron la región H en linfocitos de sangre periférica

Se presentan los porcentajes individuales de linfocitos en cada una de las regiones encontradas en la citometría de flujo para los marcadores CD2, CD4 , CD8 e IgS en los lechones testigos y colonizados con el probiótico.

En los animales testigo los linfocitos CD2+ de la región HG tuvieron un rango de 13.3 a 49.7% y los que recibieron el probiótico presentaron un rango de 52.8-86.6%.

Este mismo grupo de animales tuvo otra población de linfocitos en la gráfica de puntos del citómetro, la región G (linfocitos grandes/ muy granulares), los lechones testigos tuvieron un 34.4 y un 39.9% de linfocitos T CD2+ y los lechones colonizados un 75.2 y un 85% de linfocitos CD2+, en esta región los linfocitos CD2+ son más abundantes en los animales que recibieron el probiótico.

En otro grupo de animales, en la gráfica de puntos del citómetro se pudo apreciar una sola región, que corresponde a la región aquí denominada HU. Los individuos testigos tuvieron un 80.63 y un 24.2% de linfocitos CD2+, los animales tratados presentaron un 50.8%, 29.2% y 66.3%, es evidente que no hay diferencia entre ambos grupos.

En la región de linfocitos HG de los animales testigos los linfocitos T CD4+ van desde 0% en dos animales 8.22 y 60.5% y en los lechones colonizados, los linfocitos de esta misma región son 15.9 y un 56.2% positivos a CD4; por alguna razón dos animales testigos carecen del marcador para linfocitos T cooperadores, esta situación no había sido reportada anteriormente.

Los linfocitos de la región G de los animales testigos presentaron dos animales con 0%, otro con 5.11% y uno más con 29.5%; en los lechones colonizados los porcentajes de linfocitos T CD4+ son 5.81 y 19.4. Es importante señalar que ningún animal colonizado de los que presentaron dos regiones de linfocitos (H y G), careció de linfocitos T cooperadores.

En la región HU de los linfocitos de los animales testigo se obtuvieron 8.2%, 27.9% y 48.9%, de linfocitos positivos a este marcador, en los animales colonizados solo uno tuvo 0%, los demás tuvieron 5.7%, 14.5%, 16.5 y 46.3%, en los linfocitos CD4+ no se observaron diferencias significativas en esta región, entre ambos grupos

En los animales testigo que presentaron región HG, tuvieron desde 11.5 hasta un 65% de linfocitos T citotóxicos; los lechones tratados con el probiótico presentaron un 37% y un 45.4% de linfocitos T CD8+.

En la región G de los animales testigos las células CD8+ van desde 15.6% hasta 59.3% y en los lechones colonizados fueron de 34.1% y de 49.4%, no parecen existir diferencias entre ambos grupos.

Los linfocitos de la región HU de los lechones testigos muestran porcentajes de linfocitos positivos a CD8 desde 5.1% hasta 67.5% y en los animales colonizados con la preparación probiótica los porcentajes de positividad a este marcador van desde 16.75% a 55.2%, los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T y de linfocitos B en cada región se pueden observar en el cuadro II.

La presencia de poblaciones de linfocitos como células nulas que carecen de marcadores de célula T y de célula B (CD2- IgS-), pueden calcularse restando a el

100% la cantidad de células CD2+ y las IgS+, así como células T dobles negativas (CD2+ CD4- CD8), que se calculan tomando en cuenta que las células CD2+ son el total de linfocitos T circulantes a estas se le resta la suma de los linfocitos CD4+ y CD8+, estos cálculos se realizaron en los animales que tenían el perfil completo. En la región H2 los linfocitos de los lechones testigos tuvieron valores de linfocitos nulos de 50.2% y de 79.19% y los animales colonizados de 13.4 y 43.9%; los valores de los animales testigos son claramente mayores que los de los animales colonizados. En la región G, los testigos obtuvieron resultados de 11.6% y de 57.9% y los animales colonizados con el probiótico, 11.5% y 42.5%, en este caso los datos son muy similares. El porcentaje de linfocitos nulos en la región HU de los animales testigos fue de 2.56% y de 74.36 y el porcentaje de linfocitos nulos en los animales colonizados que se presentaron en esta región es de 61.45% y de 28.4%. los resultados se muestran en el cuadro 6.3.

CUADRO 6.3
Determinación de subpoblaciones
de linfocitos T y B en sangre periférica
Cálculo de los dobles negativos (CD2⁺, CD4⁻CD8⁻)
y linfocitos nulos (CD2⁻IgS⁻)

TESTIGOS			COLONIZADOS		
lechón	CD2-IgS-%	CD2+CD4- CD8-%	lechón	CD2-IgS-%	CD2+CD4- CD8-
5 ^H	50.26	23.4	12 ^H	13.4	-6.6
7 ^H	79.19	1.82	13 ^H	43.9	-8.5
5 ^G	11.6	12.41	12 ^G	11.5	21.7
7 ^G	57.9	23.8	13 ^G	42.5	29.8
9 ^H	2.56	67.3	10 ^H	61.45	6.8
24 ^H	74.36	-24.35	11 ^H	28.4	22.7
x	40.3	12.2	x	33.5	11.15
s	32.2	11.36	s	19.4	15.9

x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD CD: Cluster Differentation, IgS: Inmunoglobulina de superficie, G : Linfocitos Grandes/ muy granulares, H: linfocitos de tamaño intermedio
 $CD2^- IgS^- = (100\% - (CD2^+ + IgS^+))$ $CD2^+ CD4^- CD8^- = CD2^+ - (CD4^+ + CD8^+)$

Se muestran el calculo de los linfocitos nulos (CD2⁻ IgS⁻) y linfocitos dobles negativos (CD2⁺ CD4⁻CD8⁻)

CUADRO 6.4
RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACION
DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T Y B EN SANGRE PERIFERICA

SUBPOBLACION	GRUPO EXPERIMENTAL				
	TESTIGOS		COLONIZADOS		
% DE LINFOCITOS	x	s	x	s	p
CD2	45.15	21.7	63.68	20.7	0.1
CD4	20.9	22.1	22.5	18.5	0.9
CD8	33.8	22.7	36.1	13.06	0.6
IgS	11.12	15.4	7.24	6.93	0.8
CD2+CD4-CD8-	12.2	11.36	11.15	15.9	0.4
CD2-IgS-	40.3	32.2	33.5	11.15	0.6
linfocitos T (ROSETAS E)	23.6	6.22	21.2	7.98	0.4
linfocitos B (ROSETAS EAC)	17	18	36.8	12.9	0.07

x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD CD: Cluster Differentiation, IgS: Inmunoglobulina de superficie, G : Linfocitos Grandes/muy granulares, H: linfocitos de tamaño intermedio $CD2^+ IgS^- = (100\% - (CD2^+ + IgS^+))$ $CD2^+ CD4^+ CD8^- = CD2^+ - (CD4^+ + CD8^+)$

En esta tabla se presentan los siguientes datos por grupo experimental : promedios, desviación estandard y resultados del análisis estadístico (prueba de Mann-Whitney), de las determinaciones de linfocitos B y subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica.

6.2 ESTUDIO HISTOLOGICO DE TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO

6.2.1 DETERMINACION DE ESTRUCTURAS HISTOLOGICAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNE EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO UTILIZANDO LA TECNICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA

En el bazo se encontraron focos de células mononucleares de forma irregular con el núcleo excéntrico y de citoplasma ligeramente basófilo, que fueron consideradas células plasmáticas (ver fig. 6.1 y 6.2), se contó el número de células por campo y no se observó una diferencia significativa, los resultados están en el cuadro V. En este órgano también se cualificaron el número de manguitos periarteriolas por campo, (ver fig. 6.1) no existió diferencia significativa entre los dos grupos de trabajo, los resultados pueden observarse en el cuadro 6.5.

CUADRO 6.5
Determinación de células plasmáticas
y manguito linfático periarteriolar en bazo

TESTIGOS			COLONIZADOS		
lechón	PALS	PLASMATICAS	lechón	PALS	PLASMATICAS
1	3.2	0	2	5.2	0
3	4.8	0	4	6.4	64.8
5	4	13.2	6	4	32.8
7	5.4	25.6	8	5.2	31.8
9	6	77.2	10	6.6	94
x	4.68	23.2	x	5.48	44.68
s	1.1	32	s	1.05	35.8

n= 5 testigos y 5 colonizados x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

PALS: Manguito linfático periarteriolar (Periarteriolar lymphatic sheath).

Se presentan los promedios de los conteos de 10 campos analizados de células plasmáticas por campo y número de manguitos linfáticos periarteriolas por campo en bazo teñido con H y E en los lechones testigos y en los lechones colonizados.

En el ganglio linfático mesentérico posterior (GLMP), con la técnica de H y E se cuantificaron el número de folículos primarios es decir aquellos que no han recibido estímulo y folículos secundarios en los que ya se logra observar la formación de centros germinales con la consecuente proliferación y diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas (ver fig. 6.3), los datos se encuentran en el cuadro 6.6.

CUADRO 6.6
Determinación de folículos primarios
y secundarios por campo en
ganglio linfático mesentérico posterior

TESTIGOS			COLONIZADOS		
lechón	Folículos primarios	Folículos secundarios	lechón	Folículos primarios	Folículos secundarios
1	5.8	0.8	2	8.5	0.25
3	6.3	5.6	4	8.5	8.5
5	9.5	6.5	6	0	12.5
7	9	11.5	8	7	2
9	4	0	10	0	9.5
x	6.92	4.88	x	4.8	6.55
s	2.29	4.66	s	4.42	5.2

n= 5 testigos y 5 colonizados x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se observan los promedios de 10 campos analizados en ganglio linfático mesentérico posterior (GLMP) teñido con H y E donde se cuantificaron los folículos primarios y secundarios por campo en los lechones colonizados y los testigos.

Con la técnica de hematoxilina y eosina en duodeno yeyuno e íleon se determinó el porcentaje de linfocitos intraepiteliales (ver fig. 6.4), en duodeno también se cuantificaron las células plasmáticas por campo, localizadas preferentemente en las criptas. Los animales colonizados mostraron una diferencia significativa en el porcentaje de LIE en duodeno $p= 0.02$; estos resultados pueden verse en el cuadro 6.7 y 6.12.

CUADRO 6.7
Células plasmáticas en criptas de duodeno y linfocitos intraepiteliales en duodeno y yeyuno.

TESTIGOS				COLONIZADOS			
DUODENO		YEYUNO		DUODENO		YEYUNO	
lechón	LIE%	PLASMATICAS cels./campo	LIE%	lechón	LIE%	PLASMATICAS cels./campo	LIE%
1	13.4	5.6	12.8	2	11.6	4	5.8
3	12	1.2	4.4	4	18.4	11.4	10.2
5	10.4	6.2	5.4	6	14.4	7.4	6.2
7	11.4	5.6	4.4	8	15.2	7.2	4.8
9	10	5	9.4	10	15.2	5.4	11.8
x	11.44	4.72	7.28	x	14.96	7.8	7.76
s	1.35	2.01	3.71	s	2.42	2.78	3.05

n= 5 testigos y 5 colonizados LIE: Linfocitos intraepiteliales x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se presentan el porcentaje promedio de linfocitos intraepiteliales (LIE) del conteo de 5 vellosidades en duodeno y yeyuno teñidos con la técnica de H y E de animales testigos y colonizados. También se muestran el promedio de células plasmáticas por campos resultado de la observación de 10 campos en las criptas de duodeno y yeyuno teñidos con H y E.

En íleon se cuantificaron el porcentaje de linfocitos intraepiteliales por vellosidad (LIE), el número de estructuras características de las placas de Peyer como folículos y regiones de domo que es el área que interactúa de manera directa con el contenido del lumen intestinal (ver fig. 6.5), resultados que están en el cuadro 6.8.

CUADRO 6.8
Determinación de linfocitos intraepiteliales, folículos y domos por campo en Placa de Peyer de íleon.

TESTIGOS				COLONIZADOS			
lechón	LIE %	FOLICULOS	DOMOS	lechón	LIE %	FOLICULOS	DOMOS
1	4.4	6.8	14	2	5.4	8	13
3	11.6	5.2	11	4	6	6	15
5	5.4	5.6	9	6	12.2	5.6	11
7	4.4	8.8	8	8	4.8	7.4	9
9	9.4	5.8	10	10	11.8	6.4	11
x	7.0	6.44	10.4	x	7.1	6.68	12
s	3.27	1.44	2.3	s	3.43	0.99	2.58

n= 5 testigos y 5 colonizados LIE: Linfocitos intraepiteliales x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se muestran los promedios individuales de folículos y domos de 10 campos observados, así como porcentajes de LIE en cinco vellosidades en cortes de íleon teñidos con H y E en los lechones testigo y en los lechones colonizados.

6.2.2 DETERMINACION DE CELULAS ACTIVADAS EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO POR LA TECNICA DE VERDE METIL-PIRONINA

En los cortes de los tejidos tomados de los animales testigos y de los animales colonizados se tiñeron con la técnica de **verde metil pironina**, que es útil para detectar células activadas, tradicionalmente se ha considerado que corresponden a células plasmáticas, esta técnica tiñe al RNA de las células de un color rojo intenso, se contaron la cantidad de células positivas por campo en lámina propia de duodeno, yeyuno e íleon, resultados que se encuentran en el cuadro 6.9.

CUADRO 6.9
Determinación de células activadas
en duodeno, yeyuno e íleon

TESTIGOS				COLONIZADOS			
lechón	DUODENO	YEYUNO	ILEON	lechón	DUODENO	YEYUNO	ILEON
1	9.5	5.4	12.2	2	0.9	8.7	6.3
3	5.4	8.7	24.9	4	7	18.8	25.5
5	0.7	13.2	21.9	6	6.6	14	26.8
7	8	10.4	8.5	8	5.9	13.1	17.2
9	5.8	10.9	29.2	10	3.3	10.4	16
x	5.88	9.72	19.34	x	4.74	13	18.36
s	3.3	2.9	5	s	5	3.8	8.2

n= 5 testigos y 5 colonizados x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD LIE:Linfocitos intraepiteliales

Se muestran los promedios individuales de células positivas a verde metilpironina en 10 campos de lámina propia de duodeno y yeyuno teñidos con esta técnica en lechones testigos y colonizados.

En GLMP se cuantificaron las células activadas por campo en corteza y médula, (ver fig. 6.6), en ambos grupos, es posible distinguir una distribución especial. Estas células activadas se localizaron preferentemente alrededor de los folículos entre los senos linfáticos hacia la médula, en este sitio los lechones colonizados mostraron mayor número de células pironinófilas, los resultados se pueden revisar en el cuadro 6.10 y en el 6.12. El mismo procedimiento se siguió en bazo y tampoco se encontró diferencia entre los animales testigo y los colonizados, los datos se encuentran en el cuadro 6.11.

CUADRO 6.10
Determinación de células activadas por campo en
ganglio linfático mesentérico posterior.

TESTIGOS			COLONIZADOS		
lechón	CORTEZA cels./campo	MEDULA cels./campo	lechón	CORTEZA cels./campo	MEDULA cels./campo
1	0.2	5.4	2	2	92
3	10.4	41.6	4	2.2	50
5	2.8	16.4	6	8	80
7	7.8	79.25	8	5.6	127.2
9	1.4	26.2	10	4.5	127.2
x	4.52	33.77	x	4.46	95.28
s	4.37	28.6	s	2.49	32.9

n= 5 testigos y 5 colonizados x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se presentan los promedios individuales de los conteos de células positivas a verde metilpironina en la corteza y médula del ganglio linfático mesentérico posterior de lechones testigo y lechones colonizados.

CUADRO 6.11
Determinación de células activadas
por campo en bazo

TESTIGOS cels./campo		COLONIZADOS cels./campo	
lechón1	0	lechón 2	0
3	5	4	6.8
5	4.8	6	7.0
7	3.6	8	8.6
9	5.6	10	5.6
x	3.8	x	5.6
s	2.24	s	3.3

n= 5 testigos y 5 colonizados x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se presentan los promedios individuales de los conteos (10 campos) de células positivas a verdemetilpironina en bazo de lechones testigo y lechones colonizados.

CUADRO 6.12
RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
EN LA DETERMINACION DE ESTRUCTURAS HISTOLOGICAS
RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNE EN
TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO

ESTRUCTURA	ORGANO	GRUPO EXPERIMENTAL				
		TESTIGOS		COLONIZADOS		
		x	s	x	s	p
plasmáticas**	bazo	23.2	32	44.6	35.8	0.25
plasmáticas **	duodeno	4.72	2.01	7.8	2.78	0.25
LIE*%	duodeno	11.4	1.35	14.96	2.42	0.02
LIE*%	yeyuno	7.28	3.71	7.7	3.05	0.4
LIE*%	ileon	7	3.27	7.1	3.43	0.6
PALS**	bazo	4.68	1.1	5.48	1.05	0.1
fóliculos** primarios	GLMP	6.92	2.29	4.8	4.42	0.4
fóliculos** secundarios	GLMP	4.88	4.66	6.5	5.2	0.13
fóliculos**	íleon	6.44	1.44	6.68	0.99	0.4
domos**	íleon	10.4	2.3	12	2.58	0.29
células** activadas	bazo					0.7
células** activadas	GLMP/corteza	4.52	4.37	4.46	2.49	0.7
células** activadas	GLMP/médula	33.77	28.6	95.28	32.9	0.01
células** activadas	duodeno	5.88	3.3	4.74	5	0.7
células** activadas	yeyuno	9.72	2.9	15	3.8	0.2
células** activadas	íleon	19.34	5	18.36	8.2	0.9

x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD * hematoxilina y eosina, [^] verde metil pironina, * número de células ó estructuras por campo, % porcentaje de células. LIE: Linfocitos intraepiteliales, PALS: Manguito linfático periarteriolar (Periarteriolar lymphatic sheath), GLMP: ganglio linfático mesentérico posterior

Se presentan los siguientes datos por grupo experimental : promedios, desviación estandard y resultados del análisis estadístico (prueba de Mann-Whitney), de cada estructura y tejido revisado por la técnica de hematoxilina y eosina y verde metil pironina.

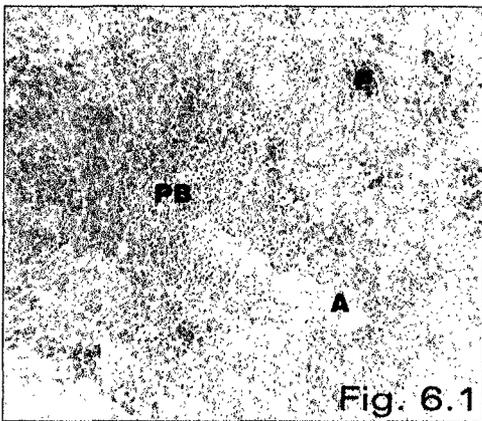


Fig. 6.1 Bazo de lechón teñido con H y E , se observa la Pulpa blanca (PB) y la arteriola central (A) y un foco de células plasmáticas (P). 100 aumentos.

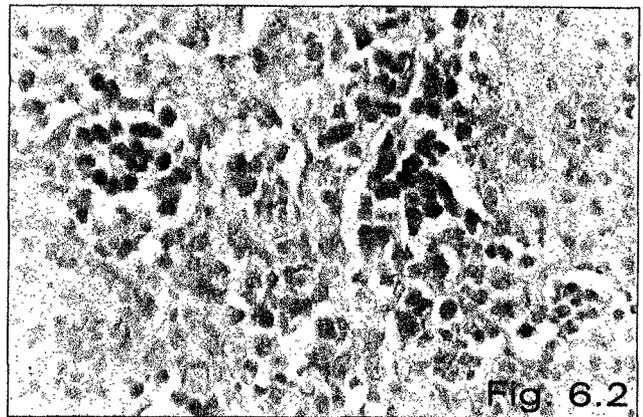


Fig. 6.2 Bazo teñido con H y E se observa un acercamiento del foco de células plasmáticas (P) 400 aumentos.

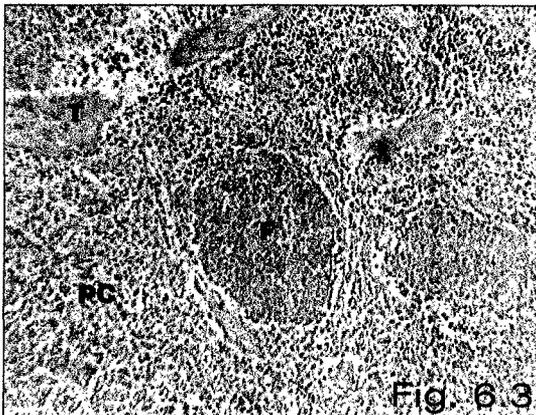


Fig. 6.3 Ganglio linfático mesentérico posterior teñido con H y E se observan trabéculas (T), Folículos (F) y región paracortical (PC). 100 aumentos.

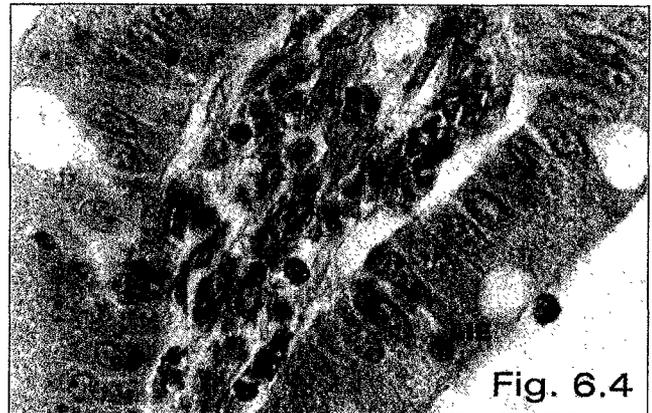


Fig 6.4 Vellosidad de duodeno teñido con H y E, se observa la lámina propia (LP) y el epitelio y entre este los linfocitos intraepiteliales (LIE). 400 aumentos.

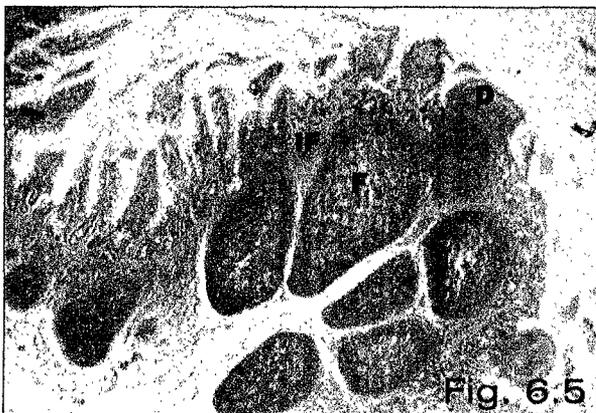


Fig. 6.5 Placa de Peyer teñida con H y E, se observan los folículos (F), áreas interfolliculares (IF) y de domo (D). 40 aumentos.

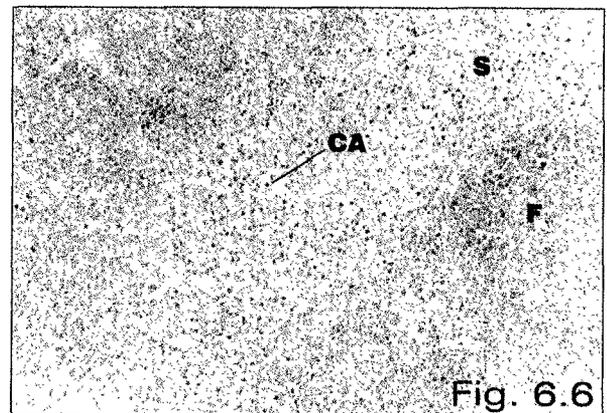


Fig.6.6 Ganglio linfático mesentérico posterior teñido con VMP, las células activadas (CA) se tiñen de color rojo y se localizan en los senos linfoides (S) alrededor de los folículos (F). 100 aumentos.

6.3 DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO POR TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

6.3.1 DETERMINACION DE LINFOCITOS B POR INMUNOLFLUORESCENCIA DIRECTA DE CELULAS LINFOIDES DE GANGLIO MESENERICO POSTERIOR

En células extraídas del ganglio se detectaron aquellas que portaban en su superficie Ig, usando un anticuerpo policlonal antigammablobulina de cerdo fluoresceínado y se reportaron en porcentaje, no existió diferencia entre el grupo de lechones testigos y el grupo colonizado con el probiótico, los resultados están en el cuadro 6.13.

CUADRO 6.13
Determinación de linfocitos B en
Ganglio Linfático Mesentérico Posterior.
(Inmunofluorescencia Directa)

TESTIGOS		COLONIZADOS	
lechón	%	lechón	%
3	63	4	67
5	75	6	77
7	75	8	82
9	62	10	64
x	68.75	x	72.5
s	7.22	s	8.4

n= 4 testigos y 4 colonizados x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se muestran los porcentajes por individuo de células linfoides procedentes de ganglio linfático mesentérico posterior positivas a un policlonal antigammaglobulina de cerdo fluoresceínado.

6.3.2 DETERMINACION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO POR LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA

En ganglio linfático mesentérico posterior (GLMP) se encontró que los linfocitos de la región paracortical son CD2⁺CD4⁻CD8⁻ (fig. 6.9 y 6.10). No se observaron diferencias entre los grupos experimentales, los resultados se pueden revisar en el cuadro 6.14.

CUADRO 6.14

Determinación de áreas CD2⁺ en el manguito perivascular del bazo y en la paracorteza de ganglio linfático.

TESTIGOS			COLONIZADOS		
lechón	PALS (bazo) micras ²	PARACORTEZA (ganglio) micras ²	lechón	PALS (bazo) micras ²	PARACORTEZA (ganglio) micras ²
1	5 971	111 959	2	15 323	140 067
3	11 499	95 290	4	17 760	111 959
5	8 316	53 211	6	17 608	91 080
7	13 639	102 904	8	13 291	171 886
9	12 509	113 087	10	16 731	149 655
x	10 387	95 290	x	16 142	132 929
s	3165	24 613	s	1 865	31 778

n= 5 testigos y 5 colonizados . x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD PALS: (manguito linfático perivascular) periarteriolar lymphatic sheath

Se muestran las áreas promedio positivas al marcador CD2, resultado del conteo en 10 campos en el bazo y la región paracortical del ganglio linfático mesentérico posterior de lechones testigos y lechones colonizados; utilizando la técnica de inmunoperoxidasa.

En bazo se observaron zonas CD2⁺CD4⁻CD8⁻, alrededor de las arteriolas, que corresponden al manguito periarteriolar (fig. 6.7 y 6.8), estos datos se están en micras² y se pueden ver en el cuadro 7.14. La diferencia entre el grupo de animales testigo y los animales colonizados resultó significativa con una p= 0.01.

En duodeno y yeyuno se cuantificaron los linfocitos positivos por mm² a los marcadores CD2, CD4 y CD8, bajo el epitelio de las vellosidades y antes de llegar a las criptas (fig. 6.16 y 6.17), los resultados se pueden observar en los cuadros 6.15 y 6.16.

También se cuantificaron los linfocitos por mm² CD2, CD4 y CD8 positivos localizados entre los enterocitos del epitelio intestinal (LIE) de duodeno, yeyuno e íleon en todos los animales y en las tres porciones de intestino delgado los LIE son solo CD2⁺, los resultados están en el cuadro 6.17.

CUADRO 6.15

Determinación de linfocitos CD2+, CD4+ y CD8+ en lámina propia de duodeno

TESTIGOS			COLONIZADOS				
lechón	CD2 linfocitos/mm ²	CD4 linfocitos/mm ²	CD8 linfocitos/mm ²	lechón	CD2 linfocitos/mm ²	CD4 linfocitos/mm ²	CD8 linfocitos/mm ²
1	1 700	0	0	2	5 300	0	2 200
3	2 600	2 500	1 700	4	2 300	0	0
5	2 500	1 300	2 000	6	13 000	7 200	2 800
7	3 400	1 800	0	8	5 600	0	0
9	4 800	2 500	518	10	4 100	1 500	0
x	3 000	1 620	843	x	6 060	1 740	1 000
s	1 172	1 037	948	s	4 090	3 120	1 385

n= 5 testigos y 5 colonizados. x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se presentan los promedios obtenidos por el conteo de células positivas a los marcadores CD2, CD4, y CD8 en 10 campos en lámina propia de duodeno usando la técnica de inmunoperoxidasa

CUADRO 6.16

Determinación de linfocitos CD2+, CD4+ y CD8+ en lámina propia de yeyuno

TESTIGOS			COLONIZADOS				
lechón	CD2 linfocitos/mm ²	CD4 linfocitos/mm ²	CD8 linfocitos/mm ²	lechón	CD2 linfocitos/mm ²	CD4 linfocitos/mm ²	CD8 linfocitos/mm ²
1	2 400	1 800	0	2	9 900	0	6600
3	9 800	0	0	4	5 200	0	0
5	3 400	2 900	2 500	6	3 500	3400	3000
7	1 500	0	0	8	11 200	5300	0
9	4 000	1 500	0	10	8 000	2300	0
x	4 220	1 240	500	x	7 560	2 200	1 920
s	3 262	1 246	1 118	s	3 200	2 277	2 920

n= 5 testigos y 5 colonizados. x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se muestran los resultados promedio obtenidos del conteo de células positivas a los marcadores CD2, CD4, y CD8 en 10 campos en lámina propia de yeyuno usando la técnica de inmunoperoxidasa

CUADRO 6.17

Linfocitos intraepiteliales CD2+ en duodeno, yeyuno e íleon

TESTIGOS				COLONIZADOS			
lechón	DUODENO linfocitos /mm ²	YEYUNO linfocitos/mm ²	ILEON linfocitos/mm ²	lechón	DUODENO linfocitos/mm ²	YEYUNO linfocitos/mm ²	ILEON linfocitos/mm ²
1	ND	0	0	2	2 200	0	2000
3	691	586	714	4	300	1 600	364
5	327	1600	0	6	3 000	336	478
7	220	955	0	8	1 600	2 100	0
9	1400	714	535	10	300	1 633	1400
x	659	771	249	x	1 480	1133	710
s	533	581	347	s	1 186	911	883

n= 5 testigos y 5 colonizados. x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD

Se muestran los promedios de linfocitos por mm² positivos al marcador CD2 obtenidos del conteo en 10 campos en epitelio de duodeno, yeyuno e íleon usando la técnica de inmunoperoxidasa.

El área interfolicular de la PP (Fig. 6.11 y 6.12) y los linfocitos de lámina propia de íleon, son CD2+, CD4-CD8-, sin embargo en el centro de los folículos de la PP (Fig. 6.14 y 6.15), y bajo el domo (Fig. 6.13) se observaron células positivas a CD4 que no expresaron CD2, ni CD8. Los datos de las áreas interfoliculares están en micras² y se localizan en el cuadro 6.19 los resultados del conteo en la lámina propia, la zona bajo en domo y el centro de los folículos están expresados en células/mm² y pueden revisarse en el cuadro 6.19

CUADRO 6.18

Determinación de subpoblaciones de linfocitos en áreas interfolliculares, lámina propia, domos y folículos en íleon

TESTIGOS				COLONIZADOS			
lechón	LP CD2+ linfocitos/mm ²	DOMOS FOLICULOS CD2-CD4+CD8- linfocitos/mm ²	AREAS INTERFO- LICULARES CD2+CD4-CD8- MICRAS ²	lechón	LP CD2+ linfocitos/ mm ²	DOMOS FOLICULOS CD2-CD4+CD8- linfocitos/mm ²	AREAS INTERFO- LICULARES CD2+CD4-CD8- MICRAS ²
1	1500	0	296 373	2	4800	0	570 621
3	1600	929	149 983	4	788	1100	249 590
5	354	0	316 710	6	2300	1500	208 315
7	939	0	166 828	8	680	832	161 185
9	244	396	177 078	10	2 200	364	436 811
x	927	265	221 394	x	2 153	759	325 304
s	677	409	78 657	s	1 663	592	172 458

n= 5 testigos y 5 colonizados. x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDAR

Se muestran los promedios de linfocitos por mm² positivos a los marcadores CD2, CD4 y CD8 en lámina propia (LP), domos y folículos de íleon así como de las áreas promedio en micras² de las regiones interfolliculares de este mismo órgano usando la técnica de inmunoperoxidasa.

CUADRO 6.19

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE CELULAS B Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO POR TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

ESTRUCTURA	ORGANO	GRUPO EXPERIMENTAL				
		TESTIGOS		COLONIZADOS		
		x	s	x	s	p
linfocitos B [%]	GLMP	68.75	7.22	72.5	8.4	0.2
PALS CD2 ^{+ μ}	bazo	10 387	3165	16 142	1865	0.01
paracorteza CD2 ^{+ μ}	GLMP	95 260	24 613	132 929	31 778	0.09
linfocitos CD2 ^{+ m}	duodeno l.p.	3 000	1172	6 060	4 090	0.11
linfocitos CD4 ^{+ m}	duodeno l.p.	1 620	1 037	1 740	3 120	0.4
linfocitos CD8 ^{+ m}	duodeno l.p.	843	948	1 000	1 385	0.9
linfocitos CD2 ^{+ m}	yeyuno l.p.	4 220	3 262	7 560	3 200	0.07
linfocitos CD4 ^{+ m}	yeyuno l.p.	1 240	1 246	2 200	2 277	0.46
linfocitos CD8 ^{+ m}	yeyuno l.p.	500	1 118	1 920	2 920	0.46
linfocitos CD2 ^{+ m}	íleon l.p.	927	627	2 153	1 663	0.1
LIE CD2 ^{+ m}	duodeno	659	533	1 480	1 186	0.17
LIE CD2 ^{+ m}	yeyuno	771	581	1 133	911	0.53
LIE CD2 ^{+ m}	íleon	249	347	710	883	0.29
áreas ^μ interfoliculares CD2 ⁺	íleon	221 394	78 658	325 304	172 458	0.34
CD2 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ^{+ m} bajo el domo	íleon	265	408	759	592	0.2

x= PROMEDIO s= DESVIACIÓN ESTANDARD %: porcentaje de células, ^μ: micras², ^m: linfocitos por mm². l.p.: lámina propia, LIE: linfocitos intraepiteliales, GLMP: ganglio linfático mesénterico posterior, PALS: periarteriolar lymphatic sheath (manguito linfocitario perivasculares).

Se presentan los siguientes datos por grupo experimental: promedios, desviación estandar y resultados del análisis estadístico (prueba de Mann-Whitney), de cada estructura y tejido obtenidos por la técnica de inmunoperoxidasa.

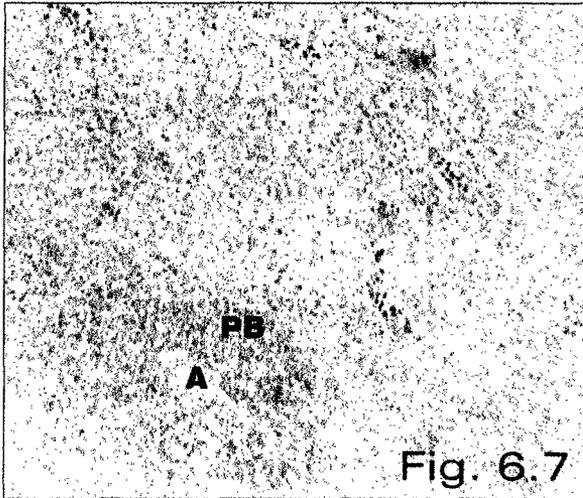


Fig. 6.7 Bazo testigo de tinción (immunoperoxidasa), se observa la pulpa blanca (PB) y la arteriola central (A). 100 aumentos.



Fig. 6.8 Bazo teñido con inmunoperoxidasa, se observan las arteriolas centrales (A). Las áreas CD2+ están coloreadas de un tono café dorado. 100 aumentos.

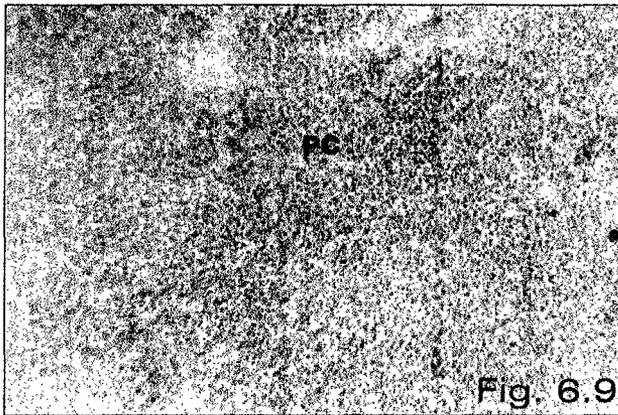


Fig. 6.9 GLMP testigo de tinción (immunoperoxidasa), se observa la región paracortical. 100 aumentos.

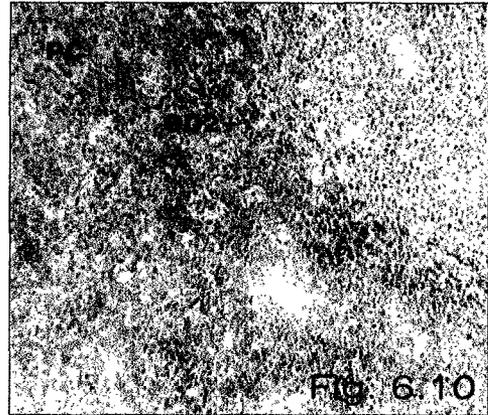


Fig. 6.10 GLMP teñido con la técnica de inmunoperoxidasa se observa el área paracortical (PC) CD2+. 100 aumentos.

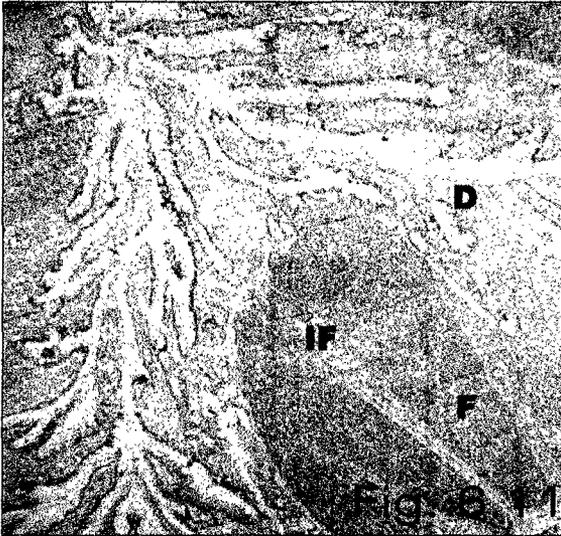


Fig. 6.11 Ileon (placa de Peyer) testigo de tinción (inmunoperoxidasa), se observan las áreas interfolliculares (IF), Folículos (F) y regiones de domo (D). 40 aumentos.

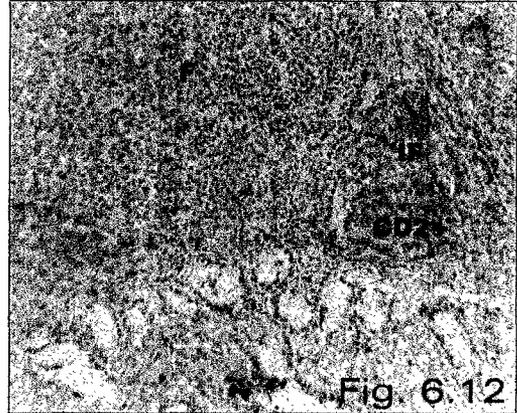


Fig. 6.12 Ileon (placa de Peyer) teñido por la técnica de inmunoperoxidasa, las áreas interfolliculares son intensamente positivas (CD2+), también se observa un folículo (F). 100 aumentos.

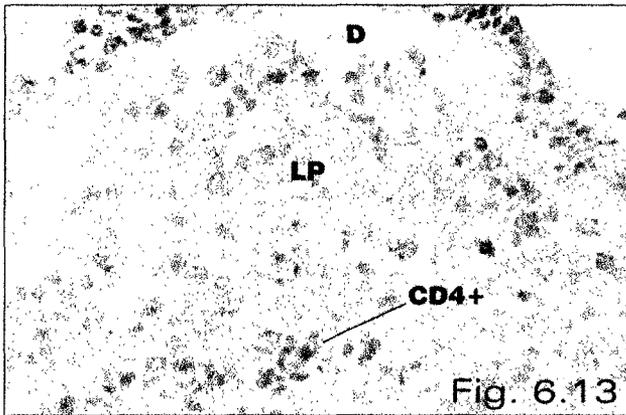


Fig. 6.13 Acercamiento de la región de domo (D) se observan células positivas a CD4 en la lámina propia (LP). 400 aumentos.



Fig. 6.14 Acercamiento de los folículos (F) en la placa de Peyer, teñido por la técnica de inmunoperoxidasa, se observan células positivas a CD4 en el centro de los folículos (F). 100 aumentos.

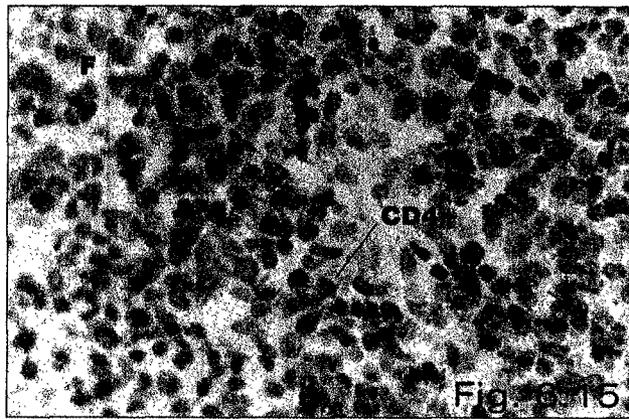


Fig. 6.15 Acercamiento del centro folicular (F), de una placa de Peyer teñida con la técnica de inmunoperoxidasa, se observan las células positivas a CD4. 400 aumentos.

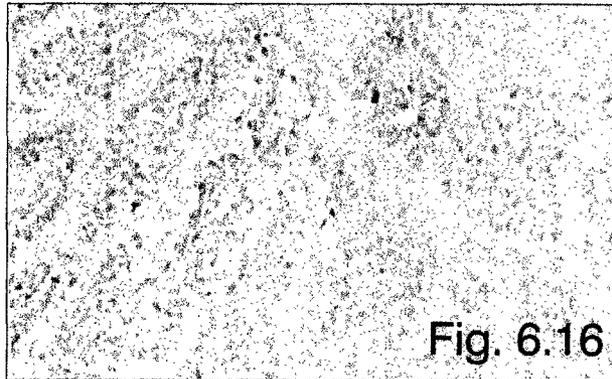


Fig. 6.16 Acercamiento de una vellosidad de yeyuno, testigo negativo de la tinción de inmunoperoxidasa 320 aumentos.

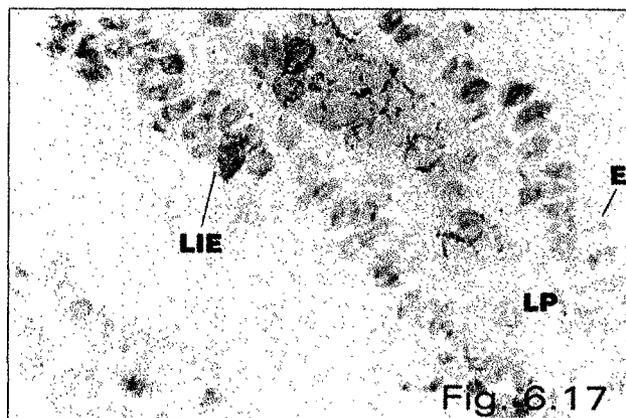


Fig. 6.17 Acercamiento de una vellosidad de yeyuno teñida con la técnica de inmunoperoxidasa, se observan células positivas a CD2 en la lámina propia (LP) y entre los enterocitos (E) a estas células se les conoce como linfocitos intraepiteliales (LIE). 400 aumentos.

7. DISCUSION

7.1 DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN SANGRE PERIFÉRICA

7.1.1 Determinación de linfocitos T y B por medio de la formación de rosetas E y EAC.

Los valores de linfocitos T medidos por rosetas E que presentaron los animales en este experimento fueron muy bajos, comparados con los hallazgos de otros autores que han reportado a los 10 y 20 días de nacidos porcentajes de linfocitos T medidos por rosetas E de 61.8 y 66.1 \pm 2.2 (McCauley and Hartmann, 1984), aunque estos autores utilizan un método modificado, donde cuando mezclan los linfocitos con los eritrocitos de carnero al 1% además agregan dextran, que según sus observaciones aumenta la estabilidad de las rosetas durante la centrifugación. En otro estudio en animales de 30 días de edad reportan valores de 54.6% con un rango de 29 a 59% (Jarosková and Kováru, 1978). Estos rangos tan amplios demuestran las variaciones que se dan por las diferencias de raza, sexo y medio ambiente como lo han demostrado otros autores (Bushman and Meyer) quienes observaron que estos factores afectan estos parámetros, principalmente el sexo del animal y los cambios de estación. El porcentaje de rosetas E en cerdos de 8-12 semanas, tiene un índice de repetibilidad de 0.56.

Existen muchos factores que rodean al animal que no han sido evaluados, no se sabe que características se están fijando en el animal conjuntamente con las características productivas que el porcicultor selecciona, es decir, probablemente al seleccionar una característica positiva en cuanto a producción inadvertidamente se estén seleccionado características negativas en cuanto al desempeño del sistema inmune. Las razas que los otros autores han estudiado no existen en México, más aún las condiciones de macroclima y microclima no pueden compararse y en vista de que en este parámetro inciden este tipo de factores, es difícil decidir si los animales de este experimento se comportaron de manera normal, tampoco se puede afirmar con este pequeño número de animales que la administración del probiótico puede repercutir en el aumento de linfocitos T en sangre periférica. Sin embargo puede servir de base para estudios posteriores donde se podría aumentar el número de animales experimentales.

En otras investigaciones han determinado el porcentaje de linfocitos B, a los 5 y 20 días de nacidos y obtuvieron 7.7% y 14.1% (McCauley and Hartmann, 1984 "B") y a los 30 días de edad, reportaron un promedio de 15.6% con un rango de 6 a 21% utilizando métodos como: detección de Ig de superficie con sueros anti-cadenas ligeras ó pesadas (Jarosková and Kováru, 1978) y otro

investigador (McCauley and Hartmann, 1984), los calculó a partir de linfocitos totales y obtuvo en animales adultos un porcentaje de 15.6 ± 2.3 , sin embargo han reportado índices de repetibilidad para estas técnicas es tan solo 0.11 y 0.19 (Bushman and Meyer). Los resultados promedio de linfocitos B, aquí obtenidos son mucho mayores (25% para los testigos y 35% para los colonizados) que los establecidos para animales adultos sin embargo, hay que tomar en cuenta que la metodología empleada por estos autores es diferente a la de el presente estudio, además de las variaciones individuales. Por todo lo anterior se necesita aumentar el número de animales.

7.1.2 Determinación de linfocitos B y de subpoblaciones(CD2+, CD4+ y CD8+) de linfocitos T en sangre periférica utilizando el citómetro de flujo

A) Generalidades del citómetro de flujo. El uso de este aparato es muy útil pues nos permite detectar células marcadas con un fluorocromo unido de modo directo ó indirecto a anticuerpos monoclonales dirigidos a las moléculas de nuestro interés. Sin embargo su manejo y utilización resulta muy delicado. Durante el desarrollo de este trabajo se presentaron inconvenientes principalmente con el software y con el manejo de los anticuerpos monoclonales que son moléculas muy sensibles a cambios fisicoquímicos, gracias a estos problemas algunos animales aparecen con la leyenda ND, que indica no determinado.

B) Regiones H y G de linfocitos. En el presente trabajo en el estudio por citometría de flujo se observaron varios animales (4 testigos y 2 colonizados) con dos regiones de linfocitos que difieren en tamaño y granulaciones intracitoplasmáticas. Al primero se le denominó **región H**, (también se le llamó **región HG**) esta región abarcó la misma área de condensación de células que se ha definido para los linfocitos humanos, son células de tamaño intermedio y con granulaciones escasas; estos mismos animales presentaron simultáneamente otra región localizada hacia la parte superior de la gráfica de *dot plot* o de *contour plot*, lo que indica mayor granularidad y mayor tamaño, a esta región se le denominó **región G**. Otro grupo de animales (3 testigos y 5 colonizados) presentaron solo una región de linfocitos localizada muy cerca del eje de las X pero alejada del eje de las ordenadas, localización que corresponde con el tamaño y granularidad de los linfocitos humanos, es decir es la misma localización que la ya descrita para los lechones que presentaron dos regiones (región H), para distinguirla de la otra región se le llamó **HU**.

Se puede suponer que la diferencia en tamaño y granularidad que presentaron los linfocitos se deba a que son células que están en diferentes etapas del ciclo celular, probablemente los linfocitos mas grandes correspondan a blastos, en migración hacia otros sitio inmunológicos. Los linfocitos de la región HU o HG, tienen el tamaño y granularidad semejantes a los linfocitos de humanos adultos, es decir podrían ser células que han finalizado su diferenciación. Sin embargo no hay diferencia entre los marcadores que portan en

su superficie, y no se pudo establecer diferencia con el reducido número de anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo. La aparición de diferentes regiones de linfocitos en lechones de 15 días de edad no había sido reportada anteriormente, existe escasa información de los niveles normales de las distintas subpoblaciones de linfocitos T de cerdos de esta edad en animales en condiciones convencionales en nuestro país. Solo resta resaltar que un mayor número de animales colonizados (5 lechones colonizados y 3 testigos) presentaron región HU y menos animales colonizados presentaron región H2 y G (2 colonizados y 4 testigos).

B) Linfocitos T CD2+. En estudios donde utilizaron el mismo anticuerpo monoclonal, en sangre periférica, en lechones sanos a los 15 días, de vida obtuvieron datos muy variados (Hammerberg, 1989), por inmunohistoquímica desde 16% hasta 62% y por citometría de flujo desde 15% hasta un 40%. En cerdos libres de patógenos específicos (specific pathogen free /SPF) de una semana de edad el porcentaje de linfocitos CD2+ fue de $37\% \pm 9$ y a las 4 semanas fue de $49\% \pm 9$ (Joling et al., 1994). Los porcentajes de linfocitos CD2+ en los lechones de ambos grupos son mucho más altos que los presentados por otros autores, aunque los resultados más bajos si se acercan a los valores presentados por estos investigadores. Aparentemente en los linfocitos CD2+ de la región HG y G de los lechones colonizados superan en porcentaje a los de los animales testigo, pero solo dos animales de cada grupo que presentaron esta región se pudieron comparar, por lo que no es posible sacar una conclusión. Las diferencias de los resultados entre los diversos estudios y entre los animales individuales pueden ser atribuidas a la raza, sexo, condiciones climáticas y de manejo, además de la sensibilidad del equipo y la técnica empleada.

C) Linfocitos T CD4+. Los resultados de otros trabajos, en lechones de 15 días de edad y utilizando el mismo monoclonal (Hammerberg, 1989) indican un porcentaje de linfocitos T CD4+ desde 15 hasta 45 por inmunohistoquímica y midiéndolos por citometría de flujo desde 10 a 24%, las diferencias individuales son de nuevo muy amplias. A la semana de edad en cerdos SPF, encontraron $29\% \pm 19$ de linfocitos positivos a este marcador (Joling et al., 1994).

Los resultados aquí presentados en ambos grupos corresponden con los rangos manejados por otros autores a excepción de que no hay reportes de que los cerdos a esta edad tengan niveles tan bajos de linfocitos CD4+ ó su ausencia total. Probablemente por que no han sido realizados en condiciones de campo como las que predominan en nuestro país. Esta deficiencia tan severa en linfocitos T cooperadores podría redundar en una deficiente producción de células efectoras y por lo tanto una respuesta inmune específica poco eficiente, estos animales deben tener un sistema inmune inespecífico muy fuerte que les permita enfrentar a los microorganismos potencialmente patógenos, evitando su penetración, hasta que el sistema inmune del lechón este maduro ó puede ser soslayada por protección proveniente de un buen calostro.

D) Linfocitos T CD8+. En otras investigaciones donde utilizaron la misma clona antiCD8 (Hammerberg, 1989), los niveles de linfocitos citotóxicos van desde 8% hasta 39% detectados por inmunohistoquímica y por citometría de flujo desde 4 hasta 34% \pm 14. En otra investigación usaron el anticuerpo monoclonal 295/33 y animales de una semana de edad tuvieron 15% \pm 5 de linfocitos CD8 positivos, y a la semana 40 un 28% \pm 11 (Joling et al., 1994), es claro que este monoclonal no tiene la misma especificidad que el utilizado en este estudio (clona 76-2-11) en otros estudios y en la presente investigación. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran porcentajes mayores en los animales colonizados con el probiótico, pero sin valor estadístico, que debe ser comprobarse aumentando el número de animales experimentales.

En los animales de este trabajo en general mostraron mayor número de linfocitos CD2+ de linfocitos CD8+ y deficiencias en lo que respecta a los linfocitos cooperadores CD4+, en sangre periférica, comparados con los valores obtenidos por otros autores. Además es necesario investigar la importancia biológica que puede tener la presencia ó ausencia de dos tamaños de linfocitos, perfectamente distinguibles. Podría ser que los resultados aquí expuestos reflejen el comportamiento normal de cerdos de esta edad criados en forma convencional con las condiciones que prevalecen en México y que en esta especie afectan enormemente.

E) Linfocitos B. Estudios en cerdos a los 5 días de nacidos y a los 20 días y muestran niveles de linfocitos B de 7.7% y 14.1% respectivamente (McCauley and Hartmann, 1984). A los 30 días de edad, (Jarosková and Kováru, 1978) reportaron un promedio de 15.6% con un rango de 6-21% utilizando detección de Ig de superficie por otros métodos, estos valores son similares a los hallados en la mayoría de los animales en este estudio; a excepción de un animal testigo en la región G, excede este nivel, pero coincide con lo reportado para linfocitos B grandes (McCauley and Hartmann, 1984), sin embargo los otros valores de linfocitos de esta región no se semejan a los resultados de estos investigadores.

Es necesario señalar las diferencias en los valores obtenidos para linfocitos B de sangre periférica, dependiendo de la técnica usada, aunque no son los mismos animales, pues como se señaló en la metodología se formo un segundo grupo experimental el cual se colonizó y solo se le extrajo sangre periférica para los estudios por citometría de flujo, pero no se le determinaron valores de linfocitos T y B por rosetas. Los valores obtenidos por rosetas EAC no se comparan con los obtenidos por la citometría de flujo, los valores de las rosetas EAC se mantuvieron dentro de un rango más estrecho, no así los de la citometría. En la técnica de rosetas EAC, los linfocitos se reconocen por que tienen receptor para la fracción Fc de los anticuerpos y para el C3b, que llevan los glóbulos rojos de carnero sensibilizados, en cambio el policlonal antigammaglobulina de cerdo, reconoce a la inmunoglobulina que los linfocitos B portan en su superficie y no solo eso, el anticuerpo policlonal reconoce muchos epitopos de los diversos anticuerpos que se localicen sobre la membrana de los

linfocitos B; esto podría explicar el porque los valores aquí reportados son más altos y no son equiparables con los valores obtenidos por las rosetas EAC

F) Linfocitos nulos y dobles negativos. En cerdos SPF de una semana los valores determinados para los linfocitos nulos es de $48\% \pm 19$ y a la semana 40 de vida es de $17\% \pm 10$ (Joling et al., 1994); en el actual experimento hay animales que se acercan a estos resultados pero hay otros que tienen valores mucho mayores ó en el otro extremo menores a valores establecidos para los cerdos de 40 semanas, por lo que es difícil establecer una tendencia, parece ser que los linfocitos en la región H2 de los animales colonizados sí tienen valores menores comparados con los animales testigos en las mismas condiciones. En los linfocitos de la región G no hay diferencias entre los dos grupos de animales y los linfocitos de los animales testigo de la región H1 tienen valores tan extremos que no es posible vislumbrar diferencia.

En una investigación en cerdos de 6-7 meses de edad donde se determinaron los linfocitos dobles positivos (DP), usando los mismos anticuerpos monoclonales, y citometría de flujo de doble color, obtuvieron los siguientes resultados: los linfocitos CD4+CD8- con un $17\% \pm 2$, los linfocitos CD4-CD8+ con un $30\% \pm 4$, y los linfocitos dobles positivos con un $12\% \pm 1$ (Zuckermann and Gaskins, 1996), que aumentan gradualmente hasta 30-55% a los 3 meses de edad (Zuckermann and Husmann, 1996).

En los linfocitos de la población HU, hay una diferencia muy evidente entre los animales testigos y los lechones colonizados con el probiótico, no tienen linfocitos dobles negativos, al contrario, presentan cierta cantidad de linfocitos dobles positivos (6.6% y 8.5%), es decir que el resultado de la suma de los linfocitos T CD4+ y CD8+ es mayor a la cantidad de linfocitos CD2+, lo que no ocurre en ningún individuo testigo de este grupo de animales. Los valores para los dobles negativos son muy similares en los linfocitos de la región G entre los lechones testigos y los colonizados, pero en la región HG un lechón testigo tiene también dobles positivos (24.3%), pero el otro animal testigo de ese grupo tiene valores muy elevados de linfocitos dobles negativos (67.3%); por lo que este resultado probablemente se deba a una respuesta individual más que a un comportamiento de grupo. Este hallazgo resulta muy importante y trascendente, significa que los animales que trabajamos no siguen un comportamiento uniforme, unos responden de un modo que semeja al de los adultos y otros por el contrario a animales de menor edad a la que cronológicamente tienen. Los linfocitos dobles positivos se cree que representan linfocitos en reposo que adquirieron el CD8, posteriormente a una activación y que lo han conservado. Todos los animales estuvieron bajo las mismas condiciones y se enfrentaron con los antígenos propios de la granja en igual medida, eran de esperarse niveles de activación semejantes. Sin embargo la detección de linfocitos dobles negativos y dobles positivos calculándolos no es muy precisa, y se requiere para comprobar estos resultados realizar dobles tinciones de linfocitos de la sangre periférica.

Para finalizar con lo que respecta a los resultados obtenidos en sangre periférica por citometría de flujo, hay que mencionar que en los animales testigos

de 7 individuos que se trabajaron 4 presentaron dos regiones de condensación de linfocitos en el *dot plot* del citómetro y de los 7 colonizados solo 2 mostraron este mismo patrón. La diferencia que se encuentra en los marcadores de estas regiones es que la región de linfocitos pequeños poco granulares tiene menor cantidad de linfocitos B en ambos grupos de animales pero en los lechones colonizados en esta región se hallan los dobles positivos, en los demás marcadores los datos varían demasiado y no se ve ninguna disposición especial que hiciera pensar en otro tipo celular, parece ser que estas regiones representan solamente a linfocitos en diferentes estadio, el significado biológico de su presencia en unos animales y en otros no, aun quedará sin respuesta, pues con el escaso número de marcadores que aquí se manejaron no se puede aclarar.

Las diferencias con los resultados obtenidos por otros autores como ya se mencionó pueden deberse a múltiples causas intrínsecas del animal, ó del medio que lo rodea; pero también pueden deberse a la técnica, en este trabajo, los linfocitos se purificaron, sedimentando los glóbulos rojos y luego el líquido rico en leucocitos se separa usando Ficoll-hypaque con una densidad 1.017, este es un factor relativamente común en las otras investigaciones, pero en ninguna mencionan que separen a los macrófagos adicionando hierro coloidal, para que estos lo fagociten y sean retirados por atracción con un imán, puede ser posible que al realizar esta operación se retiren (por efecto mecánico) algunos linfocitos y haga variar los resultados. Otro problema de esta técnica es la fluorescencia inespecífica que presentan los linfocitos de los lechones y que en muchos casos puede ocultar a linfocitos positivos ó al contrario elevar el porcentaje de células fluorescentes; otra fuente de variación son los monoclonales: el método de obtención, concentración y el manejo que se les da, pueden alterar su sensibilidad. En este trabajo no se utilizaron anticuerpos monoclonales comerciales sino, los sobrenadantes de las clonas respectivas.

En suma no hay evidencia significativa de que el probiótico afecte las poblaciones de linfocitos T y B en sangre periférica, solo tenemos algunas tendencias que será necesario comprobar; es posible realizar dobles tinciones de linfocitos de sangre periférica especialmente en animales colonizados que reciban un desafío con una antígeno que estimule una respuesta específica y el efecto del probiótico pueda ser más evidente, así como aumentar el número de animales en experimentación ó el número de muestreos.

7.2 ESTUDIO HISTOLOGICO DE TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO

7.2.1 Determinación de estructuras histológicas relacionadas con el desarrollo del sistema inmune por medio de la técnica de hematoxilina y eosina

Se encontraron focos de células identificadas como plasmáticas entre la pulpa roja del bazo, el número de estas células por campo es significativamente mayor en los individuos que se colonizaron con la mezcla probiótica. Esta localización es indicativa de que ha habido activación en otros niveles del sistema inmune, y los linfoblastos han migrado a este órgano, para terminar su maduración y redistribuirse. Este hallazgo apoya la hipótesis de que el probiótico incrementa la capacidad inmune del lechón y concuerda con el hallazgo de la inmunohistoquímica, donde se propone que se ha estimulado el tráfico de linfocitos vírgenes, pero también, como lo demuestran estos resultados puede influir en la activación en sitios inductores como placa de Peyer y su posterior migración al bazo por ello aparecen en mayor cantidad.

En las tres porciones de intestino delgado se buscaron células plasmáticas en las criptas, solo se encontraron en cantidad apreciable en el duodeno. El número de células por campo fue mayor en los animales colonizados, pero sin significancia estadística. Otros autores ya han mencionado que a esta edad es el sitio donde se hallan la mayor cantidad de estas células.

Se examinaron los LIE, y el único sitio donde los resultados son significativos es en el duodeno ($P= 0.02$), donde los animales colonizados tuvieron valores promedio de 15%, mientras los animales testigo su promedio fue de 11%, que es un valor similar al encontrado en cerdos de 5 días de nacidos provenientes de camadas convencionales, el valor de obtenido en los animales colonizados es semejante al encontrado en lechones de 15 días de edad (Redman et al., 1979). Según este autor los LIE decrecen en número hacia el intestino distal, hecho que se corroboró en el presente estudio. Los porcentajes aquí obtenidos para LIE en yeyuno e íleon son equivalentes a los encontrados por este autor para animales de 5 días, es decir que en ese aspecto, los lechones de este estudio muestran un desarrollo menor, a los animales de esa investigación, nuevamente se debe a las diferencias entre razas y condiciones de vida del animal.

La función de los LIE aún esta en investigación, se sabe que tienen funciones de reconocimiento de antígeno e inmunoregulación, también reflejan el grado de estimulación antigénica y en ratones se sabe que los LIE migran del epitelio a la lámina propia y viceversa. Es de gran importancia que se encuentren elevadas por influencia de la flora que se les impuso a los animales. Es notorio que con técnicas de inmunohistoquímica no se haya detectado este aumento, probablemente fue por que se utilizaron un número muy reducido de anticuerpos monoclonales, estos LIE deben tener otros marcadores de superficie.

7.2.2 Determinación de células activadas en tejido linfoide e intestino por medio de la técnica verde metil pironina

Con esta técnica se tiñen aquellas células que tienen grandes cantidades de RNA, por ello se considera que las células positivas corresponden a las células plasmáticas ó a linfocitos activados que están en un proceso de síntesis muy intensa. Los resultados en obtenidos todos los órganos revisados no indican ninguna diferencia, ambos grupos de animales se comportaron relativamente igual, solamente en el GLMP, en los senos subcapsulares y hacia la médula, se observaron mayor número de células activadas en los lechones colonizados con el probiótico con una significancia estadística ($P= 0.01$). Estas células podrían ser células activadas migrando hacia otros tejidos. Pues claramente corresponden con el sitio donde se localizan las células plasmáticas ó de memoria generadas durante la reacción de centro germinal . Aunque desconocemos el fenotipo de estas células, se puede proponer que son células que han recibido algún tipo de estímulo, lo que significa que los lechones colonizados con el probiótico experimental, tienen una mayor capacidad de convocatoria ó de producción de células activadas.

7.3 DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN TEJIDO LINFOIDE E INTESTINO POR TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

7.3.1 Determinación de linfocitos B por inmunofluorescencia directa en células linfoides de GLMP

Los animales colonizados parecen presentar mayor cantidad de linfocitos B pero sin importancia estadística. Los resultados de cualquiera de los animales, son demasiado altos. Otros autores (Jaroskova and Kovarú, 1978), encontraron en lechones de 30 días un 23.3% de linfocitos B en ganglio, utilizando anticuerpos anti-cadena ligera y 125 I, en el presente experimento el resultado más bajo fue de 62%. Esta gran cantidad de células que reconocieron al anticuerpo policlonal, pudo deberse a que intervinieron otros mononucleares, que reaccionaron con la fracción Fc de los anticuerpos fluoresceinados, también pudieron fagocitar al anticuerpo policlonal. En esta técnica las células linfoides del GLMP se separan únicamente por medios mecánicos, por ello quizá muchos mononucleares interfieran con los resultados; aunque durante la lectura se eliminaron células fluorescentes que mostraban morfología sugerente de macrófago.

7.3.2 Determinación de subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfoide e intestino por medio de la técnica inmunoperoxidasa

A)BAZO. En el bazo se observaron grandes áreas CD2+CD4-CD8- alrededor de las arteriolas, en ambos grupos de animales.

En otras investigaciones han detectado linfocitos CD4+ y CD8+ en este órgano, a la semana de edad en cerdos SPF, usando citometría de flujo encontraron un 30% positivos a CD4 y un 9% positivos a CD8 (Joling et al., 1994), otros autores usando también cerdos SPF, a los 15 días de vida observaron por inmunohistoquímica más de 1000 células positivas a CD4 y a CD8 por campo (Biachi et al., 1992), pero no utilizaron el mismo anticuerpo monoclonal para CD8 que en el presente trabajo. Una explicación para esta carencia de linfocitos CD4+ y CD8+ es la propia idiosincrasia del animal y las condiciones de crianza de nuestro país.

Los lechones colonizados tuvieron áreas mayores de manguitos periarteriolas CD2+ (P= 0.01). La diferencia significativa entre los animales colonizados y los testigos es muy sobresaliente y de gran repercusión, pues significa que han aumentado los niveles de recirculación de linfocitos T CD2+ vírgenes que están preparadas para enfrentarse al antígeno que llegue al torrente sanguíneo y mejorar el monitoreo inmunológico.

B) GANGLIO LINFATICO MESENERICO POSTERIOR. En los animales de ambos grupos se observaron áreas de células positivas a CD2 en la paracorteza , no hay diferencias entre los lechones testigos y los colonizados. No se encontraron linfocitos CD4+ ó CD8+, aunque otros autores si los reportan, utilizando inmunohistoquímica observaron más de 1000 células/ campo positivas a estos marcadores (Biachi et al., 1992).

Esta ausencia de linfocitos CD4+ y CD8+ en bazo y GLMP se puede atribuir a una sensibilidad distinta del anticuerpo monoclonal para estos marcadores, a las características propias de los animales ó a factores medio ambientales que estén influyendo en este parámetro, aunque es notorio que corresponde con la deficiencia de CD4 en linfocitos de sangre periférica y bazo

C) DUODENO. Se examinó la lámina propia donde se observaron principalmente linfocitos CD2+, aunque son muy abundantes en los animales colonizados la diferencia no es significativa comparada con los animales testigo. Los linfocitos TCD4+ son menos abundantes que los linfocitos CD2+ y en algunos animales están ausentes, y en un animal colonizado representan más del 50% de los linfocitos CD2+, pero 3 animales colonizados no presentaron linfocitos CD4+, por estas amplias variaciones las diferencias entre ambos grupos de animales no son significativas. En lámina propia de duodeno hubo linfocitos positivos a CD8 con variaciones desde 0 linfocitos/mm² hasta 2800 linfocitos/mm² y no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. Un lechón testigo presenta linfocitos en la lámina propia CD2+CD4-CD8- y dos lechones colonizados

presentan linfocitos en lámina propia con este mismo fenotipo. Es decir que en el duodeno del grupo colonizado parece ser que hay más células inmaduras ó podrían ser linfocitos $\gamma\delta$ que también tienen este fenotipo.

La distribución de los linfocitos concuerda con lo reportado en otros estudios (Vega-López et al., 1995), solo que en este caso estaba más poblada la vellosidad que la cripta.

Se analizaron los linfocitos que se encuentran entre el epitelio de las vellosidades (LIE), en este caso, los linfocitos fueron CD2+ CD4-CD8-, en todos los animales, este hecho es similar a lo encontrado por otros autores que reportan LIE CD2+ ha esta edad y después de la quinta semana de vida se convierten en CD8+ (Vega-López, 1995). No hay diferencia significativa entre los grupos de animales.

D) YEYUNO. Los linfocitos en la lámina propia de yeyuno presentan en su gran mayoría CD2, con mayor frecuencia en los linfocitos de la LP de los animales colonizados, sin embargo la diferencia no alcanza a ser importante. Dos animales testigos son dobles negativos invirtiéndose la tendencia si se compara con el duodeno.

En yeyuno los LIE se comportan como los de duodeno, solo son CD2+, y tampoco se observan diferencias entre los grupos experimentales, aunque son relativamente más abundantes en el yeyuno de los lechones colonizados. Hay un animal de cada grupo que no presenta LIE CD2+, es decir que sus LIE no presentan marcador de célula T, seguramente se trata de células nulas $\gamma\delta$.

E) ILEON. En el análisis de ileon, se encontró que en la lámina propia los linfocitos ahí presentes son CD2+CD4-CD8-, a diferencia de las otras porciones de intestino delgado, donde si hay linfocitos positivos a los tres marcadores para linfocitos T; aunque otros autores reportan entre 100 y 1000 células por campo positivas a CD4, y CD8 (Bianchi et al., 1992).

Los LIE del íleon se comportaron igual que los LIE de el resto del intestino delgado. Si embargo se hace notar están en menor cantidad que el las porciones anteriores de intestino delgado evaluadas en este trabajo.

Se examinaron las poblaciones de linfocitos bajo el epitelio de domo y el centro de los folículos, en esta localización se encontraron células CD2-CD4+CD8- esta población aparentó ser más abundante en los individuos que recibieron el probiótico. Estas células no son linfocitos T, podrían representar células dendríticas (Dc), ya que otros autores han reportado Dc CD4+ en los centros germinales de bazo de ratón (Kelsoe,1996). Bajo el epitelio de domo en otras especies ya se han identificado plenamente estas células, que se encargan de la presentación y almacenamiento de antígeno y modulación de la respuesta inmune.

Se midieron las áreas interfoliculares totales de cada corte de íleon, los resultados no son contundentes pero nos indican que los animales colonizados con el probiótico, presentan en el íleon mayor superficie de áreas T interfoliculares, sitio que es de alta recirculación. Los datos obtenidos por

observaciones inmunohistológicas no son definitivos, pues muestran solo un evento en un determinado momento, las poblaciones linfocitarias no están estáticas, constantemente están recirculando, por ello es difícil determinar el significado de un hallazgo.

En este estudio no se encontraron linfocitos CD8+ en el íleon, otros autores los reportan en suspensiones celulares de placas de Peyer, utilizando otras clonas (Rothkötter and Pabst, 1989), detectan linfocitos T CD4+ y CD8+ y dobles positivos en animales adultos, pero no en cerdos de menos de 5 meses, otro estudio en cerdos de 6-5 meses de edad, determina un 59% \pm 7 de dobles negativos, 12% \pm 5 de dobles positivos, 18% \pm 4 de CD8+ y 11% \pm de linfocitos T CD4+, por citometría de flujo (Zuckermann and Gaskins, 1996). Por inmunohistoquímica en otra investigación determinaron que los linfocitos CD2+ están en un número casi equivalente a los CD4+ y un número mucho menor de linfocitos T CD8+. también encontraron células CD2+ CD4+CD8- en el domo, corona y centro del folículo (Bianchi, 1992); en el presente estudio no se encontraron estas células.

En los cerdos de la actual investigación, prácticamente todos los linfocitos de la región interfolicular son dobles negativos, así como los de la lámina propia y los LIE del íleon y difiere en gran medida a lo encontrado por otros autores, este hecho puede deberse a la inmadurez de sistema inmune de estos lechones. Estas células podrían corresponder a dobles negativas o a células nulas, probablemente con el receptor de células T $\gamma\delta$.

En conjunto con los resultados de la citometría de flujo se puede mencionar que mientras en sangre los animales de este experimento muestran altos niveles de linfocitos T CD8+, en los órganos evaluados están prácticamente ausentes, podría deberse a que son escasos a esta edad y por mecanismos de recirculación, temporalmente los retiran de los tejidos y los colocan en la sangre periférica. Solo se pudieron localizar en la lámina propia que es un sitio efector, en los demás tejidos no se encontraron.

En resumen los lechones de este experimento mostraron algunas deficiencias debidas probablemente a características individuales de su sistema inmune, otros autores han obtenido resultados con amplias variaciones, en este trabajo se confirmó la enorme variación individual de los lechones además de que los cerdos parecen estar fuertemente influenciados por el medio que los rodea. Otro factor no que no se consideró es la calidad del calostro que cada animal recibió, que esta determinada como ya es sabido, por los estímulos antígenicos que ha recibido la cerda así como por el número de partos que ha tenido. Las hembras multíparas producen un mejor calostro; también es importante el orden de nacimiento, generalmente los lechones que nacen primero toman calostro de mejor calidad y en mayor cantidad; esta situación añade otra fuente de variación no controlada. Las hembras uníparas, como las utilizadas en esta investigación, producen un calostro que varía en calidad y cantidad.

En general se encontraron deficiencias de linfocitos TCD4+ en sangre pero niveles muy elevados de CD8+ y de linfocitos B. Además de una carencia muy marcada de linfocitos CD4+ y CD8+, gran cantidad de células dobles negativas

que pueden representar células inmaduras, linfocitos $\gamma\delta$ ó células NK, que pueden ser CD2+CD4-CD8-, para profundizar a este respecto se requerirían de otros marcadores como MAC320. Los linfocitos $\gamma\delta$ y las NK son células muy importantes en los mecanismos de defensa inespecífica que en otros aspectos se ha comprobado que es muy eficiente en cerdos de corta edad. En el íleon se encontraron células sin marcador para linfocitos T pero que presentan CD4, que con las herramientas con las que se contaron fue posible identificar.

En los lechones colonizados con el probiótico se observaron algunas tendencias: mayor cantidad de linfocitos CD2+ CD8+ en sangre medidos por citometría de flujo; mayor cantidad de linfocitos B en sangre medidos por rosetas EAC; en tejidos mayor cantidad de linfocitos CD2+ en lámina propia y LIE de duodeno, mayores áreas CD2+ interfoliculares en íleon, células CD2-CD4+CD8- en domos y centros de los folículos de íleon.

La administración del probiótico influyó las áreas T del bazo, el número de células plasmáticas identificadas por su morfología, los linfocitos intraepiteliales en duodeno y células activadas en médula de ganglio linfático posterior, teñidas con verde metil pironina.

Se requiere mayor investigación para confirmar los datos obtenidos y revisar el efecto del probiótico sobre otras poblaciones celulares en animales que se enfrenten a un antígeno para realmente conocer su influencia sobre el sistema inmune del lechón y sobre el bienestar del animal. El modelo animal elegido dificulta por sí mismo la evaluación, por que presenta amplias variaciones, que disminuyen cuando el animal tiene alrededor de 5 semanas de vida.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson M, Gunne H, Ageberth B, et al. NK-lysin, structure and function of a novel effector molecule of porcine T and NK cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1996; 54: 123-126
2. Anderson OA. Structure and organization of the lymphatic system. In Oppenheim J, Shevach ME, eds. *Immunophysiology. The role of cells and cytokines immunity and inflammation*. Oxford University Press, 1990: 26-42
3. Barrow PA, Brooker BE, Fuller R, et al. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *Journal of Applied Bacteriology* 1980; 48: 147-154
4. Bianchi AT, Zwart RJ, Jeurissen SH, et al. Development of B- and T- compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1992; 33: 201-221
5. Bianchi ATJ and Heijden Van der PJ. Antigen presenting and B-cells in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994; 43: 63-68
6. Binns RM, and Licence ST. Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: evidence for two types of Peyer's patch in the young pig. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1985; 186:661-668
7. Binns RM, and Pabst R. Lymphoid and lymphocyte trafficking in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994; 43: 79-87
8. Binns RM, Whyte A and Licence ST. Constitutive and inflammatory lymphocyte trafficking. *Veterinary immunology and Immunopathology* 1996; 54: 97-104
9. Binns RM. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1982; 3 : 96-146
10. Brantzaeg P, Valnes K, Scott H, et al. The human gastro-intestinal secretory immune system in health and disease. *Gastroenterology, suppl.* 1985;17-38
11. Brown PJ, and Bourne FJ. Development of immunoglobulin- containing cell populations in intestine, spleen and mesenteric lymph node of the young pig, as demonstrated by peroxidase conjugated antiserum. *American Journal of Veterinary Research* 1976; 37:1309-1312
12. Bushmann H and Meyer J. An immune competence profile in swine. In Van der Zijpp AJ and Sybesma W. eds. *Improving genetic disease resistance in farm animals*. Kluwer Academic Press 1994: 145-152
13. Butcher EC, and Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-66
14. Butler JE, Klobasa F, and Werhahn E. The differential localization of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. *Veterinary immunology and Immunopathology* 1981; 2: 53-65
15. Chapman HA, Johnson JS, and Cooper MD. Ontogeny of Peyer's patches and immunoglobulin containing cells in pigs. *The journal of immunology* 1974; 112: 555-563

16. Chauvière G, Coconier M-H, Kernels S, et al. Competitive exclusion of diarrhegenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte like Caco-2-cells by heat killed *Lactobacillus*. FEMS Microbiology Letters 1992; 91: 213-218
17. Coconier M-H, Klaenhammer TR, Kerneis S, et al. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cells lines in culture. Applied and Environmental Microbiology 1992; 58: 2034-2039
18. Cummings JH, and Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. Journal of Applied Bacteriology 1991; 70: 443-459
19. DeSimone C, Bianchi-Salvadori B, Negri R, et al. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon by ConA-stimulated human peripheral blood lymphocytes. 1986; Nutr. Repts. Int. 33: 419-443
20. Duncan IA, Binns RM, and Duttus WPH. The null cell in pig blood is not an NK cell. Immunology 1989; 68: 392-399
21. Fahmy MH and Bernard C. Causes of mortality from birth to 20 weeks of age. Canadian Journal of Animal Science 1971; 51:351-359
22. Freter R. Factors affecting the microecology of the gut. In Fuller R. eds. Probiotics the scientific basis. Chapman and Hall London 1992: 111-144
23. Fuller R. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 1989; 66: 365-378
24. Gaskins HR, and Kelley KW. Immunology and neonatal mortality. In Varley MA, eds. The neonatal pig. Development and Survival. Wallingford UK: CAB International, 1995:39-49
25. Gleich GJ, and Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. Advances in Immunology 1986; 39:177-183
26. Griebel PJ, and Hein W. Expanding role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. Immunology today 1996; 17: 30-37
27. Haines DM, and Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed-embedded tissues for diagnostic pathology. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1991; 3: 101-112
28. Hammerberg C, Schuring GG, and Ochs DL. Immunodeficiency in young pigs. American Journal Veterinary Research 1989; 50: 869-874
29. Hartnell A, Kay AB, and Wardlaw AJ. IFN γ induces expression of Fc γ RIII (CD16) on human eosinophils. Journal of Immunology 1992; 148: 1471-1478
30. Hartnell A, Moqbel R, Walsh GM, et al. Fc γ and C11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. Immunology 1990; 69: 264-270
31. Havenaar R, Ten Brick B, and Huis JHJ. Selection of strains for probiotics use. In Fuller R. eds. Probiotics the scientific basis. Chapman and Hall London 1992: 111-144
32. Hein WR, Dudler R, and Morris B. Differential peripheral expansion and in vivo antigen reactivity of α/β and γ/δ T cells emigrating from the early fetal lamb thymus. European Journal of Immunology 1990; 20:1805-1813

33. Hentges DJ. Gut flora and disease resistance In: Fuller R. eds. Probiotics the scientific basis. Chapman and Hall London 1992: 111-144
34. Hirt W, Saalmüller A, and Reddehase MJ. Distinct γ/δ T cell receptor define two subsets of circulating porcine CD2-CD4-CD8- T lymphocytes. European Journal of Immunology 1990; 20: 265-269
35. Holland RE, Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. Clinical Microbiology Reviews 1990; 3. 345-375
36. Hoskinson CD, Chew BP, and Wong TS. Age-related changes in mitogen induced lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in piglet. Journal Animal Science 1990; 68: 2471-2478
37. Hosoda M, Hashimoto H, Morita H, et al. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Journal of Dairy Science 1992; 75: 976-981
38. Ianello D, Bonina L, Delfino D, et al. Effect of oral administration of a variety of bacteria on depressed macrophage functions in tumor-bearing rats. Ann. of Immunol. 1984; 135: 345-352
39. Jarosková L, and Kovarú F. Identification of T and B lymphocytes in pigs by combined E-rosette test and surface Ig labelling. Journal of Immunological methods 1978; 22: 253-261
40. Joling P, Bianchi ATJ, Kappe AL, et al. Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. Veterinary Immunology and Immunopathology 1994; 40:105-117
41. Jonjic N, Jonjic S, Saalmüller A, Rukavina D, et al. Distribution of T lymphocyte subsets in porcine lymphoid tissues. Immunology 1987; 60:395-401
42. Jonsson E, and Conway P. Probiotics for pigs In : Fuller R, eds. Probiotics the Scientific basis Chapman and Hall London, 1992: 259-315
43. Kagnoff MF. Mucosal Immunology: new frontiers. Immunology today 1996; 17: 57-59
44. Kato I, Yokokura T, and Mutai M. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. Microbiology and Immunology 1984; 28: 209-217
45. Kelsoe G. The germinal center reaction. Immunology today 1996; 16: 324-326
46. Kiernan JA. Histological & Histochemical Methods. Theory & Practice. Ed. Pergamon Press USA 1989.
47. Kishimoto T, Hirai Y, Nakanishi K, et al. Regulation of antibody response in different immunoglobulin classes. I. Selective suppression of IgE response by administration of antigen conjugated muramyl-peptides. Journal Immunology 1979; 123: 2709-2715
48. Klein JR. Advances in intestinal T-cell development and function. Immunology Today 1995; 16: 322-324
49. Kobayashi A, Kawai S, Ohbe Y, et al. Fecal flora of infants with biliary atresia; effect of the absence of the bile on faecal flora. American Journal of Clinical Nutrition 1988; 48: 1211-1213
50. Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. Annual Review of Microbiology 1997; 51: 311-340

51. LeFrancois L, and Puddinton L. Extrathymic intestinal T-cell development: virtual reality? *Immunology today* 1995; 16:16-20
52. Licence ST, and Binns RM. Major long-term changes in $\gamma\delta$ T-cell receptor-positive and CD2+T-cells subsets after thymectomy in the pig: longitudinal study lasting nearly 2 years. *Immunology* 1995; 85: 276-284
53. Licence ST, Davis WC, Carr MM, et al. The behavior of monoclonal antibodies in the First International Pig CD Workshop reacting with $\gamma\delta$ /nullIT lymphocytes in the blood of SLAb/b line pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1995; 47:253-271
54. Lowy I, Theze J, and Chedid L. Stimulation of the *in vivo* dinitrophenyl antibody response to the DNP conjugate of L-glutamic acid-L-alanine-L-tyrosine (GAT) polymer by a synthetic adjuvant activity and isotopic pattern of MDP stimulated response. *Journal of Immunology* 1980; 124: 100-104
55. Lucey DR, Dorsky DI, Nicholson-Weller A, et al. Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1gp120. *Journal Experimental Medicine* 1989; 169: 327-332
56. Lunney JK, and Pescovitz MD. Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1987; 17: 135-143
57. Maxwell FJ, and Stewart CS. In Varley MA, eds. *The neonatal pig. Development and Survival*. Wallingford UK: CAB International, 1995:155-177
58. Maxwell FJ, and Stewart CS. In Varley MA, eds. *The neonatal pig. Development and Survival*. Wallingford UK: CAB International, 1995:155-177
59. Maygar A, Mihalik R, and Oláh I. The surface phenotype of swine blood and tissue eosinophil granulocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1995; 47: 273-281
60. McCauley I and Hartmann PE. Changes in piglet leucocytes; B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. *Research in Veterinary science* 1984; 37:234-241
61. McCauley I and Hartmann PE. Changes in proportion and absolute number of T lymphocytes in piglets from birth until after weaning and adults. *Research in Veterinary science* 1984; 37:52-57
62. McFarlin DE, Binns RM. Lymph node function and lymphocyte circulation in the pig In: Jankovic BD and Isakovic K, eds. *Microenvironmental aspects of immunity*. Plenum press New York 1973: 87-93
63. Millard P, and Chesson A. Modifications to swede (*Brassica napus* L.) anterior to the terminal ileum of pigs: some implications for the analysis of dietary fibre. *British Journal of Nutrition* 1984; 52: 583-594
64. Montes AJ, and Pugh DG. The use of probiotics in food-animal practice. *Veterinary Medicine* 1993; 3: 282-288
65. Morilla AG, y Bautista GC. *Manual de Inmunología*. Ed. Diana técnico, México 1986.
66. Neutra RM, Pringault E, and Krahenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual Review of Immunology* 1996; 14: 275-300
67. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990; 62: 3-6

68. Pabst R, Geist M, Rothkötter HJ, et al. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology* 1988; 64:539-544
69. Perdigon G, and Alvarez S. Probiotics and the immune state. In: Fuller R. eds. *Probiotics the scientific basis*. Chapman and Hall 1992: 145-179
70. Pescovitz MC, Lunney JK, and Sachs DH. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *Journal of Immunology* 1985; 134: 37-44
71. Pollman DS, Danielson DM, and Peo ER. Effect of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science* 1980; 51: 577-581
72. Redman M, Chu DVM, Glock RD, et al. Gut associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) of the small intestine. *American Journal Veterinary Research* 1979 "B"; 40:1720-1728
73. Redman M, Chu DVM, Glock RD, et al. Lymphoid tissues of small intestine of swine from birth to one month of age. *American Journal Veterinary Research* 1979; 40:1713-1719
74. Reynolds JD. Peyer's patches and the early development of B lymphocytes. *Current Topics Of Microbiology and Immunology* 1987; 135: 43-51
75. Riedel D, Lindemann A, Brach M, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 induced surface expression of interleukin-2 receptor p55-chain and CD4 by human eosinophils. *Immunology* 1990; 70: 234-239
76. Roth JA. Immune System. In Leman DA, Strauss BE et al. eds. *Disease of swine*. Iowa USA: Iowa State University Press, 1992: 21-59
77. Rothkötter HJ, and Pabst R. Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunology* 1989; 67: 103-108
78. Rothkötter HJ, Ulbrich H and Pabst R. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation and T y B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatr. Res.* 1991; 29: 237-241
79. Rozee KR, Cooper D, Lam K, et al. Microbial flora of the mouse ileum mucus layer and epithelium surface. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; 43: 1451-1463
80. Saalmüller A, Hirt W, and Reddehase MJ. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4+CD8+ porcine T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 1989; 19:2011-2016
81. Saito I, Sato K, Horikawa Y, et al. Enhanced humoral antibody production and delayed type hypersensitivity response in mice by *Lactobacillus casei*. *Hiroshima Journal Medical Science* 1983; 32: 223-225
82. Salak-Johnson JL, Hu S, Peterson PK, et al. Chemokines induce chemotaxis of porcine microglia, alveolar macrophages and blood monocytes. *Veterinary immunology and Immunopathology* 1996; 54:111-112
83. Schwager J, and Schulze J. Maturation of the mitogen responsiveness, and IL-2 and IL-6 production by neonatal swine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997; 57: 105-109

84. Stewart CS, and Chesson A. Making sense of probiotics. *Pig Veterinary Journal* 1993; 31 11-33
85. Stokes CR, Bailey M, and Wilson AD. Immunology of the porcine tract. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994; 43: 143-150
86. Stokes CR, Haverson K, and Bailey M. Antigen presenting cells in the porcine gut. *Veterinary immunology and Immunopathology* 1996; 56: 171-177
87. Suganuma A, Ishizuka A, Sakiyawa Y, et al. B lymphocyte differentiation and suppressor activity by T lymphocytes derived by neonatal sucking piglets. *Research in Veterinary Science* 1986; 40:400-
88. Tannock GW, Fuller R, and Pedersen K. *Lactobacillus casei* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Applied and Environmental Microbiology* 1990; 56: 1310-1316
89. Thome M, Hirt W, Pfaff E, et al. Porcine T-cell receptors: molecular and biochemical characterization. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994; 43: 13-17
90. Tlaskalova-Hogenova H, Mandel L, Trebichavský I, et al. Development of immune response in early pig ontogeny. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994; 43: 135-142
91. Trebichavský I, Tlaskalová H, Curkrowska B, et al. Early ontogeny of immune cells and their functions in the fetal pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1996; 54: 75-81
92. Tyler JW, Cullor JS, Thurmond MC, et al. Immunologic factor related to survival and performance of neonatal swine. *Journal American Veterinary Medical Association* 1990; 51: 1400-1405
93. Van Snyck J. Interleukin-6 : an overview. *Annual Review Immunology* 1990; 8: 252-278
94. Vandervoorde L, Christiaens H, and Verstraete W. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 1990; 72: 214-219
95. Varley MA. In Varley MA, eds. *The neonatal pig. Development and Survival*. Wallingford UK: CAB International, 1995:1-13
96. Vega-López MA, Telemo E, Bailey M, et al. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1995; 44: 319-327
97. Vega-López MA, Telemo E, Bailey M, et al. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1993; 37: 49-60
98. Viney JL, and Macdonald TT. Cells and tissue of the gastrointestinal tract In Macdonald TT eds. *Immunology of gastrointestinal disease*. Kluwer Academic Press. 1992: 1-17
99. Weström BR, Svedsen J, Tagesson C, et al. Intestinal transmission of macromolecules (BSA and FITC-dextran) in the neonatal pig: enhancing effect of colostrum, protein and proteinase inhibitors. *Biology of the neonate* 1985; 47: 359-366
100. Wilson AD, Stokes CR, and Bourne FJ. Morphology and functional characteristics of isolated porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology* 1986; 59: 109-113

101. Zhu JQ, Fowler VR, and Fuller MF. Assessment of fermentation in growing pigs given unmolassed sugar-beet pulp: a stoichiometric approach. *British Journal of Nutrition* 1993; 69: 511-525
102. Zuckermann FA, and Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive cells. *Immunology* 1996; 87: 500-512
103. Zuckermann FA, and Gaskins HR. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology* 1996; 87: 493-499
104. Zuckermann FA. Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994; 43: 53-61

APENDICE

I. SOLUCIONES

SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA FOSFATOS (PBS)

Cloruro de sodio	8.0g
Cloruro de potasio	0.2g
Fosfato de sodio anhidro	1.15g
Fosfato de potasio monobásico anhidro	0.2g
Agua bidestilada	

Disolver todas las sales en aproximadamente 70 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 7.2 y aforar con más agua destilada a un volumen de 1 litro.

SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADA (SSA)

SOLUCION A

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄	0.045g
KH ₂ PO ₄	0.060g
Agua bidestilada	500 ml

Disolver las sales en un matraz aforado en 500 ml de agua bidestilada.

SOLUCION B

CaCl ₂ ·H ₂ O	0.147g
Agua bidestilada	500 ml

Disolver la sal en el agua bidestilada.

SOLUCION C

Glucosa	1.06g
Agua bidestilada	10 ml

Disolver la glucosa en 10 ml de agua bidestilada y con partes iguales de las soluciones A y B.

SOLUCION D

Rojo de fenol	0.002g
Agua bidestilada	10 ml

Disolver el rojo de fenol en los 10 ml de agua y añadir la mezcla A+B+C.

SOLUCION E

TRIS-hidroximetil-aminometano	19.1g
Agua bidestilada	1000 ml

Disolver la sal en el agua y ajustar el pH a 7.4 con HCl 1 N. Aforar a 1000 ml con agua destilada.

Mezclar volúmenes iguales de la solución E y de la solución A+B+C+D y ajustar el pH a 7.4. Esterilizar en autoclave a 121° c, durante 15 min. Conservar en refrigeración.

SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA FOSFATOS-ALBUMINA (PBA)

Cloruro de sodio	8.0g
Cloruro de potasio	0.2g
Fosfato de sodio anhidro	1.15g
Fosfato de potasio monobásico anhidro	0.2g
Albúmina sérica bovina	10g
Azida de sodio	0.1g
Agua bidestilada	1 lt

El procedimiento es igual que para el PBS.

ALSEVER

Glucosa	20.5g
Citrato de sodio dihidratado	8.0g
Ac. cítrico monohidratado	0.55g
Cloruro de sodio	4.2g
Agua bidestilada	1 litro

Disolver en un matraz aforado de un litro todos los solutos y llevar al aforo con agua bidestilada. Esterilizar en autoclave a 10 libras de presión por 10 min.

SOLUCION SALINA 0.85%

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua bidestilada	1000ml

SOLUCION AMORTIGUADORA DE BORATOS

Ac. bórico	0.184g
------------	--------

Tetraborato de sodio	9.536g
Cloruro de sodio	4.384g
Agua bidestilada	1000ml

Se mezclan las sales y se afora con agua bidestilada hasta un litro.

SOLUCION REGULADORA DE BORATOS

Mezclar 95 partes de sol. salina 0.85% con 5 partes de sol. amortiguadora de boratos.

SOLUCION P-FORMALDEHIDO-LISINA-PERYODATO

Se prepara una solución amortiguada de lisina-fosfato

SOLUCION A

Fosfato de sodio	0.1 M
Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	14.2g
Na ₂ HPO ₄	17.8g
Agua destilada	cbp 1000 ml

SOLUCION B Lisina monohidratada 0.2M

Lisina*	36.53g
agua destilada	cbp 1000 ml

Se mezcla una parte de solución A y una parte de solución B, ajustar el pH a 7.4, se mantiene a temperatura ambiente.

* P.M. 182.65

P-FORMALDEHÍDO AL 4%

P-formaldehído	4 g
agua destilada	cbp 100ml

Para disolver el p-formaldehído se calienta a 60°C y se agita, hasta que la solución esta totalmente transparente, al enfriarse se agrega 5.4 g de glucosa por cada 100 ml.

Se mezclan 75 ml de la solución amortiguada de lisina (sol. A+B) y 25 ml de paraformaldehído al 4%, al momento de utilizarse se agregan 0.213 g de peryodato de sodio.

SOLUCION AL 0.5% DE DAB EN TRIS-HCl

DAB (Diaminobenzidina)	3 mg
TRIS-HCl 0.05 M pH 7.6	5 ml

H₂O₂ 5 µl

Se disuelve la DAB en el TRIS, se le agrega el peróxido y se filtra en millipore 0. 22 µ debe prepararse momentos antes de usarse, se utilizan guantes.

TRIS-HCl 0.05M pH 7.6

TRIZMA BASE	1.39g
TRIZMA HCl	6.06g
Agua bidestilada	1 l

Mezclar las sales en un matraz aforado y llevar a un litro, ajustar el pH a 7.6 , y almacenar en refrigeración.

II. COLORANTES

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina (cristales)	2g
Oxido rojo de mercurio	1g
sulfato de aluminio y amonio ó sulfato de aluminio y potasio (alumbre)	40 g
Alcohol etílico absoluto	20 ml
Agua destilada	400 ml

Se disuelve perfectamente la hematoxilina en el alcohol, disolver el alumbre en agua calentandola sin hervir.

Mezclar ambas soluciones y calentar con flama alta y agitación constante, hasta la ebullición por un minuto. Adicionar lentamente el oxido rojo de mercurio, recalentar ligeramente hasta que la solución se torne morado oscuro.

Enfriar en el mismo matraz en el agua corriente.

Se puede agregar 2 a 4% de ácido acético glacial.

Enfriar y guardar en frasco ambar.

SOL. AMORTIGUADORA DE PHTALATOS

0.01M pH 4

Phtalato ácido de potasio	1.02g
agua destilada	490 ml
HCl 0.01M	1.0 ml

Disolver la sal en el agua y medir el pH hasta ajustarlo a 4.0-4.6 con el Hcl y aforar a 500 ml.

El pH de la solución teñidora que a continuación se describe tiene un pH óptimo de 4.0-4.6 y es muy importante que así se mantenga.

SOL. VERDE-METIL-PIRONINA

Verde de metilo	0.15 g
Pironina Y	0.03 g
Solución a mortiguadora de phtalatos	100 ml

Mezclar los colorantes y aforar con la solución amortiguadora de phtalatos a 100ml.

III. METODOS

DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY

La reacción se lleva a cabo en dos pasos, la reacción del cobre en medio alcalino con la proteína, posteriormente la reducción del reactivo de FOLIN por la proteína tratada con el cobre. Este procedimiento es 100 veces más sensible que la reacción dde Biuret y de 10 a 20 veces más sensible que la determinación de proteínas basada en su absorbancia a 280nm.

REACTIVO A

Solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N

REACTIVO B

Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en citrato de sodio 1%

REACTIVO C

Mezclar 1 ml del reactivo B con 50 ml de el reactivo A.

REACTIVO D

Reactivo de Folin diluído 1:3 en agua destilada.

SOLUCION DE PROTEÍNA TIPO

Solución de albúmina bovina en una concentración de 0.5 mg/ml.

PREPARACION DE CURVA DE CALIBRACION

BLANCO	REAC.A	REAC.C	REAC.D
0.5 ml	0.0ml	3 ml	0.3 ml
0.4 ml	0.1 ml	3 ml	0.3 ml
0.3 ml	0.2 ml	3 ml	0.3 ml

0.2 ml	0.3 ml	3 ml	0.3 ml
0.1 ml	0.4 ml	3 ml	0.3 ml
0.0 ml	0.5 ml	3 ml	0.3 ml

Colocar 0.5 ml de la solución tipo adicionar reactivo A y después reactivo C, agitar vigorosamente, reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Después adicionar reactivo D agitar y reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Hacer la lectura en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 660 nm.

Preparar diluciones de la solución problema, y con ellas realizar el mismo procedimiento anteriormente descrito para las soluciones de proteína de albúmina.

Conocemos la concentración en mg de proteína de las soluciones tipo y al hacer la lectura conocemos la absorbancia con estos datos se hace la curva de calibración, cuando se conoce la lectura de las soluciones problema se extrapola esta curva y se conoce la concentración de proteínas de la misma.

PREPARACION DE GLOBULOS ROJOS DE CARNERO PARA LA DETERMINACION DE LINFOCITOS T Y B

PREPARACION DE G.R. AL 1%

(PARA DETERMINAR LINFOCITOS T POR ROSETAS E)

Se depositan en un tubo 200 μ l de sangre de carnero en Alsever, y se prepara una solución al 1% de glóbulos rojos, se centrifuga a 2000 rpm, se tira y se repite la operación tres veces.

De la suspensión de eritrocitos resultante se toman 50 μ l y 4950 μ l de SSA, se refrigera hasta su utilización.

PREPARACION DE G.R. SENSIBILIZADOS CON HEMOLISINA

(PARA DETERMINAR LINFOCITOS B POR ROSETAS EAC)

A 50 μ l de la suspensión de eritrocitos previamente lavados se le agrega 950 μ l de SSA y 1 ml de hemolisina diluída, se incuba en baño María por 30 min a 37°C, después se centrifuga a 2000 rpm 10 min, se tira el sobrenadante y se resuspende el botón en SSA, esta operación se repite 3 veces.

Después se le agrega 25 μ l de suero humano como fuente de complemento y 975 μ l de SSA, se incuba nuevamente 30 min a 37 °C en baño María, posteriormente se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos, se tira el sobrenadante y se resuspende el botón en SSA, el proceso se repite tres veces, al final desechar el sobrenadante.

MANEJO Y USO DEL CITOMETRO DE FLUJO

En este estudio el citómetro que se utilizó fue el FACS CALIBUR de Beckton Dickinson y la computadora fue una Machintosh Apple 7.1 de 16 Mb en RAM, 230 Mb en disco duro. A continuación se mencionan las instrucciones para su uso:

ENCENDIDO

Encender el módulo sensor, el botón de control de fluido debe estar en HIGH, el botón de STANDBY debe estar encendido, encender la impresora y la computadora.

En el citómetro:

- A) Abrir la gaveta de fluidos y liberar la palanca de presión
- B) Sacar el soporte de metal del tanque de *sheath fluid*
- C) Llenar el tanque se *sheath fluid* con PBS filtrado por millipores de 0.22 micrometros hasta tres cuartos de su capacidad.
- D) Se coloca el tanque en su sitio, se tapa y coloca el soporte de metal, restaurar la presión.
- E) Desconectar los cables del tanque de desechos, vaciar el tanque de desechos.
- F) Depositar en el tanque de desechos 400 ml de hipoclorito de sodio comercial.
- G) Conectar los cables del tanque de desechos y taparlo.
- H) Eliminar burbujas en el filtro de *sheth fluid*.

CELL QUEST

El cell quest es un programa de adquisición y análisis del citómetro.

ADQUISICION.

Es la función de adquirir los datos desde el citómetro hacia el disco de trabajo y consta de tres puntos generales: optimización, preadquisición y adquisición.

OPTIMIZACION

- 1.- Se enciende el equipo según las instrucciones.
- 2.-Abrir el programa cell quest.
- 3.-Extender el documento original.
- 4.-Seleccionar de paleta de trabajo *dot blot*.
- 5.- Aparece la ventana de dialogo de dot blot en el *plot source* cambie a *acquisition*. Escoger FSC para el parámetro de las X y SSC para el parámetro de las Y: Seleccionar *multicolor gattig* y OK.
- 6.-Aparece la gráfica de FSC vs SSC.
- 7.- Del menú principal se elige *ACQUIRE*.
- 8.-Seleccionar *connect to citometer*. Aparece la ventana de control de adquisiciones, *set up* debe estar cruzado.
- 9.-En el menú CYTOMETER elegir *detectors/amp* y *threshold* .
- 10.-En el disco duro se encuentran grabadas los resultados de la calibración se pueden pedir seleccionando los *instrument settings* del menu CYTOMETER.
- 11.-En la optimización se ajustan los detectores para FSC, para SSC y el umbral.
- 12.-Seleccionar el modo de RUN en el citómetro, colocar el tubo sin tinción en el SIP.
- 13.-Elegir *acquire* en la ventana de control de adquisición y aparecen los eventosen la pantalla.

- 14.- En la ventana *detectors/amp* revisar el voltaje del fotodiodo de FSC debe estar en E00, par linfocitos en el modo LIN. Ajustar la ganancia de FSC hasta que aparezcan todas las poblaciones celulares incluyendo a los detritos.
- 15.- Escoger el modo LIN para SSC y ajustar el voltaje hasta que la poblacione de linfocitos se localicen entre 200 y 500 de FSC y entre 80 y 150 de SSC.
- 16.- Ajustar el umbral hasta ver pocos detritos
- 17.-Hacer una región alrededor de los linfocitos con la herramienta de región poligonal de la paleta.
- 18.-Retirar el tubo con células sin teñir del SIP y colocar un tubo con agua y en la ventana control de adquisiciones poner pausa.
- 19.- Seleccionar *histogram*, elegir *FL1* y *gate R1*.
- 20.-Ajustar *FL1* e inactivar *FL2* y *FL3*, pues las células que usamos solo tienen un fluorocromo.
- 21.-Retirar este tubo y poner el tubo de testigo de segundo anticuerpo y también colocar tubos con células teñidas, para comprobar que la optimización es la misma para todos los tubos, si no es así se mueven los detectores que sean necesarios.

PREDQUISICION

- 1.-Del menú *ACQUIRE* escoger *acquisition&storage*, elegir *parameter saved* e inactivar los parametros que no se utilizan, OK en las dos ventanas abiertas.
- 2.-Del mismo menú abrir *parameter description*, para definir donde se van guardar los datos, encontrar la carpeta adecuada.
- 3.-De la misma ventana elegir *File*, para nombrar el archivo y escoger *number tube* el menú *File Name Suffix* y OK.
- 4.-Hacer click en el cuadro junto de *Panel* y escoger el panel adecuado para la muestra, en este caso linfocitos (*LYMPH*).

ADQUISICION

- 1.-Del menú *ACQUIRE* elegir *Counters*
- 2.- Desactivar el cuadro de *Set up* de la ventana de control de adquisiciones
- 3.- Coloque el citómetro en modo de *RUN* instalar el primer tubo bajo el SIP, esperar aproximadamente 5 segundos y hacer click en *acquire*, cuando termina de grabar todos los eventos (10 000), se saca el tubo y se inserta el siguiente en el oden que indica el panel, hasta terminar con el último tubo.
Se cierra la ventana de control de adquisiciones y la ventana de *Counters*, se inicia el proceso de apagado del módulo sensor dejándolo en *standby*.

APAGADO

El procedimiento de apagado incluye el lavado para prevenir la obstrucción y eliminar los colorantes que se puedan adherir a las mangueras.

- 1.-Colocar un tubo con 2 ml de una solución de hipoclorito de sodio 1:10 bajo el SIP, con el citómetro en *RUN*, durante 1 minuto, con el brazo de soporte a un lado; se mueve el brazo bajo el tubo y se dejan pasar 5 minutos.

- 2.-Colocar bajo el SIP un tubo con agua desionizada, durante 1 min después del cual, se mueve el brazo y se coloca bajo el tubo y se dejan pasar 5 min.
- 3.-Dejar el aparato en STANDBY, y bajo el SIP un tubo con agua desionizada.
- 4.- Apagar el módulo sensor, la impresora y la computadora.

ANALISIS

Durante la adquisición de las muestras el citómetro muestra una gráfica de puntos (dot plot), que en el eje de las X tiene el parámetro tamaño y en el eje de las Y granularidad; se elige la región de las células que se localiza en los canales ya conocidos para el tipo celular con que se está trabajando en este caso era entre 200 y 400; después se hace un histograma de intensidad de fluorescencia contra cantidad de células, donde únicamente se grafica las células de la región de interés.

Con esta misma gráfica se puede analizar, se utiliza la herramienta de "margin", que es una línea que se coloca paralela al eje de las abscisas, y abarca la región del histograma que se considera positiva, generalmente después de una intensidad de fluorescencia de 10^1 . El programa Cell quest, automáticamente muestra las estadísticas y los datos de la muestra.

INCLUSION DE LOS TEJIDOS EN PARAFINA

Una vez que el tejido está fijado, el agua que contienen los tejidos se extrae de manera gradual por inmersiones crecientes en etanol, desde 70% hasta alcohol absoluto. Posteriormente se someten a la aclaración, el alcohol se sustituye por un líquido miscible tanto en alcohol como en parafina, que en este caso es el cloroformo.

El paso siguiente es la infiltración donde las muestras se colocan en recipientes con parafina fundida (60 °C), los solventes se evaporaron y los espacios son sustituidos por parafina, al solidificar el tejido tiene una consistencia firme óptima para ser cortado. Sin embargo, para facilitar su manejo y darle un soporte, estas muestras, se colocan en pequeños recipientes cúbicos, que contienen parafina fundida y se dejan solidificar a temperatura ambiente.

TINCION HEMATOXILINA Y EOSINA

Esta coloración es la más usada en microscopía óptica, es una tinción selectiva, que resiste por periodos muy largos sin sufrir deterioro. Se emplean dos colorantes: la hematoxilina de Harris, que es un colorante básico que tiñe de un color azul ó púrpura intenso a los núcleos, componentes nucleares y ácidos nucleicos, y la eosina colorante básico que tiñe de un color desde rosado hasta naranja ó rojo al citoplasma, dependiendo de la cantidad de proteínas presentes.

- 1.- Se retira la parafina de los cortes esto se logra por medio de inmersiones en xilol

- 2.- Se rehidrata para ser permeable a los colorantes
- 3.- Se sumergen los cortes en concentraciones decrecientes de etanol
- 4.- Se hacen lavados para retirar el alcohol del tejido
- 5.-Se colocan en el colorante básico
- 6.-Se lavan con agua corriente
- 7.-Se decoloran con alcohol ácido
- 8.-Se lavan con agua corriente
- 9.-Se tiñe con la eosina
- 10.-Se procede ahora a la deshidratación
- 11.-Se aclara en xilol y se monta.

SENSIBILIZACION DE LOS PORTAOBJETOS PARA LAS TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

Antes de realizar los cortes los portaobjetos recibieron el siguiente tratamiento, con el fin de cambiar su carga superficial y facilitar la adhesión del corte histológico al vidrio.

- 1.-Lavar y desengrasar en una solución 1:2 de alcohol etílico absoluto y acetona.
- 2.-Preparación de una solución de poli-D-lisina en una concentración de 10 μ g/ml
- 3.-Los portaobjetos se sumergieron en la solución durante 10 min.
- 4.-Se dejaron secar.
- 5.-Se guardaron.