

58



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO, DE LAS
POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE
PORCINO, ANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trichinella spiralis”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.**

P R E S E N T A:

HÉCTOR ROMERO RAMÍREZ

DIRECTOR: DR. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2000

11/14/00



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZADA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Análisis por citometría de flujo, de las poblaciones
celulares del sistema inmune orcano, ante la infección
experimental con Trichinella spiralis.

que presenta el pasante: Romero Ramírez Héctor
con número de cuenta: 8803126-4 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 12 de enero de 2000

PRESIDENTE	<u>MVZ. Pablo Martínez Labat</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Tonatíuh Cruz Sánchez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Marco Antonio Vega López</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Angel Martínez Sosa</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.C. Victor Zendejas Buitrón</u>	

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular y en la Unidad de Citometría de Flujo del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) y en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM bajo la dirección del Doctor Marco Antonio Vega López.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de:

Apoyos a proyectos de investigación:

CONACYT: proyecto 4263-M, beca de estudiante.

Beca para desarrollar tesis de Licenciatura:

Patronato Universitario UNAM: clave REC/04/046995
1996-1997.

GRACIAS.

A mi mamá y a mi papá Yolanda y Héctor por su total apoyo y comprensión, para superarme día con día.

A Claudia con quien he compartido muchos ratos de felicidad, por ayudarme y alentarme en todo momento.

A mis hermanos Adrián, Elizabeth y Octavio y a mi tía Mary quienes me apoyan incondicionalmente.

Al Dr. Marco A.Vega por sus grandes y valiosas enseñanzas y dedicación en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Guadalupe Ortega por brindarme su incondicional apoyo en su laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 2 de Genética y Biología Molecular: Paty, René, Luis, Marisela, Arturo, Fernando, Raúl, Rocío, Blanca, Don René, Lupita por todos los momentos que pasamos juntos y por toda su ayuda.

Al Departamento de Biología Celular por permitirme el uso del citómetro de flujo.

Al M en C. Pablo Martínez por apoyarme en la obtención de una beca.

A los maestros Tonatiuh Cruz, Pablo Martínez, Angel Martínez, Víctor Zendejas por la revisión crítica de este trabajo y por sus observaciones que contribuyeron a su mejoramiento.

A mis queridos amigos Claudia León, Marco A, Edith, Claudia Contreras, Vero y Gama, Lilia y Miguel por su amistad y todos aquellos inolvidables sucesos que pasamos en la carrera.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE CUADROS	v
1.0 RESUMEN	vi
2.0 ANTECEDENTES	1
2.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO MUCOSAL	1
2.2 SISTEMA INMUNOLÓGICO INTESTINAL	2
2.2.1 MECANISMOS INESPECÍFICOS DE DEFENSA EN EL INTESTINO	2
2.2.2 MECANISMOS ESPECÍFICOS DE DEFENSA EN EL INTESTINO	3
2.3 EL CERDO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA INMUNIDAD INTESTINAL	4
2.3.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO INTESTINAL PORCINO	4
2.3.2 MADURACIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO INTESTINAL PORCINO	7
2.4 <i>Trichinella spiralis</i> COMO MODELO DE INFECCIÓN	8
2.4.1 CICLO DE VIDA DE <i>Trichinella spiralis</i>	9
2.4.2 RESPUESTA INMUNOLÓGICA HACIA <i>Trichinella spiralis</i>	12
2.5 OBTENCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DEL INTESTINO	15
2.6 ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO	16
2.6.1 Generalidades	16
2.6.2 Aplicaciones	16

2.6.3	Funcionamiento	17
3.0	JUSTIFICACIÓN	20
4.0	HIPÓTESIS	21
5.0	OBJETIVOS	21
6.0	MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1	PARÁSITOS	22
6.2	ANIMALES E INOCULACIÓN	22
6.3	TOMA DE MUESTRAS	22
6.4	COMPROBACIÓN DE LA INFECCIÓN	23
6.5	SEPARACIÓN DE CÉLULAS (MONONUCLEARES) DE LOS DIFERENTES ÓRGANOS	23
6.6	ANTICUERPOS MONOCLONALES	24
6.7	CONTEO DE CÉLULAS (RENDIMIENTOS)	26
6.8	TINCIÓN Y LECTURA PARA CITOMETRÍA DE FLUJO	26
6.9	PROCEDIMIENTO PARA EL USO DEL CITOMETRO DE FLUJO (FACSort, BECTON DICKINSON)	27
6.10	ANÁLISIS DE RESULTADOS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO	30
7.0	RESULTADOS	32
7.1	RENDIMIENTO DE CÉLULAS	32
7.2	PROTOCOLO DE SEPARACIÓN DE CÉLULAS INTESTINALES	32
7.3	CÉLULAS RECUPERADAS	38
7.4	PROPORCIONES DE CÉLULAS POR ÓRGANO Y POR REGIONES	38
7.4.1	PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN SANGRE	41

7.4.2 PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN GLM	41
7.4.3 PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN BAZO	42
7.4.4 PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN EPITELIO INTESTINAL	42
7.4.5 PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN LÁMINA PROPIA	42
7.5 CRITERIO PARA EL ANÁLISIS DE CAMBIOS EN LAS SUBPOBLACIONES CON LA EDAD (MADURACIÓN)	43
7.6 CAMBIOS DE LAS SUBPOBLACIONES CON LA EDAD	
7.6.1 SANGRE	43
7.6.2 GLM	46
7.6.3 BAZO	46
7.6.4 EPITELIO INTESTINAL	46
7.6.5 LÁMINA PROPIA INTESTINAL	46
7.7 COMPROBACIÓN DE LA INFECCIÓN	52
7.8 EFECTO DE LA INFECCIÓN EN LAS POBLACIONES CELULARES	
7.8.1 SANGRE	52
7.8.2 GLM	54
7.8.3 BAZO	54
7.8.4 INTESTINO	54
8.0 DISCUSIÓN	61
9.0 CONCLUSIONES	81
10.0 BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXO I	
ANEXO II	

ABREVIATURAS.

c.b.p.	Cuanto baste para.
CD	Del inglés Cluster of differentiation, marcadores de diferenciación.
CP	Célula plasmática.
CPA	Célula presentadora de antígeno.
Ct	Control.
DE	Desviación estándar.
DN	Células dobles negativas.
DP	Células dobles positivas.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético disódico.
EP	Epitelio.
FACS	Del inglés Fluorescent Activated Cell Sorter, citofluorometría de flujo.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
GALT	Del inglés Gut-Associated Lymphoid Tissue, tejido linfoide asociado a intestino.
GLM	Ganglios linfáticos mesentéricos.
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hanks.
HP	Hewlett Packard [®] .
Igs	Inmunoglobulinas.
IL	Interleucina.
LB	Linfocito B.
LIE	Linfocitos intraepiteliales.
LM	Larva muscular.
LLP	Linfocitos de lámina propia.
LP	Lámina propia.
LT	Linfocito T.
LRN	Larvas recién nacidas.
MAb	Anticuerpo monoclonal.
MALT	Del inglés Mucosa-associated Lymphoid Tissue, tejido linfoide asociado a mucosas.
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
MO	Macrófagos.

PBA	Solución amortiguadora de fosfatos con azida de sodio.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PMN	Polimorfonucleares.
PC	Computadora personal.
PP	Placas de Peyer.
R	Subregión.
RU	Reino Unido
TH1	Linfocitos T cooperadores 1.
TH2	Linfocitos T cooperadores 2.
T. sp.	<i>Trichinella spiralis</i> .
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
SLA	Swine Leukocyte Antigen, Complejo Principal de Histocompatibilidad del cerdo.
SSF	Solución salina fisiológica.
UI	Unidades Internacionales.
x g	Gravedades.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la distribución de células del sistema inmunitario en el intestino delgado del cerdo adulto.	6
Figura 2. Ciclo de vida del parásito <i>Trichinella spiralis</i> .	11
Figura 3. Esquema del funcionamiento del citómetro de flujo.	18
Figura 4. Diagrama general de la captura y análisis de resultados.	19
Figura 5. Esquema general del protocolo utilizado para la separación de células de epitelio y lámina propia intestinales del cerdo.	25
Figura 6. Tinción de inmunofluorescencia indirecta de células para citometría de flujo.	27
Figura 7. Esquema de las partes principales del citómetro de flujo.	29
Figura 8. Esquema de la ventana de la computadora donde se establecen los parámetros para capturar los datos por FACS.	30
Figura 9. Ejemplo de la obtención de las proporciones de los diferentes marcadores celulares por citometría de flujo.	31
Figura 10. Rendimientos de células obtenidas de sangre (A), GLM (B) y Bazo (C).	33
Figura 11. Rendimientos de células obtenidas de epitelio intestinal (A) y lámina propia intestinal (B).	34
Figura 12. Cortes histológicos de la parte proximal de intestino porcino.	35
Figura 13. a. Frotis de células obtenidas del epitelio intestinal porcino. b. Frotis de células obtenidas de la lámina propia intestinal porcina.	37
Figura 14. Ejemplo de las regiones analizadas por citometría de flujo en las proporciones celulares de sangre, GLM y bazo.	41
Figura 15. Ejemplo de las regiones analizadas por citometría de flujo en las proporciones celulares del intestino.	42
Figura 16. Análisis por citometría de flujo de las proporciones celulares de sangre	

porcina, en los grupos control e infectados con <i>T.sp.</i>	51
Figura 17. Análisis por citometría de flujo de las proporciones celulares de GLM porcino, en los grupos control e infectados con <i>T. sp.</i>	52
Figura 18. Análisis por citometría de flujo de las proporciones celulares del duodeno porcino, en los grupos control e infectados con <i>T. sp.</i>	53
Figura 19. Análisis por citometría de flujo de las proporciones celulares de lámina propia intestinal porcina, en los grupos control e infectados con <i>T. sp.</i>	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Anticuerpos monoclonales utilizados.	24
Cuadro 2. Análisis por citometría de flujo de los cambios con la edad de las subpoblaciones de células en la región total y subregiones 1, 2 y 3 de sangre de cerdo.	44
Cuadro 3. Análisis por citometría de flujo de los cambios con la edad de las subpoblaciones de células en la región total y subregiones 1, 2 y 3 de ganglio linfático mesentérico de cerdo.	45
Cuadro 4. Análisis por citometría de flujo de los cambios con la edad de las subpoblaciones de células en la región total y subregiones 1, 2 y 3 de bazo de cerdo.	46
Cuadro 5. Análisis por citometría de flujo de los cambios con la edad de las subpoblaciones de células en la región total y subregiones 1, 2 y 3 del epitelio intestinal porcino.	47
Cuadro 6. Análisis por citometría de flujo de los cambios con la edad de las subpoblaciones de células en la región total y subregiones 1, 2 de la lámina propia intestinal porcina.	48
Cuadro 7. Número de LM recuperadas por gramo de músculo de diafragma de los cerdos a los 25 y 40 días postinfestación.	49
Cuadro 8. Sinopsis de los cambios con la edad de las poblaciones de células en el cerdo.	55
Cuadro 9. Sinopsis de los cambios en las poblaciones celulares porcinas debido a la infestación con <i>T. sp.</i>	56

1.0 RESUMEN

La mayoría de los agentes infecciosos entran al organismo a través de las superficies mucosales, que por su superficie representan el principal sitio de interacción del individuo con el medio ambiente. La protección de esos sitios depende del concurso de eficientes mecanismos inespecíficos y específicos de defensa.

Poco es lo que se sabe acerca de las propiedades funcionales de células del sistema inmunitario durante las infecciones en tejidos mucosales. *Trichinella spiralis* es un buen modelo de estudio pues una de las fases de su ciclo de vida es entérica. De este parásito se ha estudiado con amplitud la respuesta inmunológica sistémica, principalmente en ratas y ratones y se conoce poco de la respuesta inmunológica local. El cerdo como hospedero definitivo del parásito es un buen modelo para estudiar la inmunología intestinal.

El objetivo de este trabajo fue analizar la maduración y el efecto de la infestación experimental con *Trichinella spiralis* sobre las células del sistema inmunitario porcino, así como la evaluación del método de separación de células intestinales, mediante citometría de flujo.

Para evaluar la maduración y desarrollo de la respuesta inmunitaria intestinal a la infestación por *T. spiralis* se emplearon 5 camadas de cerdos de 6 semanas de edad (50 cerdos en total), la mitad de cada camada se infestó con el parásito (700 LM/kg de peso) y la otra mitad se mantuvo como control de crecimiento. Se sacrificaron parejas de animales (control e infectado) a los 2, 5, 15, 25 y 40 días postinfestación y se tomaron muestras de sangre, bazo, GLM y duodeno para separar las células mononucleares. Del intestino se obtuvieron los linfocitos del epitelio (LIE) mediante lavados con Hanks-EDTA 1mM y los de la lámina propia (LLP) con colagenasa, estos métodos de separación se evaluaron por citometría de flujo, por frotis y por cortes histológicos, teñidos con hematoxilina y eosina, de los lavados de cada uno de los compartimentos intestinales. Las células se identificaron por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales específicos para CD2 (MSA4), CD4 (74-12-4), CD8 (76-2-11), Mo/PMN (74-22-15), IgM (K531C3) y SLA-II (MSA3).

La determinación del fenotipo mediante la tinción de las células separadas del intestino con anticuerpos monoclonales, así como la captura y análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo fue un procedimiento rápido y con resultados reproducibles y representativos

de cada compartimiento. Se demostró la eficiencia del protocolo de separación de células intestinales al coincidir los resultados de citometría con los obtenidos por inmunohistoquímica, ya que se obtuvieron poblaciones representativas y en buena cantidad.

No se encontraron diferencias con significancia estadística con la edad en el análisis por citometría de flujo de la mayoría de las regiones totales de las células de los diferentes órganos estudiados. Sin embargo, cambios en las proporciones de algunas subregiones llegaron a alcanzar significancia con la edad o entre los grupos de animales infestados y sin infestar. Las células CD2+, CD8+, SLA-II+ e IgM+ del sistema inmunológico porcino siguen cambiando lentamente con la edad, en comparación con las primeras semanas de vida. Este cambio puede deberse al destete, acercando al animal a su madurez inmunológica. Estos datos en su conjunto sugieren que el sistema inmune se sigue adaptando al nuevo medio ambiente. En animales infestados con *Trichinella spiralis* se detectaron aumentos significativos de células CD2+ y CD8+ en GLM y de CD4+ en LP, que podrían estar relacionados con posibles respuestas tempranas en estos sitios. Además se detectó una disminución de células SLA-II+ e IgM+ en días tanto tempranos como tardíos después de la infestación, situación que podría explicar la larga permanencia del parásito en el intestino porcino.

El estudio del desarrollo y maduración del sistema inmunológico intestinal es importante para entender los aspectos involucrados en la maduración de los animales y determinar la edad óptima de inmunización.

2.0 ANTECEDENTES.

2.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO MUCOSAL

Las infecciones tienen, a nivel mundial y especialmente en países sub-desarrollados, un gran impacto sobre la salud y productividad de humanos y animales domésticos, lo que afecta el desarrollo social y económico de las regiones. La mayoría de los agentes infecciosos entran al organismo a través de las superficies mucosales, que representan el principal sitio de interacción del individuo con su medio ambiente (Befus *et al.*, 1986).

Las superficies mucosales de los tractos, gastrointestinal, respiratoria y urogenital representan una gran área de exposición a agentes exógenos, incluyendo microorganismos. No es de sorprender por lo tanto, que estén protegidos por un sistema inmunológico con propiedades y funciones características que, en muchos aspectos difieren de las del sistema inmunológico sistémico. El objetivo principal del sistema inmunológico de las mucosas es proteger estas superficies y también el interior del cuerpo contra las agresiones del medio ambiente (Holmgren *et al.*, 1992).

El sistema inmunológico mucosal posee los mismos componentes que el sistémico, sin embargo existen diferencias importantes en su función y regulación (Kioyono *et al.*, 1992). Así se tiene que los componentes del sistema inmunológico intestinal son capaces de detectar cualquier elemento potencialmente nocivo para el organismo e inducir respuestas contra él, a su vez, suprimen las respuestas inmunológicas no deseables contra los componentes de la alimentación, que aunque son antigénicos, son vitales para la existencia (Bienenstock *et al.*, 1987).

Las células del sistema inmunitario mucosal se encuentran en diferentes tejidos linfoides asociados a las mucosas (MALT), y tienen tres funciones principales: 1.- Protegen las mucosas contra la invasión de organismos potencialmente peligrosos; 2.- Evitan la captura de antígenos no degradados, incluyendo proteínas extrañas derivadas de la ingestión de los alimentos y microorganismos comensales y 3.- Previenen el desarrollo de respuestas inmunológicas nocivas a esos antígenos si alcanzan el interior del cuerpo. Así entonces el MALT posee un alto grado de compartimentalización tanto anatómica como funcional, y tiene células T, células B y

subpoblaciones celulares accesorias fenotípica y funcionalmente distintas a las del sistema inmunológico sistémico (Brandtzaeg, 1989; Czerkinsky *et al.*, 1995).

Dos tipos de respuestas inmunológicas activas pueden desarrollarse en estos sitios, ya sea concomitante o separadamente: La formación de anticuerpos (en su mayoría inmunoglobulina A secretoria o SIgA) y la inmunidad mediada por células; aunque muchos antígenos dan como resultado una predominante supresión específica llamada "Tolerancia oral". Las respuestas generadas en los sitios mucosales incluyen el equilibrio entre la inmunidad activa y la supresión/tolerancia, que dependen de diferentes factores como la naturaleza del antígeno, el tipo de células accesorias y linfocitos involucrados y la genética del hospedero (Brandtzaeg, 1995).

La mucosa intestinal puede alcanzar hasta 400 m² de superficie en el humano adulto y a través de ella pasan, en números absolutos, hasta 20 litros por día de fluidos ya sea del lumen a la mucosa o viceversa. Esta extensa superficie es ideal para la acción de agentes potencialmente patógenos, tales como agentes infecciosos, toxinas, alérgenos, químicos y alimentos), lo que exige vastos y eficientes mecanismos de protección, por ello el tejido linfoide asociado al intestino (del inglés Gut-associated lymphoid tissue, GALT) es el mayor órgano inmunológico del cuerpo donde existe la mayor densidad de células inmunológicas (Nagura *et al.*, 1988; Doe, 1989; Holmgren *et al.*, 1991 y 1992; Ferguson, 1996).

2.2 SISTEMA INMUNOLÓGICO INTESTINAL

Aunque la mayoría del material inmunogénico es degradado y eliminado por los procesos de digestión y los mecanismos de defensa inespecíficos, el sistema inmunitario mucosal en el intestino identifica nutrimentos inocuos, suprimiendo cualquier respuesta sistémica que se pudiera generar contra ellos y reacciona eficientemente para excluir la invasión por virus, bacterias, hongos y parásitos. Ambas funciones se realizan mediante la participación de eficientes mecanismos inespecíficos y específicos de defensa. (Bienenstock *et al.*, 1987; Parrot *et al.*, 1987; Vega, 1994).

2.2.1 MECANISMOS INESPECÍFICOS DE DEFENSA EN EL INTESTINO. Estos mecanismos trabajan independientemente y en conjunto con el sistema inmunitario mucosal, su principal función es evitar la adhesión y penetración de antígenos. Estos mecanismos incluyen una gran

variedad de barreras físicas (fluidos, motilidad, epitelio y moco), químicas (secreciones, enzimas, defensinas, pH, ácidos grasos) y biológicas (microflora) (Mayrhofer *et al.*, 1984).

2.2.2 MECANISMOS ESPECÍFICOS DE DEFENSA EN EL INTESTINO. En general la respuesta inmune hacia antígenos en el intestino está mediada principalmente por la IgA secretoria, aunque también existe la inmunidad celular, cuyas funciones se han podido dilucidar parcialmente, aunque aún no se conoce la función de ciertas subpoblaciones celulares. La IgM es la principal inmunoglobulina secretoria en animales jóvenes; la IgE se encuentra asociada a las células cebadas de la lámina propia (LP) y su importancia radica en la protección contra infecciones parasitarias y en la regulación y amplificación de la respuesta inmune intestinal. Las inmunoglobulinas de clase IgA, secretadas en la mucosa, pueden limitar la toma de antígenos al bloquear su adsorción al enterocito, lo que prolonga su estancia en el lumen y favorece su proteólisis; a este fenómeno se le llama "exclusión inmune" (Stokes, 1988; Werner *et al.*, 1990; Fukushima *et al.*, 1991; Barrett *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1992; Brandtzaeg, 1995).

En el intestino se encuentran una gran variedad de células relacionadas con el sistema inmune entre las que podemos mencionar: el enterocito, las células caliciformes que secretan moco en el epitelio, las células M de las placas de Peyer que captan proteínas y antígenos, los linfocitos T y B, las células plasmáticas (CP), los macrófagos (MO), y varios tipos de células presentadoras de antígeno (CPA); todas estas células se encuentran localizadas en diferentes compartimientos del intestino. Existen linfocitos intraepiteliales (LIE), que se encuentran entre las células epiteliales del intestino mientras que otros están en la lámina propia (LLP) de las vellosidades y las criptas intestinales; también existen acúmulos de linfocitos organizados como las placas de Peyer (Johnson *et al.*, 1983).

Las diferencias entre los sistemas inmunes sistémico y mucosal radican principalmente en que el primero elimina activamente antígenos en el interior del organismo (inmunidad esterilizante) y el segundo está dedicado principalmente a evitar la entrada de antígenos al organismo y prevenir la interacción de sustancias potencialmente dañinas con las superficies mucosales, a través de la exclusión inmune (Bienenstock *et al.*, 1987; Nagura *et al.*, 1988; Mega *et al.*, 1992).

2.3 EL CERDO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA INMUNIDAD INTESTINAL

Un modelo animal apropiado para realizar estudios es el cerdo, por sus similitudes en su anatomía y fisiología con los humanos, incluyendo tamaño, fisiología digestiva, hábitos, dieta, etc; provee un modelo de exposiciones crónicas y agudas a xenobióticos). Además por décadas los investigadores han usado al cerdo como un modelo para humanos en estudios cardiovasculares, dermatológicos, nutricionales, de trasplantes así como también se le ha utilizado para evaluar la inmunología intestinal (Tumbleson, 1986; Stokes, 1988 y 1994; Blecha *et al.*, 1990; Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 1994; Vega *et al.*, 1994).

En este punto se han realizado diversos trabajos acerca del desarrollo, distribución y número de células del sistema inmune intestinal porcino, donde se ha descrito una sorprendente distribución y compartimentalización de las células a nivel de epitelio y LP bajo condiciones naturales; además, el cambio en la morfología y celularidad del linaje de células T, está determinado por la madurez relativa y el microambiente local (Smith *et al.*, 1978; Butler *et al.*, 1981; Lefrancois, 1991; Rothkötter *et al.*, 1991; Vega-López *et al.*, 1993; Hamad *et al.*, 1994; Salmüller *et al.*, 1994(a); Vega-López *et al.*, 1995).

2.3.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO INTESTINAL PORCINO

La LP del intestino delgado contiene una de las acumulaciones más grandes de células del sistema inmune, por lo general se le considera como un sitio de almacenamiento de células efectoras de memoria, pero aún no se realiza un análisis preciso y detallado de su función. Esto se debe a las dificultades en el aislamiento de las células intestinales y de su enumeración *in situ*, el análisis de la densidad de células en la LP del intestino delgado de cerdos de 6 meses de edad, hizo evidentes las marcadas diferencias de distribución entre vellosidades y criptas (Vega-López, *et al.*, 1993).

La mayoría de los linfocitos T (CD2) se encuentran en las vellosidades. Dentro de esas células CD2+, las subpoblaciones de células CD4 (linfocitos T cooperadores) y CD8 (linfocitos T citotóxicos) ocupan sitios diferentes en las vellosidades. La mayoría de las células CD8+ se encuentran alrededor de la membrana basal del epitelio, mientras que las CD4+ se localizan en la parte central de la vellosidad. La mayoría de los linfocitos intraepiteliales en cerdos adultos expresan el marcador CD2, pero algunos aparentemente

no expresan marcadores de linfocitos T. Se han identificado dos subpoblaciones de LIE, una de ellas tiene el fenotipo CD2+CD4-CD8- (doble negativa) y la otra, que se encuentra en la membrana basal del epitelio, expresa el fenotipo CD2+CD4-CD8+ (Figura 1). El papel de estas poblaciones en el sistema inmunitario mucosal es aún desconocido (Saalmüller *et al.*, 1989; Vega-López *et al.*, 1993 y 1994).

En la LP intestinal también se encuentran presentes macrófagos (MO), aunque en un número muy inferior a las células CD2+, hay más MO en ileon que en duodeno y las criptas muestran mayor densidad de estas células que las vellosidades. Estas células, al ser activadas *in vitro*, son capaces de expresar moléculas MHC-II (Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II) y receptores de interleucina 2 (IL-2) en su superficie. En cerdos de 6 meses de edad se ha demostrado que hasta 30% de los MO/PMN de la LP tienen el receptor para IL-2 pero la mayoría de los macrófagos en las criptas duodenales de la LP no expresa moléculas de clase II (Austyn, 1989; Vega-López *et al.*, 1993).

El complejo principal de histocompatibilidad porcino (SLA) se ha estudiado con detalle, dentro de los antígenos de clase II se han demostrado alelos DR y DQ; en el cerdo su expresión es constitutiva en linfocitos T, pero no se sabe si lo es en células presentadoras de antígenos (CPA). La importancia de las moléculas de clase II en la respuesta inmunológica, radica en su capacidad de presentación de antígenos a los linfocitos CD4+ (Lunney *et al.*, 1987; Stokes *et al.*, 1996).

A diferencia de los hallazgos en roedores y en humanos, en el epitelio intestinal del cerdo no hay expresión de antígenos de clase II; pero estas moléculas están presentes en otros tipos de células en la LP subepitelial, entre ellas están células con morfología dendrítica, localizadas debajo de la membrana basal de las vellosidades y en algunas áreas cerca del epitelio glandular de las criptas (Figura 1) y una significativa proporción de células presentadoras de antígenos (CPA) no profesionales, incluyendo células endoteliales y eosinófilos (Selby *et al.*, 1981; Mayrhofer *et al.*, 1983; Vega-López *et al.*, 1993 y 1994; Stokes *et al.*, 1996).

Ahora bien, la mayoría de los estudios funcionales de esas células se han realizado en modelos murinos, donde se han observado cambios importantes en la población de linfocitos intraepiteliales ante infecciones tales como giardiasis, coccidiosis y con esporozoitos que invaden el epitelio y residen en ese lugar por cierto tiempo. Así también se

ha encontrado que la mayoría de los linfocitos que se encuentran en el epitelio poseen el receptor de células T gama/delta. Algunos autores reportan respuestas proliferativas de éstas células ante mitógenos cambios con la maduración del animal y producción de citocinas y otros han analizado las poblaciones celulares de los diferentes compartimentos y de los órganos asociados al intestino, con el fin de inferir su función (Befus, 1986; Mowat *et al.*, 1986; Wilson, *et al.*, 1986; Viney *et al.*, 1990; Zeitz *et al.*, 1990; Becker *et al.*, 1993; Takeuchi *et al.*, 1993; Bailey *et al.*, 1994; Ebert *et al.*, 1995; Vega-López *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Zuckermann *et al.*, 1996(a)).

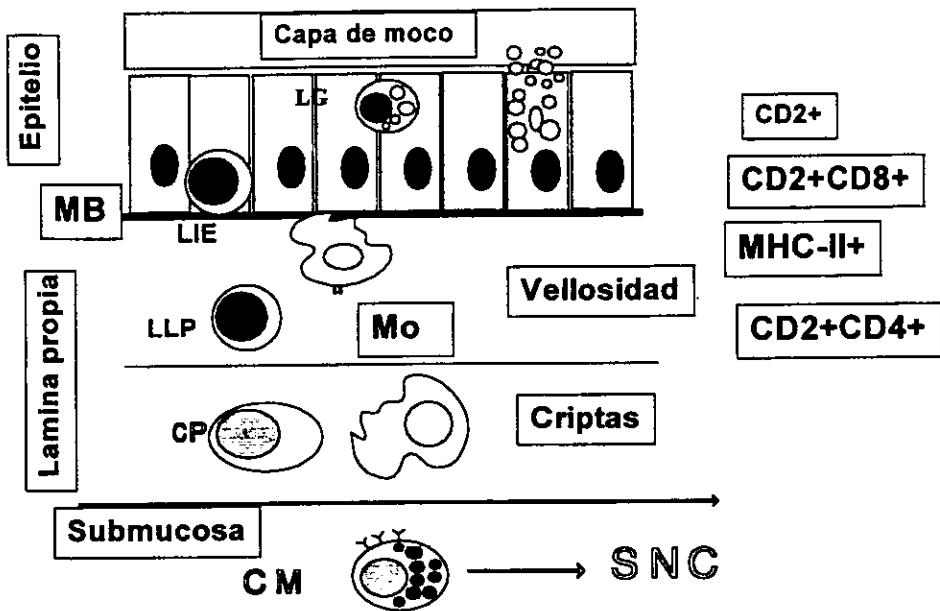


Figura 1: Esquema de la distribución de células del sistema inmune en el intestino delgado del cerdo adulto. CM= célula cebada (mastocito), CP= célula plasmática, LG= linfocito granular, LIE= linfocito intraepitelial, LLP= linfocito de la lámina propia, MB= membrana basal, Mo= macrófagos, SNC= sistema nervioso central. (Vega, 1994).

En síntesis, se puede decir que las células en la LP del intestino se distribuyen conforme a una arquitectura definida, mostrando una sorprendente microanatomía y una distribución en compartimentos que seguramente tiene relación con su función.

2.3.2 MADURACIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO INTESTINAL PORCINO

En el período neonatal de un individuo ocurren cambios celulares debido al desarrollo y maduración normal y a diferentes factores como son: alimentación (incluyendo la materna), medioambiente y exposición a antígenos (microorganismos, proteínas externas, sustancias químicas) y la genética del individuo. El tamaño del tejido linfoide del intestino aumenta dependiendo de los antígenos microbianos y nutricionales y la proliferación de linfocitos es dependiente de la edad (Rothkotter *et al.*, 1991; Brandtzaeg, 1995).

En los mamíferos el período inmediatamente después del destete es un momento de particular vulnerabilidad a las infecciones debido a la inmunosupresión por la liberación de corticosteroides, la mortalidad de cerdos después del destete alcanza del 8 al 30% a causa de enfermedades como salmonelosis, rinitis atrófica, neumonía bacteriana e infecciones del tracto gastrointestinal. Se ha sugerido que esta susceptibilidad a enfermedades se debe a cierta inmadurez del sistema inmunológico humoral, además de que los animales ya no están protegidos pasivamente por el calostro materno, por lo que conocer el *status* celular del intestino en este periodo es importante (Tyler *et al.*, 1990; Vaillancourt *et al.*, 1990).

Se ha estudiado la maduración del sistema inmunitario sistémico en humanos y cerdos, se han caracterizado la distribución y fenotipo de los linfocitos T y B y de otras células accesorias como macrófagos y células MHC-II⁺ en intestino y tejidos linfoides fetales humanos, y se han comparado con los linfocitos en el intestino postnatal, detectándose cambios drásticos en el intestino al destete, que involucran aumentos importantes de ciertas poblaciones celulares, en los diferentes compartimentos inmunológicos (Butler *et al.*, 1981; Harvey *et al.*, 1990; Russell *et al.*, 1990; Rothkötter *et al.*, 1991; Devey *et al.*, 1993; Vega-López *et al.*, 1995).

Se tienen datos de los cambios celulares y morfológicos del sistema inmunológico porcino desde el nacimiento al destete, que incluyen la cinética de migración de subpoblaciones celulares en el epitelio y en la lámina propia intestinales, donde se aprecian importantes aumentos de linfocitos T y de otras células incluyendo macrófagos y células clase II⁺ (Smith *et al.*, 1978; Wilson *et al.*, 1986 (b); Parrot *et al.*, 1987; Vega-López *et al.*, 1993, 1994). El número de células CD2⁺ en epitelio y lámina propia de los cerdos

aumenta notablemente desde el nacimiento hasta las semanas 5 y 7 de edad; después de la primera semana de edad existe un incremento considerable de células CD4+ en comparación con las CD8+ que hasta la quinta semana de edad aumentan levemente (Vega *et al.*, 1994).

Al nacimiento hay pocos MO/PMN en duodeno y su número máximo se alcanza a la quinta semana de edad, mientras que las células SLA-II+ se incrementan de forma relevante desde la primera semana de edad. Por otro lado, después del destete existen aumentos significativos de células CD2+, MO/PMN y SLAII+ tanto en criptas como en vellosidades de la parte proximal del intestino, mientras que no se observan incrementos de células CD4+ o CD8+ en la LP lo que indica que el infiltrado de células es principalmente del fenotipo CD2+CD4-CD8- (Vega-López *et al.*, 1995) lo que podría indicar que estas células juegan un papel trascendental en este periodo.

En general entre la cuarta y quinta semana de edad los lechones son destetados y vacunados contra diversas enfermedades; el momento y la forma de presentación de antígenos puede influir en la capacidad del sistema inmunológico de responder a ellos. Los cambios celulares pueden deberse al efecto del medio ambiente intestinal (dieta, flora normal, infecciones) en el periodo después del destete (6-12 semanas). Por lo tanto, es importante estudiar los aspectos involucrados en la maduración postdestete de los animales, y con ello revisar las estrategias de vacunación utilizadas y determinar la edad óptima de inmunización de los animales.

2.4 *Trichinella spiralis* COMO MODELO DE INFECCIÓN

El estudio del sistema inmunitario mucosal en condiciones de enfermedad o infección, proveería de información valiosa acerca de su fisiología, la relación parásito-hospedero y la expresión y modulación de la fisiopatología en las infecciones de las superficies mucosales. Varios sistemas hospedero-parásito se han estudiado, entre ellos el del parásito *Trichinella spiralis*, que es un buen modelo de estudio pues una de las fases de su ciclo de vida es entérica. De este parásito se ha estudiado con amplitud la respuesta inmunitaria sistémica, principalmente en ratas y ratones y se conoce poco de la respuesta inmunitaria local (Despommier, 1983; Miller, 1984; Wakelin, 1984; Beaver, 1986; Befus,

1986; Marti, 1986; Murrell, 1986; Dupouy-Camet *et al.*, 1988; Ljungstromm *et al.* 1988; Wakelin *et al.*, 1994; Finkelman *et al.*, 1997; Ishikawa *et al.*, 1998).

La triquinosis es cosmopolita y potencialmente fatal para el hombre; es adquirida por el consumo de carne o subproductos crudos o mal cocidos, principalmente de cerdo, que es el hospedero definitivo y fuente principal de la zoonosis y la severidad de la enfermedad es proporcional al número de larvas ingeridas. El cerdo puede ser un buen modelo experimental, sin embargo la mayoría de los estudios inmunológicos en el cerdo se circunscriben a la fase sistémica de la infección y hay pocos trabajos sobre la infección intestinal (Dick *et al.*, 1980; Brown, 1985; Lunney *et al.*, 1987, 1988; Coligan *et al.*, 1990; Bianchi *et al.*, 1992; Vega *et al.*, 1994; Zuckermann *et al.*, 1996(b)).

2.4.1 CICLO DE VIDA DE *Trichinella spiralis*

T. spiralis es un parásito intracelular en un estado larvario que lleva a cabo todos sus estadios de desarrollo en un solo hospedero, es una parasitosis que se presenta en los animales en forma crónica y raras veces llega a manifestarse. Los cerdos pueden adquirir el parásito al ingerir ratas infectadas, situación que ocurre normalmente ya que la rata se cría en forma paralela al cerdo en las granjas por tener alimento a su disposición. Su ciclo de vida es directo, presenta dos fases: una entérica, donde pasa por cuatro estadios larvados y el adulto; y una fase parenteral, que incluye la larva recién nacida y la larva muscular enquistada (L1) (Grencis, *et al.*, 1985; Beaver, 1986).

El ciclo inicia con la ingestión de tejido muscular infestado con la L1, que al pasar por el estómago se libera del quiste por acción del ácido clorhídrico del jugo gástrico. Llegando al intestino las L1 comienzan su desarrollo pasando rápidamente por L2, L3, L4 y L5 para convertirse en adultos en un lapso de 36 a 48 horas; una vez convertidos en adultos copulan y los machos son expulsados del intestino coincidiendo esto con accesos de diarrea en los animales. Las hembras fecundadas del parásito migran e invaden el epitelio columnar y la LP del intestino delgado, ya que son "activadas" por una combinación de bilis, proteasas (por ej. tripsina y quimiotripsina) y el ambiente provisto por el pH básico (Beaver, 1986; Steward *et al.*, 1987). Normalmente esto ocurre en el duodeno en donde penetran y se desarrollan intracelularmente, quedando alojadas en la LP en donde entran en una fase de incubación que dura de 8 a 16 semanas. Lo más sorprendente de ésta

etapa es que no hay desintegración de las células epiteliales del hospedero como resultado de la penetración del nemátodo (Kazura *et al.*, 1978).

Durante las primeras 48 horas de infección, *T. spiralis* induce cambios en el nicho entérico los que presumiblemente favorecen la supervivencia del parásito, facilitando su maduración y reproducción (Russell *et al.*, 1987). En la etapa enteral el metabolismo del parásito es aerobio, mientras que en la L1 en músculo es anaerobio estricto (Ferguson *et al.*, 1973). Durante las primeras 20 horas de vida en el nicho entérico, el gusano secreta una batería de 20 proteínas, muchas de las cuales están altamente glicosiladas (Silberstein, 1983). La tyvelosa (3,6-dideoxi-D-arabino-hexopiranosido), que confiere antigenicidad grupo específica, es uno de los azúcares unido a diferentes proteínas secretadas, posiblemente esas proteínas hagan que exista una respuesta hacia ellas y se desvíe la acción directa contra el parásito, siendo así una forma de evadir al sistema inmunológico (Wisnewski *et al.*, 1993). Los síntomas clínicos en humanos están relacionados con la destrucción de células epiteliales y la exposición a las secreciones del parásito que producen diarrea, vómito, dolor muscular, fiebre y edema (Despommier, 1995).

Después de cinco días, comienza la liberación de larvas a la linfa, pasando hacia el conducto torácico y siendo dispersadas por sangre a todo el organismo, teniendo especial tropismo por el tejido muscular esquelético (sin quedar exentas otras localizaciones). Aquí crecen gradualmente hasta alcanzar 1mm de largo quedando enquistadas en esta localización. A los tres meses de implantado el parásito se comienza a calcificar sin que se afecte el desarrollo de la larva, la cual puede permanecer sin alterarse por años. Para cerrar el ciclo se requiere que las masas musculares del individuo infectado sean consumidas por otros hospederos (Figura 2) (Brown, 1985).

Para efectos prácticos los mecanismos patogénicos se dividen en tres etapas: 1.- Invasiva, caracterizada por alteraciones derivadas del ingreso de las formas adultas a la LP del intestino las que originan procesos inflamatorios que se manifiestan como diarrea, la intensidad de esta alteración es proporcional a la cantidad de parásitos y puede ser mortal. 2.- La segunda fase se denomina de migración e implica el desplazamiento de larvas por la sangre y su instalación en las masas musculares, aquí el problema básico es la liberación

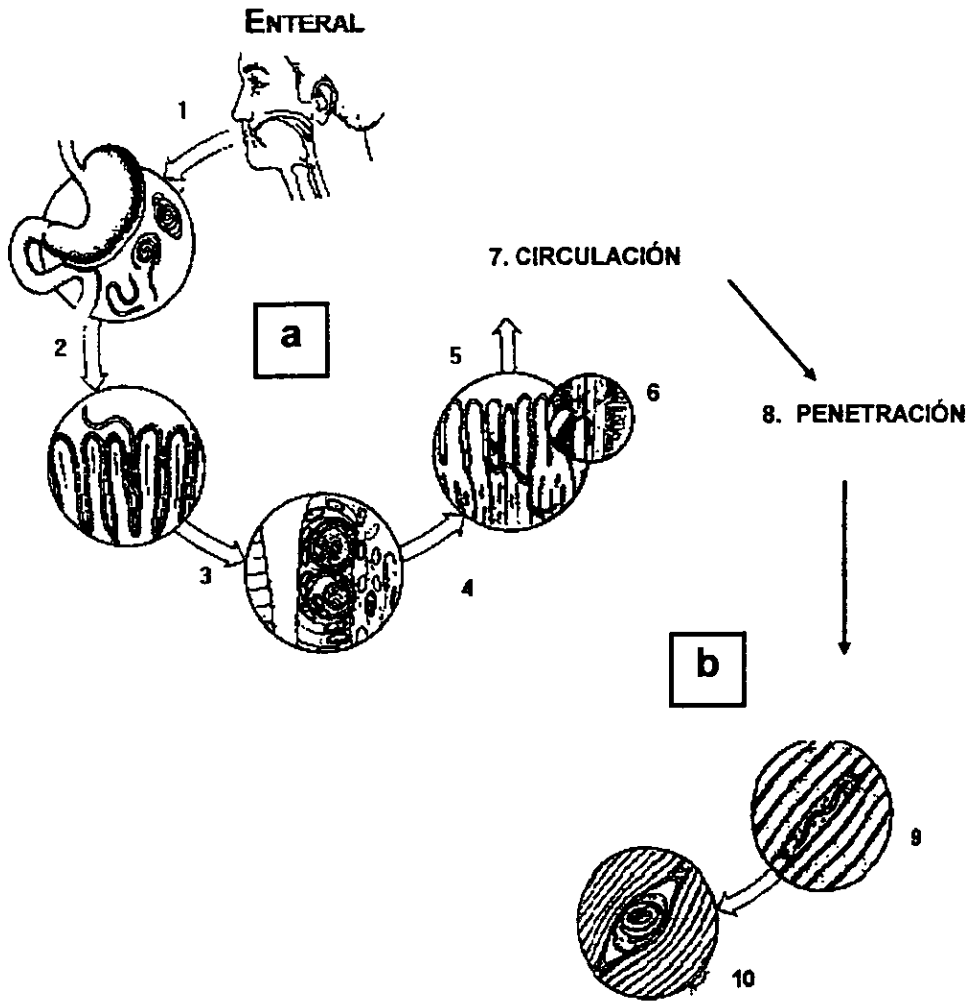


FIGURA 2. Ciclo de vida del parásito *Trichinella spiralis* (modificado de Despommier, 1995). a. fase enteral. 1. Las larvas son ingeridas con tejido muscular infectado. 2. La larva 1 (L1) es liberada en el estómago. 3. La L1 infesta el epitelio columnar del intestino delgado. 4. Las larvas mudan 4 veces y se convierten en adultos 30h después de la ingestión. 5. Al día 6 las hembras adultas liberan larvas recién nacidas (L1). 6. Las larvas recién nacidas penetran los vasos linfáticos o sanguíneos. b. Fase parenteral del ciclo de vida de *T. spiralis*. 7. Las larvas recién nacidas migran a través del hospedero via linfa y sangre. 8. Cuatro días después penetran a la célula muscular. 9. La célula nodriza empieza a formarse. 10. El complejo de célula nodriza-L1 está completamente desarrollado 20 días después de entrar a la célula muscular (enquistamiento).

de productos del metabolismo de las larvas que generan toxicidad, y un proceso inflamatorio que se desarrolla en las masas musculares afectando sus funciones. 3.- Fase de enquistamiento, en ella se asienta definitivamente el proceso inflamatorio y se agravan los efectos de la toxicidad afectándose el sistema nervioso (Beaver, 1986).

2.4.2 RESPUESTA INMUNOLÓGICA HACIA *Trichinella spiralis*

Los estudios de inmunidad protectora se han llevado a cabo principalmente en roedores de laboratorio y muy pocos en el cerdo doméstico, que se considera la principal fuente de infección para el humano. Debido a que *T. spiralis* tiene tres estadios de desarrollo morfológicamente distintos, este parásito presenta un mosaico antigénico complejo a su hospedero induciendo una respuesta inmunológica igualmente compleja. Se ha establecido que los ratones infestados desarrollan una resistencia a la reinfestación la cual es estadio específica (Kazura *et al.*, 1978). En una primera infestación, la inmunidad intestinal se manifiesta en una disminución de la fecundidad de las hembras adultas, seguida de la eliminación de la fase intestinal a través de un proceso de expulsión (Perrudet-Badoux, 1978). La respuesta inmunológica sistémica está caracterizada por la producción de anticuerpos circulantes (Marti *et al.*, 1986), donde las IgG e IgE son las que aparecen en mayor proporción en el curso de la infección y el establecimiento de hipersensibilidad retardada (Murrell, 1985).

Recientemente, se ha demostrado en ratas, la presencia de una importante cantidad de IgE en secreciones intestinales después de una infección primaria con *Trichinella spiralis*; pero otros autores han encontrado evidencias que demuestran el desarrollo de procesos de hipersensibilidad tipo IV que refuerzan la inflamación en forma sostenida (Beaver, 1986; Negrao-Correa *et al.*, 1997).

Se han descrito dos subpoblaciones de linfocitos T (LT) cooperadores (TH1 y TH2) las cuales una vez activadas, liberan diferentes citocinas que intervienen en la activación de linfocitos B (LB) para la producción de anticuerpos (TH2); ó de otras células del sistema inmunológica que participan en mecanismos de citotoxicidad y en el proceso inflamatorio (TH1).

Respecto a lo anterior, estudios realizados empleando cepas de ratones resistentes ó susceptibles a la infestación con *T. spiralis* demostraron que la población TH2 se induce

en los ganglios linfáticos mesentéricos durante la infección. Sin embargo existen otros estudios que han demostrado que en ratones infectados con este parásito existe una inducción diferencial y compartimentalizada de las dos poblaciones de T cooperadoras (TH1 y TH2) y otros mencionan que es tiempo dependiente, es decir en etapas tempranas de infestación hay una respuesta tipo TH1 y en tardías una TH2 (Grencis *et al.*, 1991; Ishikawa *et al.*, 1998). En este contexto, el estudio de la inducción de las diferentes poblaciones de T cooperadoras por otros parásitos sugiere que la TH2 es la población que se induce predominantemente en este tipo de infestaciones intestinales. Además se ha observado una correlación entre la inducción preferencial de TH2 durante la infección con *T. spiralis* y los cambios inmunológicos presentes en animales infectados (Dillender *et al.*, 1993; Ramaswamy *et al.*, 1996).

Trichinella spiralis tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a varios mecanismos de inmunidad, debido a la diversidad de antígenos estadio-específicos que presenta y constituye un estímulo antigénico complejo para el hospedero, el que desencadena una respuesta inmunológica humoral y celular estadio específica (Wakelin *et al.*, 1983; Ortega-Pierres *et al.*, 1984; Parkhouse *et al.*, 1984). La respuesta inmunológica humoral durante la infestación ha sido estudiada, no solo en el humano sino también en ratones y cerdos empleando técnicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunolectrotransferencia (IET); se ha demostrado que los anticuerpos específicos en el suero de pacientes pertenecen a las clases IgG, IgA e IgM; se sabe que los anticuerpos específicos IgE y los niveles de IgE total en suero, no necesariamente se encuentran elevados en los pacientes con triquinosis (Van Knapen *et al.*, 1982). La presencia de anticuerpos específicos así como de antígenos secretados por la larva infectiva L1 por largos períodos hace suponer la existencia de complejos inmunitarios en suero; esto ha sido comprobado en ratones y humanos (Golinska *et al.*, 1986).

El estudio de la respuesta inmunológica celular producida por la triquinelosis experimental en el ratón se ha enfocado hacia los estadios de la fase entérica, debido a que es el primer sitio de contacto con el parásito. Se sabe que la inmunidad hacia este parásito es tiempo dependiente y que el grado de resistencia provocado por la infección está influenciado por los genes del MHC (Grencis *et al.*, 1985).

El papel preciso de los linfocitos T en la inmunidad hacia *Trichinella spiralis* no está completamente definido, existen evidencias en el ratón que sugieren que los linfocitos T cooperadores L3T4⁺ Lyt2⁻ de ganglios linfáticos mesentéricos, median las reacciones de inflamación intestinal que provocan la expulsión de los parásitos preadultos o adultos del intestino, gracias a la producción de las citocinas IL-2, IL-3 e interferón γ . (Grencis *et al.*, 1985; Crook *et al.*, 1993). Por estudios *in vitro* se sabe que los linfocitos T de los ganglios linfáticos mesentéricos y de la mucosa intestinal regulan el número de células cebadas y eosinófilos de sangre periférica después de la infección o estimulación con antígenos del parásito, gracias a la producción de IL-3 (Parmentier *et al.*, 1987).

Existen diversos reportes en cuanto al tiempo de aparición de la mastocitosis en el intestino delgado de roedores, lo que correlaciona fuertemente con el período de expulsión de los parásitos intestinales. Una consecuencia de la infiltración, mastocitosis y eosinofilia en la mucosa y en el lumen del intestino delgado de roedores, es la elevación en la cantidad de histamina, leucotrienos y enzimas lisosomales (mieloperoxidasa y fosfolipasa B) asociadas con estas células; las cuales pueden dañar la mucosa o actuar directamente sobre los parásitos intestinales (Yépez *et al.*, 1994). Las células cebadas, cuando se desgranulan, liberan principalmente histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos y diferentes tipos de proteinasas; estos mediadores causan cambios eléctricos en el epitelio intestinal, contracción del músculo liso y la hipersecreción de moco, que da como resultado la expulsión rápida de parásitos intestinales (Russell *et al.*, 1985; Harari *et al.*, 1987; Moqbel *et al.*, 1987).

La mastocitosis intestinal y la inflamación son controladas por una variedad de interleucinas producidas por células TH2 incluyendo IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10. Por otro lado, se ha demostrado que la IL-5 producida por esta población celular es importante en la producción de eosinófilos (Yépez *et al.*, 1994). Los eosinófilos pueden también desgranularse y funcionar como células efectoras que dañan la mucosa intestinal y a los parásitos intestinales provocando su expulsión (Pincus *et al.*, 1986).

En el ratón las vellosidades intestinales infestadas están atrofiadas y la lámina propia está infiltrada con leucocitos, que reflejan una intensa reacción inmunológica específica e inespecífica (Ruitenber *et al.*, 1980).

En el cerdo, el parásito adulto puede permanecer en el intestino por períodos de más de siete semanas (Coligan *et al.*, 1990) y aún no se conocen los mecanismos que permiten la larga permanencia de este estadio (expulsión tardía); los cerdos también desarrollan una fuerte resistencia a la reinfestación expulsando los parásitos adultos en alrededor de tres semanas y se ha descrito la inducción de una inmunidad efectiva contra larvas recién nacidas (LRN) y larvas musculares (LM), además de una significativa reducción de la fertilidad de las hembras adultas, hechos que limitan el establecimiento del parásito y posibilitarían el control de la parasitosis por medios inmunológicos (Gabriele *et al.*, 1985; Murrell, 1985).

2.5 OBTENCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DEL INTESTINO

Poco es lo que se sabe acerca de las propiedades funcionales de linfocitos, macrófagos/monocitos, granulocitos y otras células del sistema inmune durante las infecciones en tejidos mucosales. Los linfocitos de los ganglios linfáticos o del bazo son los más frecuentemente utilizados en experimentos de transferencia de inmunidad y para experimentos *in vitro* se utilizan exudados peritoneales o células de sangre periférica (Befus, 1986). Así, muchos estudios se han hecho en órganos o tejidos más bien accesibles y no representativos de los órganos infectados como el intestino y el pulmón. Esto se debe, en parte, a que existen grandes problemas para separar y purificar las células de estos lugares, entre los que se pueden mencionar el bajo rendimiento de obtención de células durante respuestas inflamatorias (tanto en números absolutos como en las proporciones de células recuperadas), baja viabilidad, recuperación de poblaciones celulares no representativas (una recuperación diferencial o una selección de células vivas), contaminación por moco y como consecuencia pérdida de células, dificultad en la identificación del lugar de origen de la célula, por ejemplo epitelio, lamina propia, entre otros. (Befus, 1986). Un problema serio ha sido que al separar células del epitelio intestinal, pocos autores las han caracterizado morfológica y fenotípicamente, lo que ha impedido la comparación adecuada entre experimentos ya que las metodologías son muy variables y se ha visto que alteraciones menores en el proceso de separación producen sensibles cambios en el número, viabilidad y tipos de células separadas de intestino (Davies *et al.*, 1981; Harriman *et al.*, 1992; Rothkotter *et al.*, 1994).

Como se ha mencionado, los LIE y los de la lámina propia son diferentes, por lo tanto se debe tener cuidado en conocer las características de las células separadas, además de utilizar los controles necesarios en los experimentos, como serían el someter células de otros órganos al mismo procedimiento de separación de células y hacer análisis histológicos de los órganos después del proceso de extracción para evitar confusiones y poder evaluar la eficiencia de los métodos usados (Bland *et al.*, 1979; Klein, 1984).

2.6 ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUJO

2.6.1 Generalidades

Existen diversos métodos de identificación de células, tales como las tinciones químicas e inmuoquímicas en frotis y en cortes de tejidos, entre otros. En la década de los sesenta se desarrollaron metodologías simples para marcar proteínas con reactivos fluorocromos, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), se realizó un análisis serológico y bioquímico intensivo de las inmunoglobulinas. Sin embargo, fue hasta los inicios de los años setenta cuando se desarrolló la tecnología de métodos cuantitativos de identificación de células utilizando anticuerpos fluorescentes y con ello se facilitó el estudio de subpoblaciones de linfocitos que entonces pudieron ser caracterizados y separados a través de la detección de la expresión de un antígeno superficial o intracelular (Bonner *et al.*, 1972).

Los protocolos de separación celular, en conjunción con los avances en la tecnología de anticuerpos monoclonales, se han utilizado también en aplicaciones clínicas, incluyendo la identificación de linfocitos T y B en leucemias, monitoreo de las células CD4+ en SIDA y en investigaciones donde se reflejen cambios celulares producidos por muchas enfermedades (Reinherz *et al.*, 1979; Ivanoska *et al.*, 1990).

2.6.2 Aplicaciones

La citofluorometría de flujo (fluorescent activated cell sorter, FACS), es una tecnología que mide simultáneamente múltiples características físicas, de partículas individuales usualmente células y se aplica en campos de la ciencia como la Inmunología, la Biología Celular, la Oncología, el análisis de partículas, etc. Utiliza una combinación de sistemas hidrodinámicos, ópticos y electrónicos para generar datos de características

antigénicas, bioquímicas y biofísicas de células individuales para su subsecuente análisis por computadora. Esta tecnología permite análisis multiparamétricos, rápidos y cuantitativos de células ya sea vivas o muertas y también puede separar diferentes subpoblaciones de células con base a sus características (Coligan *et al.*, 1990). Esta metodología se ha utilizado, entre otras cosas, para identificar y analizar células del sistema inmunológico por su rapidez y facilidad en el procesamiento de las muestras, además por el alto número de eventos que se pueden capturar (Haynes, 1988; Coligan *et al.*, 1990) (Figura 3).

La citometría de flujo tiene dos aplicaciones generales: análisis cuantitativo y separación celular, para realizar experimentos con citometría de flujo; se requiere de tres fases distintas pero interdependientes. La primera fase es la preparación de los reactivos y de las células para su tinción con reactivos fluorescentes. La segunda es la fase que involucra el procesamiento de las células teñidas utilizando el citómetro de flujo y colectando datos de uno o más parámetros hechos de cada célula individual. Finalmente, la tercera fase involucra el análisis de los datos colectados.

La información que puede ser obtenida de una célula utilizando la citometría de flujo es: tamaño relativo, granularidad relativa o complejidad interna y la intensidad de fluorescencia relativa. Estas características son detectadas usando un sistema óptico-electrónico acoplado que detecta las células que emiten fluorescencia al ser incididas por un rayo láser (Coligan *et al.*, 1990) (Figura 3).

2.6.3 Funcionamiento

El funcionamiento general del citómetro de flujo es como sigue: las partículas (células) en suspensión entran en un flujo o corriente de solución salina con amortiguador de fosfatos y que es originado por un torrente laminar e hidrodinámico que lleva las partículas hacia el centro del flujo, en donde pasan una por una para ser llevadas al lugar donde son incididas por un rayo láser. Algunos rayos son desviados y otros no, dependiendo de las características morfológicas de las partículas y las moléculas fluorescentes presentes en las mismas (Figura 3a). Las desviaciones del rayo y la luz fluorescente son colectados por una serie de lentes, una combinación de capturadores y

filtros que dirigen los rayos desviados y la luz fluorescente a los detectores apropiados. Los detectores producen una señal electrónica que es proporcional a la cantidad de luz emitida.

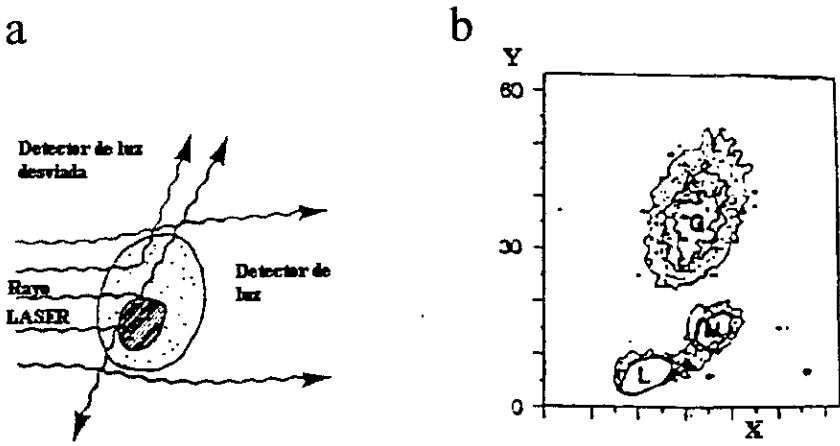


FIGURA 3. Esquema del funcionamiento del citómetro de flujo. a. El rayo LASER incide sobre la célula y de acuerdo a sus características es desviado y detectado. b. Gráfica de las poblaciones que se encuentran en una muestra de sangre, se grafica tamaño (X) vs granularidad (Y). G= granulocitos, M= monocitos, L= linfocitos.

Las características o parámetros medidos de cada evento se basan en la luz dispersada y sus propiedades fluorescentes. Los datos de cada partícula, o evento, son capturados y guardados en discos de computadora, donde se puede analizar la información proporcionada de las subpoblaciones de la muestra (figura 4). Se han hecho estudios por FACS en cerdos normales y en ratones en condiciones de infestación con *T. spiralis*, pero la mayoría de ellos se enfocaron al estudio de células a nivel sistémico (Smith *et al.*, 1978; Lunney *et al.*, 1987; Ivanoska *et al.*, 1990; Bailey *et al.*, 1994; Hamad *et al.*, 1994).

Así se tiene que las ventajas de esta metodología son, la rapidez y sensibilidad para detectar con anticuerpos monoclonales fluorescentes poblaciones celulares, que se encuentren en diferentes órganos, incluyendo el intestino y con ello es posible detectar cambios con la edad o ante alguna infección.

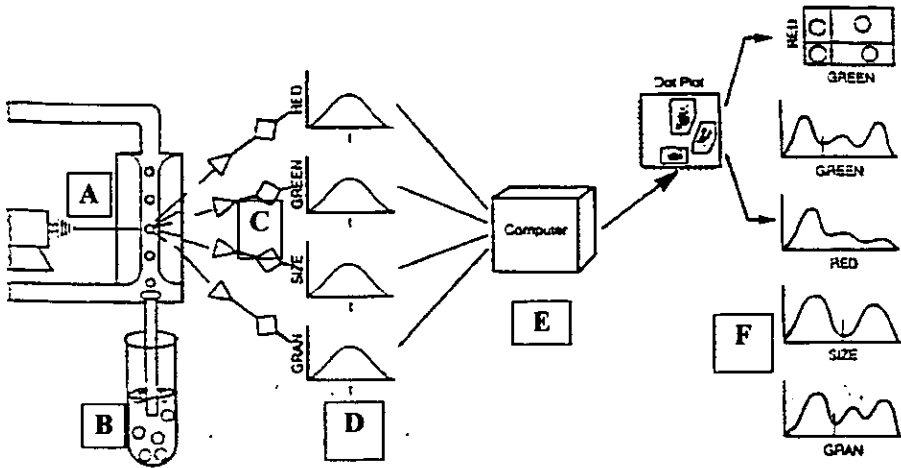


FIGURA 4. Diagrama general de la captura y análisis de resultados. A. luz incidente, B. suspensión celular, C. filtros para detectar diferentes marcas, D. resultados, E. computadora, F. integración de resultados (tomado de FACSTM Training Manual).

3.0 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo y maduración del sistema inmunológico intestinal es una importante adaptación de protección para la vida postnatal y la sobrevivencia de los suidos, por lo tanto, es importante conocer lo que sucede en el ambiente intestinal en el periodo después del destete (6-12 semanas en el cerdo) para entender los aspectos involucrados en la maduración de los animales y determinar la edad óptima de inmunización.

Por otro lado, estudiar al sistema inmunológico mucosal en condiciones de infección o enfermedad, proveería de información valiosa acerca de su fisiología y de los mecanismos de defensa del hospedero, la relación parásito-hospedero, la expresión y modulación de la fisiopatología de las infecciones de las superficies mucosales.

Se han reportado datos respecto a las proporciones celulares de diferentes órganos del cerdo, en condiciones normales o ante la infección con *T. spiralis*, pero la mayoría se refieren al sistema inmunológico sistémico y pocos al intestinal (Ivanoska *et al.*, 1990; Rothkotter *et al.*, 1994; Gerencer *et al.*, 1992). De aquí la importancia de investigar lo que sucede con el sistema inmunológico tanto local como sistémico, ante la presencia de un parásito como *Trichinella spiralis*, que en su ciclo de vida involucra los dos sistemas y siendo el cerdo el hospedero definitivo y un buen modelo para el estudio de la inmunología local; que puede proporcionar conocimientos que nos sugieran lo que pudiese ocurrir en el humano infestado por *Trichinella spiralis*.

5.0 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la maduración y el efecto de la infección experimental con *Trichinella spiralis* sobre el sistema inmunológico porcino.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar los métodos de separación de células del sistema inmunológico intestinal porcino por citometría de flujo (FACS).

Analizar por citometría de flujo la maduración del sistema inmunológico porcino en animales destetados de 6 a 12 semanas de edad.

Evaluar el efecto de la infestación con *Trichinella spiralis* sobre el sistema inmunológico porcino.

4.0 HIPÓTESIS

Las poblaciones celulares del sistema inmunológico porcino sufren cambios como consecuencia de la maduración normal del animal y ante la infestación con *Trichinella spiralis*.

5.0 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la maduración y el efecto de la infección experimental con *Trichinella spiralis* sobre el sistema inmunológico porcino.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar los métodos de separación de células del sistema inmunológico intestinal porcino por citometría de flujo (FACS).

Analizar por citometría de flujo la maduración del sistema inmunológico porcino en animales destetados de 6 a 12 semanas de edad.

Evaluar el efecto de la infestación con *Trichinella spiralis* sobre el sistema inmunológico porcino.

4.0 HIPÓTESIS

Las poblaciones celulares del sistema inmunológico porcino sufren cambios como consecuencia de la maduración normal del animal y ante la infestación con *Trichinella spiralis*.

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. PARÁSITOS

El ciclo del parásito *Trichinella spiralis* se mantuvo en ratas Wistar hembras de 2-3 meses de edad infectadas oralmente con 5000 LM, las cuales se sacrificaron a las cinco semanas postinfección. Diez gramos de masa muscular se digirieron con jugo gástrico artificial (solución de ácido clorhídrico (HCl) al 1% y pepsina al 1%) y se obtuvieron las larvas musculares, se contaron y con ello se ajustó la cantidad de carne que se les administró a los cerdos para que se infestaran (Murrell *et al.*, 1984).

6.2. ANIMALES E INOCULACIÓN

Se utilizaron 5 camadas de 6 semanas de edad, de 10 cerdos híbridos destetados (Hampshire X Landrace) cada una, provenientes de una granja sin antecedentes de enfermedades zoonóticas y que no vacuna a sus animales contra fiebre porcina clásica y enfermedad de Aujeszky. Los animales fueron mantenidos en condiciones óptimas de alimentación y temperatura hasta su adaptación postdestete en el bioterio del CINVESTAV.

De cada camada 5 cerdos se inocularon por vía oral con carne de rata infestada, a razón de 700 larvas musculares (LM) de *Trichinella spiralis* por kilogramo de peso (aproximadamente de 6000 a 7000 LM por cerdo) y los otros 5 cerdos se mantuvieron como controles sin infestar.

6.3. TOMA DE MUESTRAS

Los cerdos se sacrificaron por parejas de cada camada (1 control y 1 experimental); los días 2, 5, 15, 25 y 40 postinfestación; con una sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico (Anestosal, Smith Kline-Beecham, México) y posterior desangrado. Se tomaron de cada animal muestras de sangre periférica, por venipunción de la yugular; de ganglio linfático mesentérico (GLM), bazo y la parte proximal del intestino delgado (10-15 cm) después del píloro.

La sangre se obtuvo utilizando heparina (100 UI/ml) como anticoagulante; los intestinos (duodenos), GLM y bazos se transportaron en solución salina balanceada de Hanks sin calcio ni magnesio (HBSS⁻) y con gentamicina (40 µg/ml) a 4°C.

6.4. COMPROBACIÓN DE LA INFECCIÓN

Para comprobar la infección con el parásito, se realizó una digestión, con jugo gástrico artificial (ver anexo I), de muestras de tejido muscular (diafragma, lengua y maseteros) de los cerdos sacrificados de las semanas 25 a 40. A la vez se recolectaron porciones de intestino delgado (yeyuno) para buscar macroscópicamente la presencia de parásitos adultos. Además se hicieron cortes histológicos de intestino para buscar al parásito dentro de las vellosidades (Fig 16).

6.5. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE LOS DIFERENTES ÓRGANOS.

6.5.1 Bazo, GLM y sangre. El bazo y GLM se cortaron en pedazos pequeños y se maceraron pasándolos a través de una malla de metal estéril, eliminando los pedazos grandes de tejido, por filtración en tela de organza estéril, las células obtenidas se mantuvieron en HBSS a 4°C. La suspensión de células del bazo (diluidas 1:10 en HBSS), y la sangre (diluida 1:2 con HBSS) se estratificaron en Ficoll-diatrizoato de sodio (ver anexo I) con densidad específica de 1.077 g/cm³ y se centrifugaron a temperatura ambiente por 45 min a 900 x g. Las células de la interfase se recuperaron y lavaron 2 veces con RPMI incompleto para finalmente resuspenderlas en medio RPMI-1640 completo (ver anexo I), conservándolas en baño de hielo hasta su uso (Böyum, 1976).

6.5.2 Duodeno. Las células de la parte proximal del intestino se obtuvieron evertiendo un segmento de 10 cm para dejar expuesta la mucosa. El intestino evertido se amarró de un extremo y se llenó con HBSS hasta que los pliegues de la mucosa se distendieron y entonces se amarró el otro extremo; éstos segmentos se incubaron en 200 ml de HBSS con ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 1 mM para obtener las células del epitelio), por 75 min a 37°C en agitación constante (200 r.p.m.). Las células del sobrenadante se lavaron 2 veces con RPMI-1640 para eliminar el EDTA y se resuspendieron en Percoll isotónico al 40% (ver anexo I) que se estratificó sobre Percoll isotónico al 80% y se centrifugaron 30 min. a 900 x g a temperatura ambiente, con la finalidad de eliminar la mayoría de las células epiteliales, moco y detritus celulares. Las células de la interfase fueron recuperadas, se lavaron 2 veces por centrifugación y se resuspendieron en RPMI-1640 completo; se hicieron

dos incubaciones más del intestino con HBSS⁻ y EDTA para eliminar toda la superficie epitelial (Davies *et al.*, 1981; Mosley *et al.*, 1992; Castillo, 1997).

Para obtener las células de la LP intestinal se hicieron 2 incubaciones adicionales del segmento, de 60 min. cada una, con RPMI-1640 con 100 UI/ml de colagenasa tipo V (SIGMA, C-9263) y gentamicina (50 µg/ml) a 37°C y con agitación a 200 r.p.m., posteriormente se pasaron por un gradiente de Percoll isotónico (40-80%), se recuperó el paquete celular de la interfase, que se lavó y las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 completo (Figura 5). Se determinó el número y viabilidad de todas las células con azul de tripan al 0.4% en SSF, en un hemocitómetro (Harriman *et al.*, 1992; Bailey *et al.*, 1994; Castillo, 1997).

6.6. ANTICUERPOS MONOCLONALES.

En el cuadro 1 se muestran los anticuerpos monoclonales anti-cerdo, previamente caracterizados y utilizados en los experimentos donados amablemente por la Dra. J. Lunney (USDA) y el Dr. M. Bailey (Universidad de Bristol, Reino Unido (RU)) (Pescovitz *et al.* 1984)..

ANTICUERPO (Sobrenadante de cultivo)	CLONA	CLASE	DILUCIÓN EMPLEADA
Panel para detectar linfocitos T			
anti-CD2	MSA-4	IgG2b	1:20
anti-CD4	74-12-4	IgG2b	1:10
anti-CD8	76-2-11	IgG2a	1:2
Para detectar linfocitos B			
anti-IgM	K52IC3	IgG1	1:5
Para detectar otras células de interés inmunológico.			
Anti-SLA-II (DR)	MSA-3	IgG2a	s/diluir
anti-monocitos, macrófagos y granulocitos.	74-22-15	IgG1	s/diluir

Cuadro 1. Anticuerpos monoclonales utilizados; con sus respectivas clonas, isotipos y diluciones óptimas empleadas.

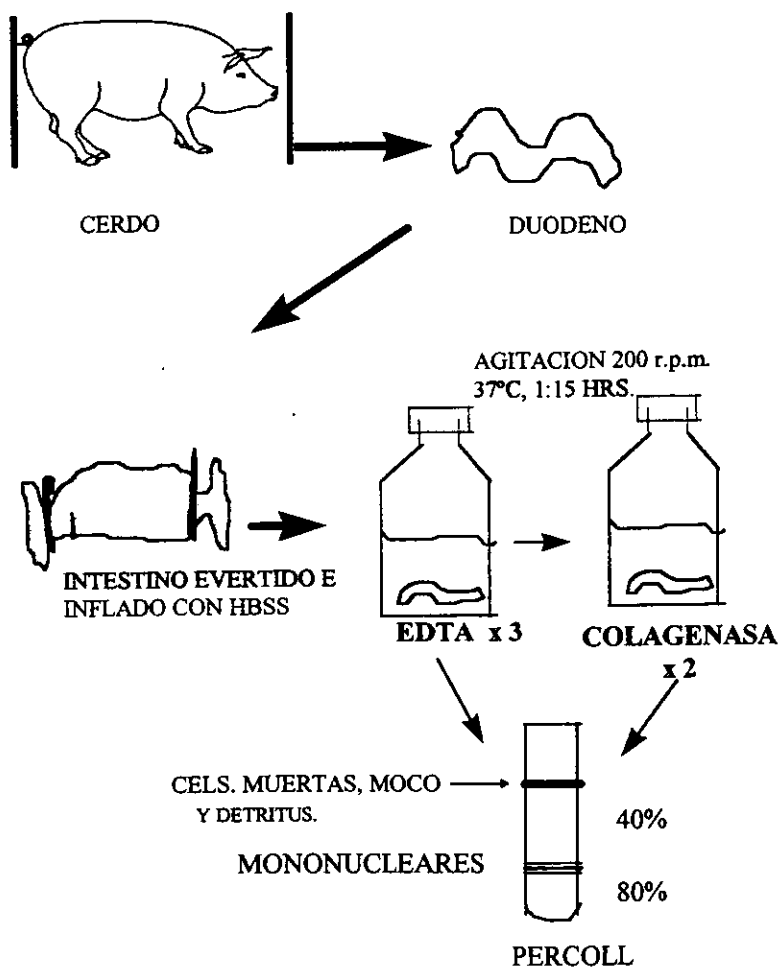


FIGURA 5. Esquema general del protocolo utilizado para la separación de células de epitelio y lámina propia intestinal porcinos (Castillo, 1997).

6.7. CONTEO DE CÉLULAS (RENDIMIENTOS)

El número total de células separadas de cada órgano (bazo, GLM, sangre; epitelio y LP de intestino) se relacionó con la cantidad de muestra utilizada para separar las células y con ello se obtuvieron los rendimientos (número de células obtenidas por mililitro o gramo de tejido) de las células recuperadas.

6.8. TINCIÓN Y LECTURA PARA CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS)

Por cada muestra a procesar se usaron de 1 a 2×10^6 células en total, con un control de células sin tefir y el control del anticuerpo secundario.

Primero se lavaron las células con solución amortiguadora de fosfatos con azida de sodio (PBA, ver anexo I), después del último lavado, las células se resuspendieron en el mínimo volumen y se incubaron con $20\mu\text{l}$ del anticuerpo monoclonal (sobrenadante de cultivo) a la dilución óptima, determinada previamente (cuadro 1), por 30 min a 37°C . Los MAb se titularon con células de animales sanos de seis meses de edad y se consideró como la dilución óptima del anticuerpo, donde se observó la mejor intensidad de fluorescencia en FACS. Transcurrida la incubación, las células se lavaron 2 veces por centrifugación a $400\times g$, con PBA; se resuspendieron en el mínimo volumen (aprox. $200\mu\text{l}$) y se incubaron con $100\mu\text{l}$ de un antisuero de cabra anti-inmunoglobulinas totales (anti-G.A.M.) de ratón, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA, No. cat. F-1010), diluido 1:400 en PBA. Finalmente se hicieron 2 lavados con PBA y las células se fijaron con 1 ml de p-formaldehído al 1% en PBS. Las muestras procesadas se conservaron a 4°C , protegidas de la luz, hasta su lectura (Figura 6). La unión inespecífica del anticuerpo secundario a las células incubadas, debida a receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas, se eliminó utilizando 2.5% de suero normal de cerdo en la solución de PBA. Todas las muestras se filtraron con tela de organza para eliminar partículas grandes que pudieran dañar el citómetro o interferir en los resultados.

La captura de datos se realizó en un citofluorómetro de flujo modelo FACSort (Becton Dickinson, Palo Alto, California) (Figura 7); se capturaron los datos de tamaño, complejidad interna o granularidad de la célula y fluorescencia con lo cual se pudieron definir poblaciones de células de interés como son linfocitos, macrófagos, células epiteliales y otras.

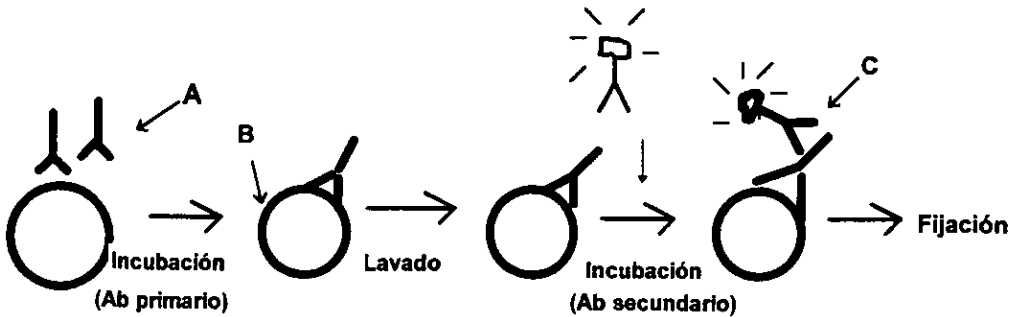


FIGURA 6. Tinción de inmunofluorescencia indirecta de células para citometría de flujo.

A. Anticuerpo monoclonal (MAb). B. Célula positiva al marcador. C. Anticuerpo secundario conjugado con FITC.

6.9. PROCEDIMIENTO PARA EL USO DEL CITOMETRO DE FLUJO (FACSort, BECTON DICKINSON)

El citómetro de flujo Facsort incluye una fuente de rayo láser de argón, un sistema de fluidos, detectores de emisión y desviación, y una computadora con el programa Lysys II (Becton Dickinson) para la adquisición y análisis de datos (Fig. 7). El sistema correlaciona cada célula, con alguno o todos los parámetros (tamaño, granularidad o intensidad de fluorescencia), permitiendo analizar todas las células capturadas o sólo células con características definidas.

6.9.1 PASOS PARA LA CAPTURA DE DATOS DEL CITÓMETRO DE FLUJO.

El siguiente es un resumen del procedimiento para el uso del aparato, para más detalles debe consultarse: *Lysys II Software User's Guide* y/o anexo II

- Verificar el volumen de la solución salina (anexo I) del sistema de fluidos (Fig. 7C) que debe ser llenado hasta tres cuartas partes del recipiente como máximo. Vaciar el recipiente de desechos y también agregar 50 ml de solución de hipoclorito de sodio al 1% v/v en agua.
- Encender el equipo en el siguiente orden: impresora, citómetro de flujo y la computadora. Eliminar las burbujas del sistema de fluidos tanto de los recipientes contenedores como del sistema de captura de células y poner la válvula de control en **STANDBY** (Fig. 7E). Esperar hasta que aparezca el menú principal (**MASTER PAGE**) de la computadora.
- El citómetro se calibra con el programa **AutoCOMP** y utilizando esferas **BD's CaliBRITE** (ver manual del usuario).

- d. Es recomendable formatear los discos de 3 ½ pulgadas (9 cm) antes de iniciar la captura de datos, desde la ventana de BD en el comando FILE UTILITIES.
- e. Entrar al programa LYSYS II y de éste al modo ACQ (adquisición). Desplegar las ventanas principales que se van a utilizar (Fig. 8) dependiendo del tipo de tinción o captura de células (para más detalles ver Lysys II Software User 's Guide, Parte II).
- f. Para establecer los parámetros óptimos de captura, el sistema se coloca en NOT SAVED del modo SETUP; en caso de no hacerlo los datos se grabarán sin ajuste y la captura no representará el patrón celular adecuado.
- g. Remover el tubo de agua desionizada del sistema de captura de muestra (Fig. 7J), y colocar la válvula de fluido (Fig. 7E) en RUN. Resuspender las células control sin teñir y colocar el tubo en el citómetro. Oprimir en BEGIN en el menú de la computadora y realizar los ajustes de los parámetros requeridos ayudándose del gráfico de tamaño contra granularidad hasta obtener el patrón poblacional óptimo (Figura 8A). Los parámetros principales son: TRESHOLD (umbral), FSC (tamaño), SSC (granularidad), FL1, FL2 (intensidad de fluorescencia) (Fig. 8C), y compensación (Fig. 8B).
- h. Establecer otros valores importantes como son: Número de eventos adquiridos (normalmente 10,000), unidad donde se grabarán los datos (#11 para disco duro, #3 para disco flexible), región que se quiera capturar, nombre del archivo. Para detalles de como ajustar estos valores ver el manual del usuario (FACSort™ Training Manual).
- i. Cambiar del modo SETUP a estado normal en el menú de la computadora, colocar el tubo muestra en el citómetro y oprimir BEGIN, para iniciar la captura.
- j. Remover el tubo una vez adquirida completamente la muestra. Reemplazar con una nueva muestra, oprimir BEGIN de nueva cuenta y así sucesivamente.
- k. Al finalizar las adquisiciones, se lava el sistema con hipoclorito de sodio al 1% v/v en agua, colocando un tubo con 2-3 ml de la solución y poner la válvula en RUN durante 1 a 2 minutos. Finalmente se coloca un tubo con agua desionizada, se lava el sistema durante 10 min. y se apaga el citómetro y la computadora.
- l. Los datos capturados pueden ser analizados desde el programa LYSYS II ver 1.1 o sus similares como WINMDI version 2.2 o mayor para windows PC (ver Lysys II Software User 's Guide y/o anexo II).

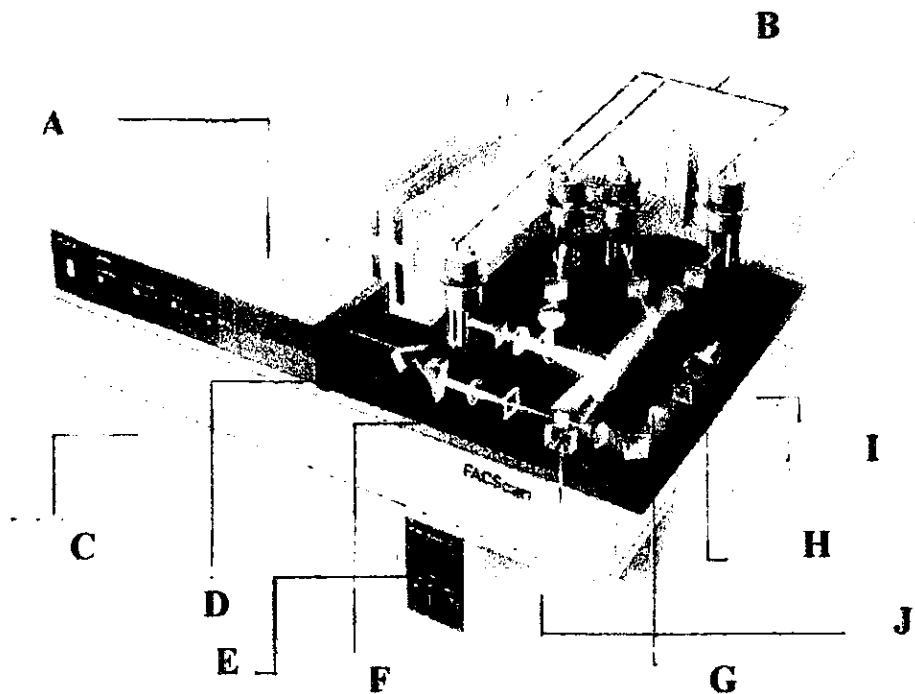


FIGURA 7. Esquema de las partes principales del citómetro de flujo.

- A. Fuente de rayo LASER.
- B. Detectores de señales (sistema electrónico).
- C. Sistema de fluidos.
- D. Filtro del rayo laser.
- E. Controles del citómetro.
- F. Punto intersector de la muestra y el rayo LASER.
- G. Filtro 1 de rayo desviado por la muestra (sistema óptico).
- H. Filtro 2 de rayo desviado por la muestra (sistema óptico).
- I. Sistema de presión positiva.
- J. Tubo con la muestra.

2.10. ANÁLISIS DE RESULTADOS EN EL CITOMETRO DE FLUJO

Se utilizó el programa Lysys II versión 1.1 para obtener los porcentajes de los diferentes marcadores encontrados en las poblaciones celulares separadas. Primero se determinaron las poblaciones celulares que serían analizadas, formando regiones que delimitaban a una población de otra (figuras 14 y 15). De cada población se determinó el porcentaje positivo de cada marcador celular midiendo la intensidad de fluorescencia específica con respecto a las células sin teñir (figura 9).

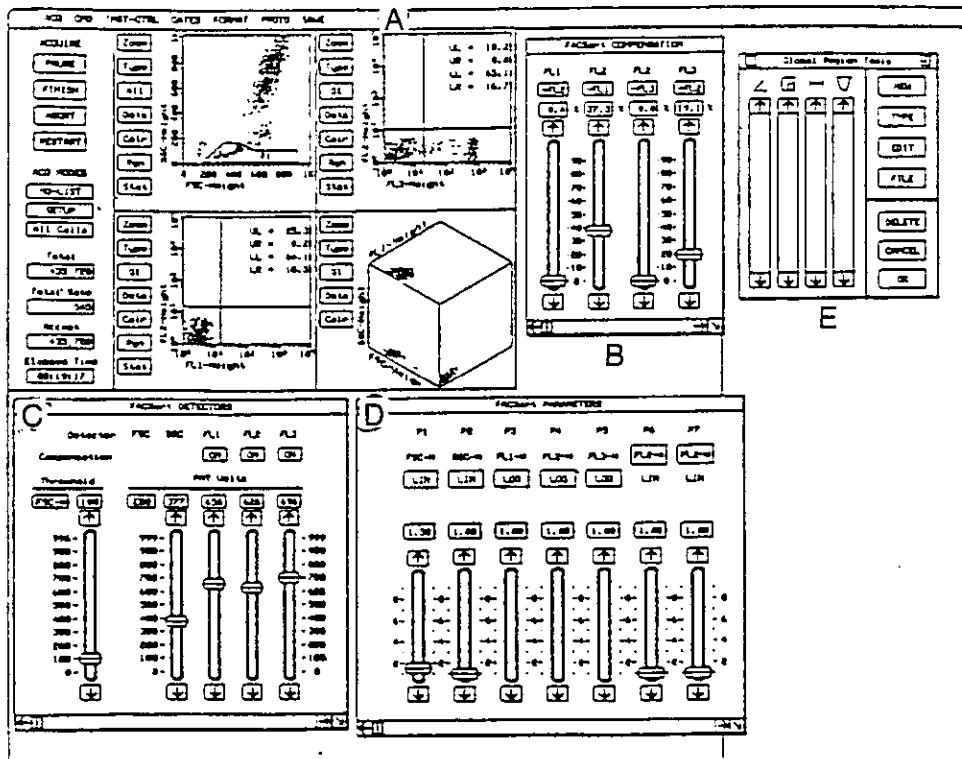
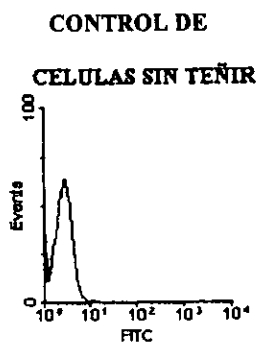
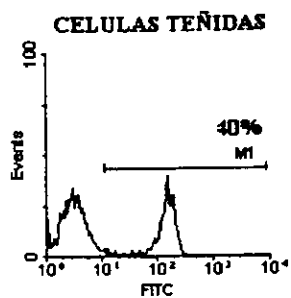


FIGURA 8. Esquema de la ventana de la computadora donde se establecen los parámetros para capturar los datos por FACS. A. Ventana de control de captura, B. Compensación, C. Detectores, D. Parámetros. E. Creador y modificador de regiones



A



B

FIGURA 9. Ejemplo de la obtención de las proporciones de los diferentes marcadores celulares por citometría de flujo. En A se muestra el histograma de fluorescencia de células control que no se tiñieron. En B se muestra el porcentaje de linfocitos teñidos con un marcador.

7.0 RESULTADOS

7.1. RENDIMIENTO DE CÉLULAS

Los resultados del rendimiento de células de sangre, GLM, bazo, epitelio y LP intestinal porcina de cuatro experimentos se presentan en la figuras 10 y 11, de donde se puede observar que se obtuvieron un promedio de 2 a 3 millones de células mononucleares por mililitro de sangre, de 50 a 100 millones de células por gramo de GLM, de 10 a 20 millones de células mononucleares por gramo de bazo, de 2 a 3 millones de células epiteliales por gramo de intestino y de 7 a 10 millones de células de la LP por gramo del duodeno. No se detectaron cambios con significancia estadística en el rendimiento de obtención de células, ni con la edad, ni entre los animales control e infestados. Sin embargo se observaron algunas tendencias como en el rendimiento de células de sangre, en el grupo de animales infestados, que fue ligeramente mayor que en los animales control en la mayoría de los días de análisis (Fig. 10A). Respecto al intestino (Fig. 11) se pudo ver una tendencia al aumento en la recuperación de las células de la LP con la edad, pero al día cuarenta de haber iniciado el experimento la recuperación decayó (Fig. 11B), algo parecido se aprecia en los valores de GLM (Fig. 10B) en donde hasta el día 15 postinfestación se vió una tendencia a aumentar el rendimiento de células por gramo de tejido en animales sin infectar, pero los restantes días 25 y 40 el rendimiento disminuyó. Los rendimientos de células obtenidas de un solo lavado del epitelio intestinal y de sangre fueron los menores de todos los órganos (Fig. 10A y 11A).

7.2. PROTOCOLO DE SEPARACIÓN DE CÉLULAS INTESTINALES

En la figura 12 se presentan los cortes histológicos de: a) duodeno normal, b) intestino después del tratamiento con EDTA y c) intestino después de dos lavados con colagenasa, utilizada para la obtención de las células de la LP. Se observa que el epitelio de la vellosidad se eliminaba con el tratamiento con el EDTA, finalmente después de tres lavados fue eliminado totalmente y sólo quedó la LP; también se observa que la enzima disgregó el tejido hasta la zona de las criptas del intestino después del tratamiento con colagenasa.

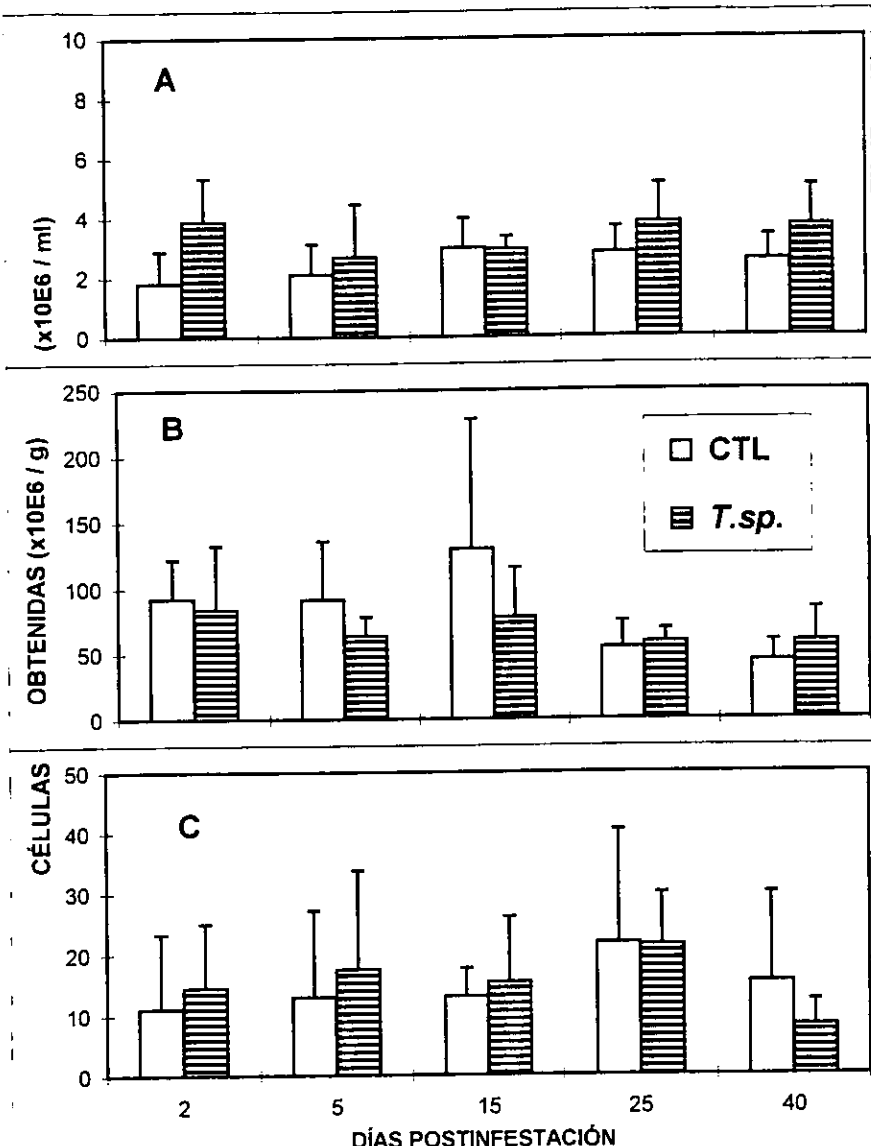


FIGURA 10. Rendimientos de células porcinas obtenidas de sangre (A), ganglios linfáticos mesentéricos (B) y bazo (C), a los 2, 5, 15, 25 y 40 días postinfestación. Las barras representan el promedio de cuatro experimentos +/- DE. □ animales control, ▨ animales infestados con *T. sp.* Cada una de las gráficas tienen escalas diferentes en el eje de las ordenadas. Ver detalles del experimento en el texto.

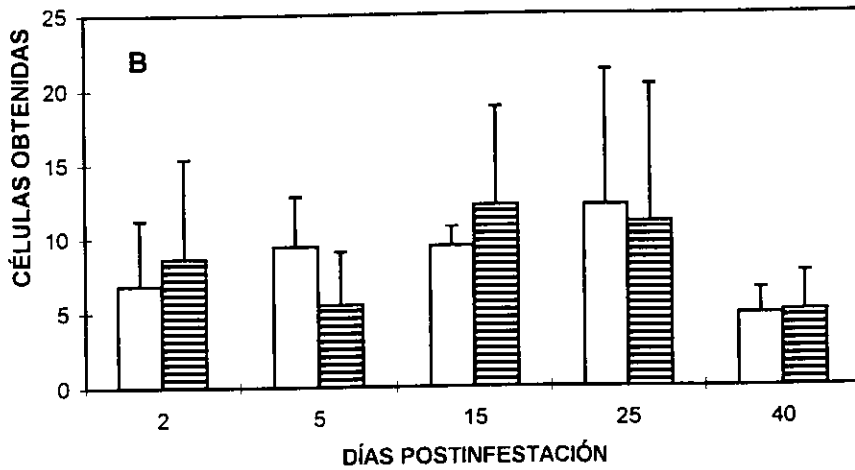
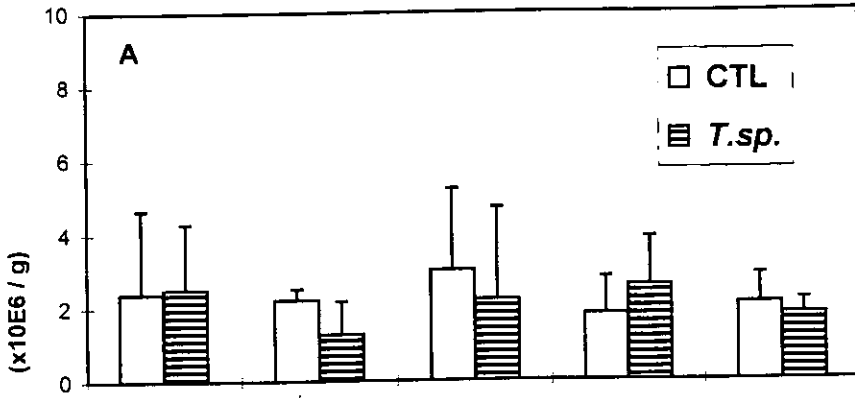


FIGURA 11. Rendimientos de células porcinas obtenidas de epitelio (A) y lámina propia intestinal (B), a los 2, 5, 15, 25 y 40 postinfestación con *T.sp.* Las barras representan el promedio de cuatro experimentos +/- DE. □ animales control, ▨ animales infestados con *T. sp.* Cada una de las gráficas tienen escalas diferentes en el eje de las ordenadas. Ver detalles del experimento en el texto.

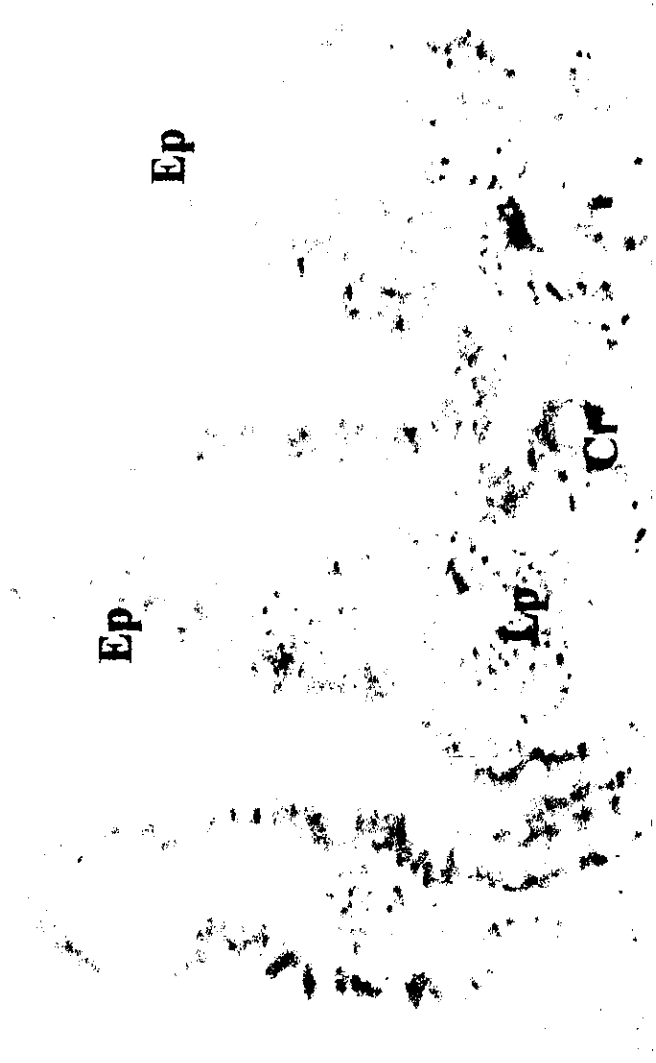


Figura 12a. Corte histológico de intestino normal porcino, antes del tratamiento para extracción de células. Ep=epitelio, Lp=Lámina propia, Cr=criptas (10x).

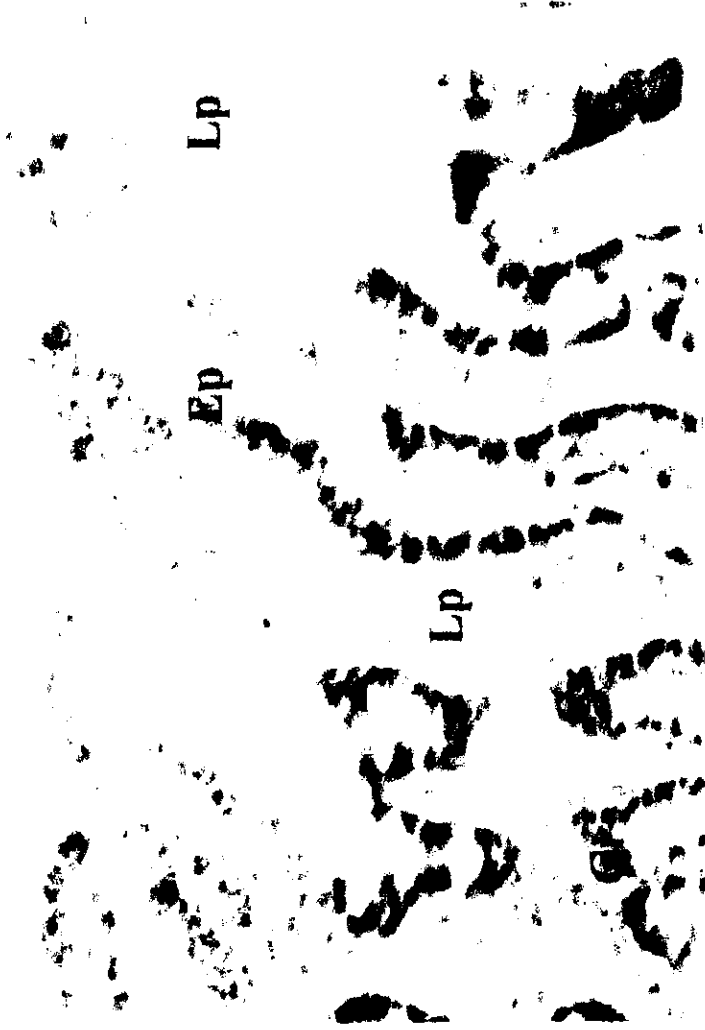


Figura 12b. Corte histológico de intestino después de un lavado con EDTA. Ep=epitelio
Lp=Lámina propia, Cr=Criptas (10x).



Figura 12c. Corte histológico de intestino después de dos lavados con colagenasa.
Lo=linfocitos (10x).

7.3. CÉLULAS RECUPERADAS

Se realizaron frotis de las células recuperadas tanto del epitelio como de la LP del duodeno porcino, con el fin de identificar el tipo de células que se obtuvieron en la extracción. Por lo que respecta a las células del epitelio (Fig. 13a) se observaron proporciones similares de linfocitos y de células epiteliales (~50%), estas últimas envueltas en moco; en tanto que los que se recuperaron de la LP (Fig. 13b) se encontraron linfocitos y células epiteliales aunque estas últimas en menor proporción (~20%) que las encontradas en los frotis del epitelio. También se pudieron ver monocitos o macrófagos intestinales y otras células de diferente tamaño y forma cuya identificación por microscopía no fue clara. Por otra parte, de las células obtenidas de sangre, GLM y bazo, se pudieron observar en los frotis, que al menos 95% fueron linfocitos y 4% monocitos y/o macrófagos.

7.4. PROPORCIONES DE CÉLULAS POR ÓRGANO Y POR REGIONES

En las gráficas de puntos (DOT-PLOT) obtenidas de los diferentes órganos en el citómetro de flujo, se obtuvieron patrones celulares particulares, los cuales se analizaron por regiones y subregiones según el tamaño, granularidad y cantidad de células. Para hacer un análisis más preciso de estas regiones, se decidió hacer diagramas de contornos o curvas de nivel (Fig. 14 y 15), así se obtuvieron diferentes agrupaciones celulares en donde las regiones y subregiones se designaron por tener una forma y tamaño característicos que las diferenciaban.

En sangre se analizaron una región total y tres subregiones incluídas en la anterior que se diferenciaban por su tamaño. Las células de la subregión 1 (R1) eran las más pequeñas y las de la subregión 3 (R3) las más grandes (Fig. 14A). Lo mismo se hizo con las células de GLM donde también se analizaron la región total y dos subregiones (Fig. 14B). En las células de bazo se delimitaron dos subregiones, donde la R1 era de células pequeñas y poco granulares en comparación con la R2 que fue de las células más grandes y granulares.

Por lo que respecta a las células del intestino, se realizaron y analizaron tres subregiones tanto para las poblaciones del epitelio como de la lámina propia (Fig. 15). En el epitelio la R1 y la R2 se diferenciaron por el tamaño de las células, pero en la R3 la diferencia radicó principalmente en la granularidad de las células que fue muy grande. La

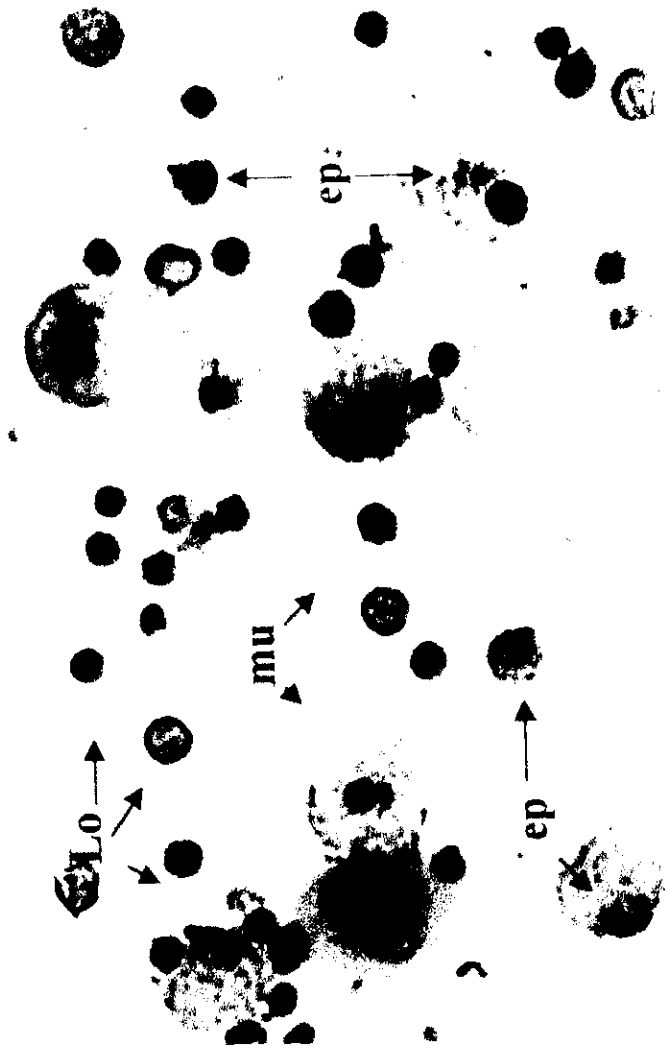


Figura 13a. Frotis de células obtenidas del epitelio intestinal porcino, después un gradiente de Percoll. Lo=linfocitos, ep=células epiteliales, Mo=monocitos, mu=moco (40x).



Figura 13b. Frotis de células obtenidas de la lámina propia intestinal porcina, después un gradiente de Percoll. Lo=linfocitos, ep=células epiteliales, Mo=monocitos, mu=moco (40x).

región total analizada estuvo comprendida por las subregiones R1 y R2 (Fig. 15A), la R3 se excluyó ya que no presentaba proporciones significantes a los diferentes marcadores estudiados. Las subregiones de la LP se establecieron con base al tamaño de las células, siendo la R3 la que contenía las células más grandes y disminuía este parámetro gradualmente en las R2 y R1. La región total se conformó de las tres regiones mencionadas (Fig. 15B).

Es necesario aclarar que se hizo la captura de 10,000 células por órgano y por marcador, pero al formar las diferentes subregiones de células de los órganos se eliminaron todas aquellas células que no formaban una determinada agrupación en particular (subregión) y se encontraban dispersas en toda la gráfica. Por esto mismo el número de células totales no llega a las 10,000 que se capturaron, esto se hizo por que se consideró que esas subregiones no impactaban de forma importante, por la cantidad, en el análisis global de proporciones de las poblaciones.

7.4.1. PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN SANGRE

La mayor cantidad de células (en promedio $n=7200$) se encontró en la R1 donde las células en mayor proporción fueron CD2+ (65-75%), de las cuales se detectaron más CD8+ (35-45%) que CD4+ (25-30%), casi no se observaron células SLA-II+ y solo bajas proporciones de MO/PMN e IgM+. En la R2 las células predominantes fueron las SLA-II+ (25-60%) y existieron pocos linfocitos CD2+, pero la proporción entre CD8+ y CD4+ se mantuvo como en la R1 (CD8+ > CD4+). Aquí se encontraron mayores proporciones de MO/PMN y células IgM+ que en la subregión 1. En la R3, cuyo número de células fue pequeño, detectamos altas proporciones de células CD2+ (45-65%), MO/PMN (30-60%) e IgM+ (30-60%), también existió una considerable cantidad de células SLA-II+ (20-40%), la suma de las células CD4+ y CD8+ fue mayor que las de CD2+ sugiriendo la presencia de células dobles positivas (DP) en esta subregión (CD4+CD8+) (Fig. 14a).

7.4.2. PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN GLM

En la R1 (en promedio $n=5300$) predominaron las células CD2+ (60-80%) con una relación de casi dos a uno entre las células CD8+ y las CD4+, aunque la suma de estas células no llegó al número de las CD2+, por lo que deben existir células CD2+CD4-CD8-

(dobles negativas, DN). Así mismo la suma de las células IgM+ y MO/PMN no alcanzó el total de células SLA-II+ por lo que se presupone la existencia de otras células que expresan este marcador. En la R2 la situación fue diferente, ya que la mayor proporción de células fue SLA-II+ y la suma entre las células que se piensa lo contengan (MO y IgM+) dió la cantidad esperada, mientras que la suma entre las CD4+ y las CD8+ no llegaron al total de las CD2+, lo que también sugiere la presencia de células DN (Fig. 14b).

7.4.3. PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN BAZO

En la R1 ($n=6800$), 55-70% fueron células CD2+ con proporciones semejantes entre las CD4+ (30%) y CD8+(35%), se detectaron muy pocos MO/PMN (5%). En la R2 hubo una alta proporción tanto de células CD2+ (30-60%) como de células SLA-II+ (40-65%), en lo que respecta a esto último, la suma de MO/PMN e IgM+ no llegó al total de SLA-II+ (Fig. 14c).

7.4.4. PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN EPITELIO INTESTINAL

La región de células totales ($n=3600$) estuvo compuesta principalmente por la R1 y se observó claramente que en esta región existió una alta proporción de células CD2+ (75-90%) constituida a su vez en su mayoría por células CD8+ (60-80%). Se presupone una población de células DN, pues la suma de CD4+ y CD8+, tanto en la R1 como en la R2, no dió el total de células CD2+. A su vez se encontró una alta proporción de células SLA-II+ (20-50%) y muy baja de CD4+ (5%), MO/PMN (<2%) e IgM+(<4%). Se distinguió una situación similar en la R2, pero aquí se detectó un mayor porcentaje de células IgM+ (5-7%) y de macrófagos/PMN (5-15%). En la R3, debido al mínimo porcentaje de células positivas a los marcadores analizados, se estimó constituida principalmente por células epiteliales. Para verificar esta aseveración se analizó su granularidad en un diagrama de curvas de nivel (CONTOUR-PLOT) la cual fue muy alta, aspecto que tienen todas las células epiteliales (Fig. 15a). Esta subregión tuvo una cantidad importante de células que se consideran epiteliales (2200) del total de células analizadas (5800).

7.4.5. PROPORCIONES DE CÉLULAS OBTENIDAS EN LÁMINA PROPIA

Se encontraron más células en la R2 (3200 en promedio) seguida de la R1 (2500) y la R3 (500). En la R1 las células predominantes fueron CD2+ cuya proporción llegó hasta

90%, de donde las CD4+ y CD8+ se dividieron en proporciones semejantes (35-50%, 30-40%). Se detectaron MO/PMN e IgM+ en bajo porcentaje y 20-40% de células SLA-II+, estos datos sugieren la presencia de gran cantidad de células con marcador de activación (SLA-II+) en esta subregión que no fueron ni macrófagos ni LB, pues las proporciones obtenidas de estos últimos marcadores no fueron significativas. Ahora bien, en la R2 se observaron porcentajes de 30-50% de células CD2+ y sólo 5% de CD4+ y CD8+ por lo que existió una cantidad importante de células DN en este nicho. Como las proporciones de las células IgM+ y SLA-II+ fueron semejantes (20-30%, 25%) se podría asumir que fueron las mismas y lo que refuerza esta hipótesis es que se detectaron muy pocos MO/PMN (<5%). En la R3 las proporciones de células CD2+ llegaron hasta 35%, mientras que las SLA-II+ alcanzaron 30%, pero en cantidad fue la región menos poblada (500) (Fig. 15b).

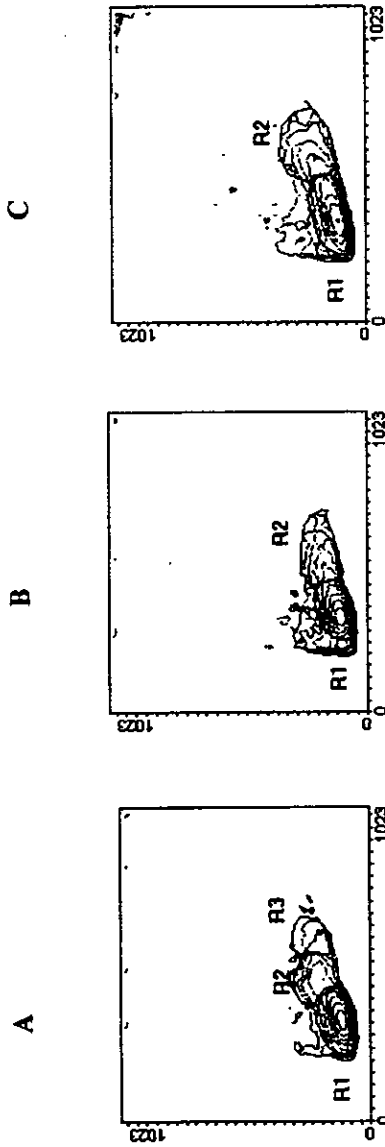
7.5. CRITERIO PARA EL ANÁLISIS DE CAMBIOS EN LAS SUBPOBLACIONES CON LA EDAD (MADURACIÓN)

Debido a que en la mayoría de los resultados individuales no se encontraron diferencias estadísticamente significantes entre los animales infestados y los controles; se decidió hacer el análisis del efecto de la edad, en las diferentes subpoblaciones de células de los órganos, integrando los resultados de ambos grupos de animales cuando entre ellos no hubiera diferencia significativa y de esta manera tener una cantidad más representativa de datos a evaluar. Para hacer el análisis estadístico de muestras pequeñas se utilizó la prueba t de Student no pareada, utilizando una distribución de dos colas y obteniendo los datos considerando las muestras con varianzas diferentes para el caso de la edad y una prueba t de Student pareada con una distribución de una cola para el análisis entre grupos de animales infestados y no infestados (Spiegel, 1985).

7.6. CAMBIOS DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES CON LA EDAD

7.6.1. SANGRE. Se encontraron aumentos ($P < 0.01$) de la sexta con la décimo segunda semana de edad en los marcadores CD2 y CD8 en la región total; en las CD8+ en la R1 y en las CD2+ en la R2 (Cuadro 2). En cambio, se observó disminución ($p < 0.05$) en el porcentaje de células IgM+ en las R1, R3 y en los MO/PMN en la R2 ($p < 0.001$).

G R A N U L A R I D A D

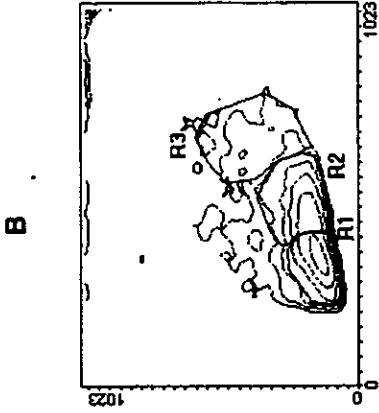


TAMAÑO

REGIONES	a			b		c	
	1	2	3	1	2	1	2
No. DE CÉLULAS	8900	1400	300	5300	1300	7800	1000
CD2	65-75	25-35	45-60	60-80	30-50	40-65	55-70
CD4	25-30	10-15	30-40	20-25	5-10	30-35	35
CD8	35-45	15-20	25-40	30-40	10-15	15-30	25-30
SLA-II	5-10	25-65	20-40	30-45	50-70	20-40	25-35
MO/PMN	10-20	15-30	30-60	15-20	30-45	< 5	5
IgM	10-15	15-30	30-60	10-15	15-30	15-20	15-20
TOTAL (R1+R2+R3)	7200	1400	300	6600	1300	7800	6800
%							
TOTAL (R1 + R2)							
%							

FIGURA 14. Ejemplo de las regiones analizadas por citometría de flujo de las proporciones celulares de tejidos de cerdos de 6-12 semanas de edad. En la parte superior se muestran los diagramas de contornos (contour plot) de las poblaciones celulares totales y subdivididas en subregiones (R) obtenidas de sangre (A) (tres subregiones); ganglio linfático mesentérico (B) (dos subregiones) y bazo porcino (C) (dos subregiones). Los valores de los ejes de los gráficos son arbitrarios. En la parte inferior se muestra el cuadro tipo de proporciones de las regiones de a sangre, b GLM y c bazo. El total de células analizadas fue de 10000. Los marcadores celulares se identificaron con MAb.

G R A N U L A R I D A D



TAMAÑO

a

REGIONES	TOTAL (R1+R2)	1	2	3	TOTAL (R1+R2+R3)	1	2	3
Nº. DE CÉLULAS	3600	3300	300	2200	6200	2500	3200	500
CD2	70-90	75-90	60-90	<3	50-70	70-90	30-50	20-35
CD4	<5	<5	5-8	<3	15-25	35-50	5	5-10
CD8	70-80	55-80	50-80	<3	15-25	30-40	5	10-15
SLA-II	20-50	20-50	30-60	<4	15-30	20-40	25	15-30
MO/PMN	<3	<2	5-15	4-7	<5	<5	<5	10
IgM	<4	<4	5-7	<4	10-25	3-8	20-30	10-20

b

FIGURA 15. Ejemplo de las regiones analizadas por citometría de flujo de las proporciones celulares de intestino de cerdos de 6-12 semanas de edad. En la parte superior se muestran los diagramas de contornos (contour plot) de las poblaciones celulares totales y subdivididas en subregiones (R) obtenidas de epitelio (A) (tres subregiones) y lámina propia (B) (tres subregiones). En la parte inferior se muestra el cuadro tipo de proporciones de las regiones de a epitelio intestinal y b lámina propia. El total de células analizadas fue de 10,000. Los marcadores celulares se identificaron con MAb.

En la R3 se detectó una disminución de células SLA-II+ a la semana 7 de edad en comparación con las demás semanas analizadas ($p < 0.05$) (cuadro 2).

7.6.2. GLM. No se observaron cambios al analizar la región de células totales pero se detectaron disminuciones en las proporciones de células CD2+, CD4+ y CD8+ en la R2, de la semana 7 a la 12 ($p < 0.001$) (cuadro 3).

7.6.3. BAZO. Solo se observó una disminución con la edad (semanas 6 a la 12) en la proporción de MO/PMN en la R1 sin llegar a ser significativa. En todas las demás regiones y marcadores no se detectaron cambios importantes (cuadro 4).

7.6.4. EPITELIO INTESTINAL. En la región total (R1 y R2) se observaron cambios significativos ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente) en las células SLA-II+, la proporción con la edad en la decimo segunda semana fue mucho menor que la sexta. En cambio, en la R1 se detectó que las proporciones de células CD2+ y CD8+ aumentaron ($p < 0.001$) de la semana 6 a la 12 de edad. No se encontraron cambios significativos en las proporciones de los demás marcadores (cuadro 5).

7.6.5. LÁMINA PROPIA INTESTINAL

Los cambios con la edad que se observaron en algunos marcadores de la región total fueron el reflejo de las R1 y R2. En la R1 se observó un aumento en la proporción de células CD2+ ($p < 0.01$), de la semana 6 a la 12 de edad. En la R2 hubo una disminución de células IgM+ ($p < 0.01$). En tanto, en la R1 se detectó una disminución significativa en las células SLA-II+ ($p < 0.001$) a las 7 semanas de edad y en la R2 de la semana 6 a la 12. En éstas células no se observaron cambios en la región total (cuadro 6). Es necesario comentar que la R3, que se muestra en la figura 15B, solo apareció en algunos animales, por lo que no se realizó el análisis estadístico correspondiente.

marcador/región

SEMANAS DE EDAD

	6		7		8		10		12	
	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE
REGIÓN TOTAL										
CD2	a**52.4	8,8	59,1	10	6,31	7,8	65,2	9,2	b**67.6	9,2
CD4	25,2	6,1	24,3	6,3	23,5	8,6	25,7	6	25,8	3,5
CD8	a**24.7	9,5	26,3	11,8	32,2	6,5	31,1	10	b**37.4	8
SLA-II	49,5	17	31,3	16,3	40,1	8,7	35,7	13,8	37,5	16,7
MO/PMN	8,7	3,6	8,5	6,4	5,7	3,2	8,5	7,6	6,7	4,5
IgM	16,2	7,4	17,9	9,4	14,1	7,7	16,1	5,4	10,9	3,9
SUBREGIÓN 1										
CD2	66,2	6,7	66	10,4	69,9	5,4	69,2	7,8	73,7	8,6
CD4	28,6	3,1	26,3	6,1	27,7	6,7	28,6	6,9	27,6	3,4
CD8	a**30.5	7,7	30,3	5,6	35,5	8,3	39,8	8	b**43	8,5
SLA-II	37,1	15,6	27	15,1	34,6	10,1	34,1	10,4	42,1	15,2
MO/PMN	4,9	2,7	2,1	1,8	1,5	1,7	2,1	1,5	3,6	4,4
IgM	a*15.0	6,7	13,9	5,8	16,4	7,3	13,6	4,4	b*3.9	2,5
SUBREGIÓN 2										
CD2 (5)	a**19.1	6,7	25,4	11,6	34,3	5,7	32,4	15	b**33.3	8,6
CD4	15,8	3,7	13,1	4	11,1	2,4	13	6,1	15,4	5,4
CD8 (5)	17,9	6,1	15,5	7,2	17,9	3,9	17,5	5,7	18,2	4,3
SLA-II	79,4	9,8	59,8	10,9	67,9	13,9	55,5	13,8	59,6	13,4
MO/PMN	42	12,5	a***50	19,3	45,8	13	13,7	15,1	b***22.5	7,8
IgM (5)	23,9	10,7	21	10	26,8	9,3	22,4	9,3	22,2	12,2
SUBREGIÓN 3										
CD2 (5)	57,6	8,5	62,8	6	57	9,2	48,3	10,4	55,3	10,5
CD4 (5)	41,4	7,1	36,8	6,6	35,5	9,5	35,3	14,9	39	14,1
CD8 (5)	34,9	7,1	33,1	7,7	33,5	6,7	24,9	7,2	41,8	16,4
SLA-II (5)	a*83.7	11,5	b*58.6	20,4	71,8	17,3	69,6	17,4	74,5	16,2
MO/PMN (5)	33,9	14,8	44,4	19,7	32,2	11,2	27,5	16,4	36,4	11,3
IgM (5)	a*53.0	19,2	b*20.9	10,9	26	17,7	38	9,2	b*25	17,7

CUADRO 2. Cambios con la edad en las subpoblaciones de células de sangre de cerdos.

Análisis por citometría de flujo de las regiones total y subregiones 1, 2 y 3, a las 6, 7, 8, 10 y 12 semanas de edad. El cuadro indica el porcentaje de células positivas al marcador de superficie detectado con MAb. Los valores son el promedio de 10 animales en la región total y subregiones 1, 2 y 3 +/- DE, excepto en donde se indica (5) que es el promedio de 5 animales +/- DE. Las diferencias significativas entre las edades, por la prueba t de Student, se representan con letras diferentes y el nivel de significancia con asteriscos (*p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

marcador/región	SEMANAS DE EDAD									
	6		7		8		10		12	
	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE
REGIÓN TOTAL										
CD2	60,9	15,9	62,6	10,2	56,2	15,3	55,5	14,4	57,8	7,1
CD4	31,2	2,7	32,5	4,5	28,3	9,3	29,8	8,4	29,5	3,6
CD8 (5)	23,7	9,6	25,7	5,7	25,2	4,4	18,3	4,8	22	3,3
SLA-II	36,4	14,3	15,2	15,1	32,2	11,7	24,1	15	31,8	16,9
MO/PMN	2,5	1	4,5	1,5	5,1	3,2	3,1	1	4,5	3,7
IgM	19,8	5,5	18,3	7,8	17,7	9,7	18,8	4,1	16,5	11,1
SUBREGIÓN 1										
CD2 (5)	61,2	16,4	65,3	10,5	62,6	15,2	66,1	11,3	68,5	7,3
CD4	32,6	2,6	32,7	4,9	33	6,9	31,3	9	33,9	5,7
CD8 (5)	24,2	10,3	27,5	7,2	26,6	5,3	25,5	6,3	26,3	4,2
SLA-II	34,1	10,9	23,2	10,9	28,2	13,4	25,5	12,8	32,1	13,2
MO/PMN	2,5	1,6	11,2	10,5	2,8	2	3,1	2,5	2,4	1,8
IgM	18,1	5,2	19,1	9,4	15,1	9,3	17,8	3,8	13	6,9
SUBREGIÓN 2										
CD2	54,1	20,1	a***55.6	10,9	36,3	19,4	40,4	14,5	b***29.3	5,6
CD4	25,3	6,9	a***25.9	3,4	21,8	4,6	16	6	b***13.3	3,1
CD8	17,1	9,8	a***22.4	4,2	18,1	4,6	13,5	3,6	b***11.9	3,2
SLA-II	63,6	17,7	44,8	31,8	63,6	8	62,6	19,3	58,1	30,5
MO/PMN	4,9	2,2	6,9	2,4	4,8	2,8	6,6	4	11,1	10,7
IgM	33,8	12,1	30,6	9,7	29,3	6,6	27,1	9,9	23,1	15,5

CUADRO 3. Cambios con la edad en las subpoblaciones de células de ganglio linfático mesentérico de cerdos. Análisis por citometría de flujo de las regiones total y subregiones 1, 2 y 3, a las 6, 7, 8, 10 y 12 semanas de edad. El cuadro indica el porcentaje de células positivas al marcador de superficie detectado con MAb. Los valores son el promedio de 10 animales +/- DE, excepto donde se indica (5) que es el promedio de 5 animales +/- DE. Las diferencias significativas entre las edades por la prueba t de Student, se representan con letras diferentes y el nivel de significancia con asteriscos (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

región/marcador	SEMANAS DE EDAD											
	6		7		8		10		12			
	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE		
REGIÓN TOTAL												
CD2	59,3	14,6	61	11	51,4	13,9	56,6	11,2	59,4	13,4		
CD4	15,8	5,1	19,4	4,4	17	3	18,5	4,7	17,8	6,3		
CD8	22	9,1	22,8	7,9	26,2	9,4	19,9	7,5	25,1	5,6		
SLA-II	48,8	7,8	30,8	19,8	32	12,2	29,3	17,6	31,3	19,2		
MO/PMN	15,5	6,8	17,9	8,2	13,8	4,8	16,3	4,6	12,9	4,4		
IgM (5)	21	13,9	11,7	6,2	9,7	6,5	14,3	3,9	15	7,9		
SUBREGIÓN 1												
CD2	69,1	9,1	70,5	10,6	56	15,8	65,3	11,1	67,3	16,1		
CD4	19,7	6	21,6	3,4	19,3	2,7	22,3	4,7	22,7	5,6		
CD8	30	12,2	32,7	9,9	31,4	12	30	9,7	29,3	12,1		
SLA-II	48,9	10,6	18,9	17,4	26,6	13,7	33,7	19,1	33,1	19,7		
MO/PMN	20	4,1	17,4	13,4	11,8	6,6	13,3	5,8	12,8	5		
IgM	11,3	4,6	8,6	5,7	5,9	2,8	9,8	1,9	10,8	6,5		
SUBREGIÓN 2												
CD2	53,9	15,2	43,3	15,3	26,7	15,4	33,8	17,6	31,6	13,7		
CD4	10,3	4,1	11,7	2	7,1	4,1	9,2	4,8	8,2	3,7		
CD8	10,9	3,2	12,8	5,6	14,4	7,4	9	3,9	9	5,4		
SLA-II (5)	73,5	11	41,3	29,2	47	17,8	51,9	26,1	55,2	16,1		
MO/PMN	43,9	7,1	36,3	18	30,9	9,2	30	7,4	33	10,1		
IgM	30,3	18,8	18,8	11,7	17,2	11	25,2	10,2	16,8	12,9		

CUADRO 4. Cambios con la edad en las subpoblaciones de células de bazo de cerdos. Análisis por citometría de flujo de las regiones total y subregiones 1, 2 y 3, a las 6, 7, 8, 10 y 12 semanas de edad. El cuadro indica el porcentaje de células positivas al marcador de superficie, detectado con MAb. Los valores son el promedio de 10 animales +/- DE, excepto donde se indica (5) que es el promedio de 5 animales +/- DE. Las diferencias significativas entre las edades por la prueba t de Student se representan con letras diferentes y el nivel de significancia con asteriscos (* p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.001).

región/marcador	SEMANAS DE EDAD					
	6	7	8	10	12	
	% ±DE	% ±DE	% ±DE	% ±DE	% ±DE	
REGIÓN TOTAL						
CD2	70,7	90,9	91	94,1	91,8	
CD4	3,2	3,2	3,6	2	1,6	
CD8	61,5	73,3	79,1	75,7	74,4	
SLA-II (5)	a*71,2	b*18,9	b*37,9	b*18,5	b*37,8	
MO/PMN	0,7	1,2	1,4	1,3	0,8	
IgM	2,9	1,1	1,8	2,5	0,7	
SUBREGIÓN 1						
CD2	a***66,6	b***91	b**91,4	b***95,2	b***94,8	
CD4	2,9	1,9	2,6	1,7	1,3	
CD8	a***48,1	b***73,7	b**76,3	b**70,1	b***74,5	
SLA-II (5)	a*46,2	28,9	39,5	b*20,2	37,2	
MO/PMN	0,8	0,9	0,4	0,6	0,6	
IgM	3,3	0,7	1,3	0,6	0,5	
SUBREGIÓN 2						
CD2	59,7	82,4	79,9	87,9	78,5	
CD4	2,3	2,4	4,6	5,3	0,6	
CD8	65,8	76,2	65,5	82	49,6	
SLA-II (5)	a***65,6	b**19,5	a**64,1	39,9	42,1	
MO/PMN	1,9	3,3	2,3	0,6	1,6	
IgM	3,7	1,8	1,8	3,2	2,1	
SUBREGIÓN 3						
CD2 (5)	0,6	1,7	1,7	1,1	1,8	
CD4 (5)	0,4	1,3	1,4	0,8	0,7	
CD8 (5)	1	1,9	1,8	1,3	2,3	
SLA-II (5)	2,2	0,7	1,8	1,5	1	
MO/PMN (5)	2,9	4,7	3,8	1,9	1,3	
IgM (5)	1,7	1	0,8	0,5	1,2	

CUADRO 5. Cambios con la edad en las subpoblaciones de células del epitelio intestinal porcino. Análisis por citometría de flujo de las regiones total y subregiones 1, 2 y 3, a las 6, 7, 8, 10 y 12 semanas de edad. El cuadro indica el porcentaje de células positivas al marcador de superficie, detectado con MAb.

Los valores son el promedio de 10 animales +/- DE, excepto en donde se indica (5) que es el promedio de 5 animales +/- DE. Las diferencias significativas entre las edades por la prueba t de Student, se representan con letras diferentes y el nivel de significancia con asteriscos (* p < 0.05; **p < 0.01; *** p < 0.001).

región/marcador	SEMANAS DE EDAD											
	6		7		8		10		12			
	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE	%	±DE
REGIÓN TOTAL												
CD2	a**45,6	9,5	58,1	11,7	56	7,4	60,1	16,6	b**68,8	14		
CD4	17,5	8,3	15,5	6,4	16,7	4,8	18,1	8	20,4	5,9		
CD8	14,7	6,6	14,3	4	13,5	6,8	18,7	7,7	16,5	4		
SLA-II	28,8	10,5	4,5	3,1	20,5	13,6	19,7	11,5	16,3	8		
MO/PMN	1,7	0,8	2,1	1,2	1,8	1	1,8	0,8	1,7	0,7		
IgM	a***24,9	8,9	13,5	6,5	14,4	7,1	10,9	8,8	b***3,1	3,1		
SUBREGIÓN 1												
CD2	a**66	10,6	76,9	9,2	78,2	10,7	85	9,6	b**86,1	8,4		
CD4	34,4	9,3	33,1	7,9	43,5	5,7	34,7	10,8	44,6	9		
CD8	26,4	6,9	34,5	10	28,5	6,4	40,5	10,9	39,9	13,3		
SLA-II	a***38,2	17	b***9,5	6,5	34,7	16,8	29,8	13,2	25,8	9,4		
MO/PMN	2,7	2,3	2,4	1,7	1,3	0,7	1,8	1,3	1,2	0,5		
IgM	7,5	4,6	4,4	2,4	4,8	2,7	2,6	2,1	2,8	1,1		
SUBREGIÓN 2												
CD2	34,2	13,7	47	19,9	37,2	19	29,7	7,8	41,4	19		
CD4 (5)	4,7	2,3	4,1	1,7	5,4	3,1	4,2	1,6	2,9	1,5		
CD8	4,4	2,3	4,6	2,6	3,8	2,4	6,2	3	4,8	2		
SLA-II	a**38	17,5	b**6	3,9	23,7	10,1	15,4	8,3	b**15,6	7		
MO/PMN	3	1,9	2,6	1,7	1,9	1,1	1,6	1	2	0,8		
IgM	a**29,5	10,3	25,2	10,6	17,5	8,1	17,8	6,1	b**13	4,9		

CUADRO 6. Cambios con la edad en las subpoblaciones de células de la lámina propia intestinal porcina. Análisis por citometría de flujo de las regiones total y subregiones 1, 2 y 3, a las 6, 7, 8, 10 y 12 semanas de edad. El cuadro indica el porcentaje de células positivas al marcador de superficie detectado con MAb. Los valores son el promedio de 10 animales +/- DE, excepto donde se indica (5) que es el promedio de 5 animales +/- DE. Las diferencias significativas entre las edades por la prueba t de student, se representan con letras diferentes y el nivel de significancia con asteriscos (* p < 0.05; **p < 0.01; *** p < 0.001).

7.7. COMPROBACIÓN DE LA INFESTACIÓN

En la mayoría de los animales infestados se obtuvieron larvas musculares de *Trichinella spiralis* a partir de los 25 días postinfestación, mientras que se observaron parásitos adultos en los intestinos de solo unos cuantos animales examinados (cuadro 7).

No. de animal	Días postinfestación	No. de LM/g
86	25	1250
87	40	1100
57	25	120
53	40	350
93	25	525
98	40	350
68	25	212
63	40	130
73	25	250
77	40	No realizado

Cuadro 7. Número de Larvas musculares (LM) recuperadas por gramo de músculo de diafragma, de los cerdos a los 25 y 40 días postinfestación.

También se realizaron cortes histológicos para buscar larvas dentro del intestino de los cerdos infestados, en la figura 16 se muestra el corte histológico de de duodeno porcino en donde se observan dos larvas de *Trichinella spiralis* dentro de una vellosidad sin aparente proceso inflamatorio.

7.8. EFECTO DE LA INFESTACIÓN EN LAS POBLACIONES CELULARES.

7.8.1. SANGRE. En el análisis de las células totales sólo se detectó un aumento con significancia estadística ($p=0.02$) por efecto de la parasitosis sobre las células CD8+ de los animales infestados después de 15 días, y al realizar los análisis por subregiones, se encontró que en la R2 la proporción de células IgM+ estaba disminuída ($p=0.044$) en los



Figura 16. Corte histológico de una vellosidad intestinal porcina infestado con *Trichinella spiralis*. Ep=epitelio, Lp=Lámina propia, *T.sp.*=*Trichinella spiralis* (20X).

cerdos infestados con respecto al control al día cuarenta postinfestación (Fig. 17), algo similar sucedió en la R3 donde a los 15 días postinfestación también se encontraron disminuídas las células IgM+ de los cerdos infestados ($p=0.023$) (cuadro 9).

7.8.2. GLM. En el análisis de células totales hubo aumentos significativos en las células CD2+ a los 2 ($p=0.037$) y 5 ($p=0.026$) días postinfestación en los cerdos infestados (Fig. 18), mismos que también se detectaron en la R1 a los días 2 y 5 postinfestación en las células CD2+ ($p=0.035$ y 0.02) y en las CD8+ ($p=0.016$ y 0.04) (Fig. 18).

7.8.3. BAZO. Se encontró una disminución significativa ($p<0.05$) en las células clase II de la región total y en la R2 a los 2 días postinfestación, en los animales infestados comparados con los controles (cuadro 9).

7.8.4. INTESTINO. A los 2 días postinfestación se detectó en el epitelio una disminución significativa ($p<0.05$) en la proporción de células SLA-II+ en los animales infestados tanto en las células totales (R1+R2) como en la R1 (Fig. 19 A y C). Así mismo, en la región total de la lámina propia hubo aumentos en la proporción de células CD4+ ($p=0.014$) al día 15 y CD8+ ($p=0.035$) al día 25 postinfestación en los animales infestados y disminución en las células SLA-II+ ($p=0.038$) a los 2 días postinfestación. En la R2 se detectaron aumentos significativos de las células CD4+, a los días 2 y 15 ($p=0.04$ y $p=0.011$) después de la infestación (Figs. 19 y 20).

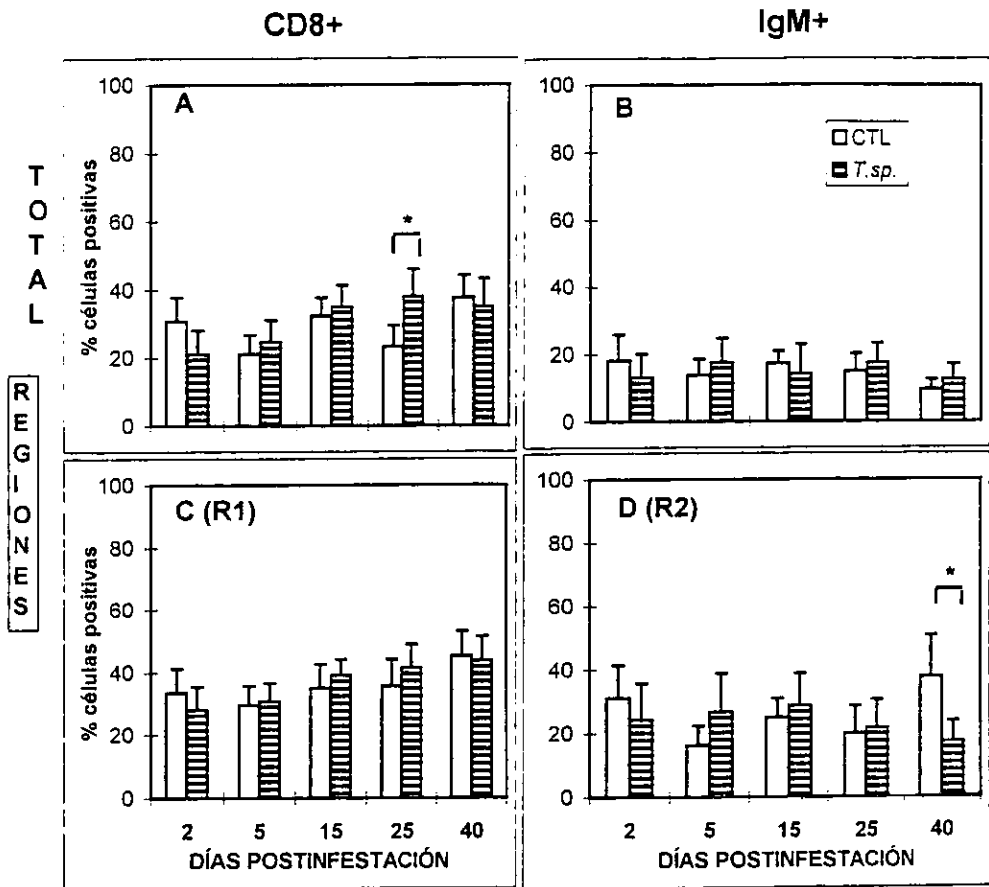


FIGURA 17. Proporciones celulares de sangre porcina en animales control (CTL) e infestados con *Trichinella spiralis* (T.sp.). Análisis por citometría de flujo de la región total (A y B) y la subregión 1 (C) y 2 (D) de células CD8+ (A y C) y células IgM+ (B y D). Las barras representan el promedio de células positivas de cinco animales +/- DE a diferentes días postinfestación. El asterisco (*) representa diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba t de Student.

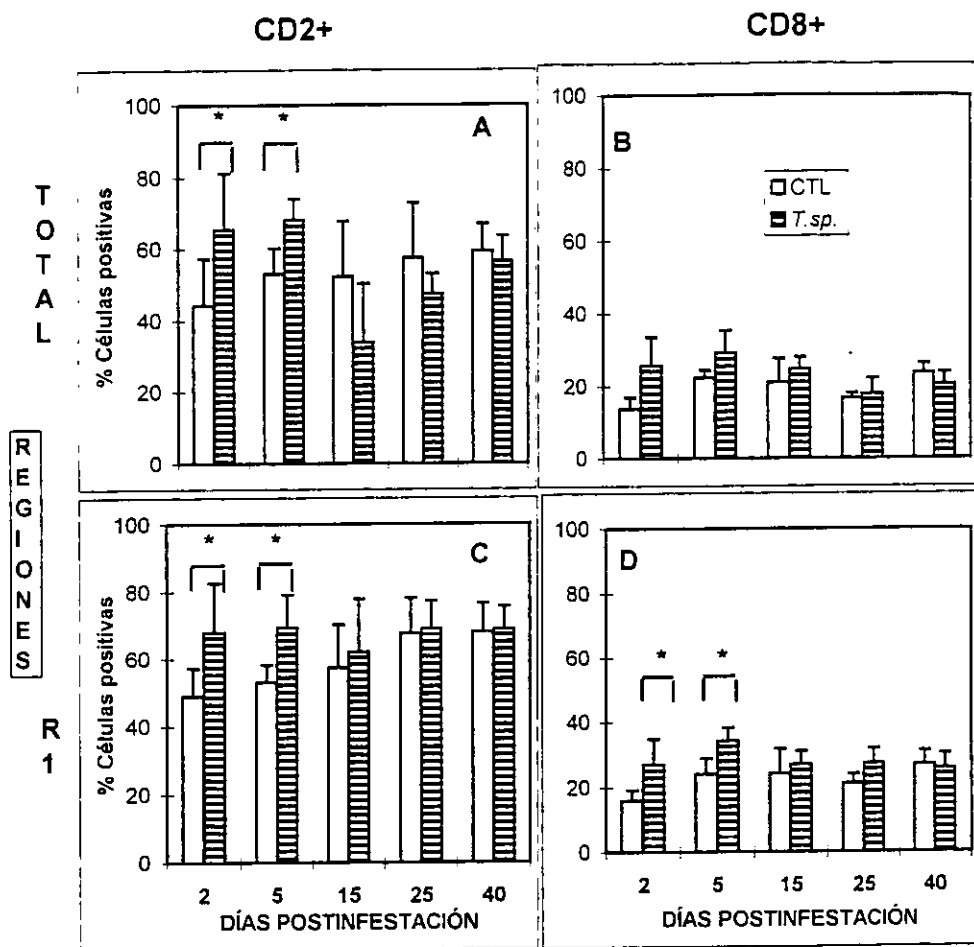


FIGURA 18. Proporciones celulares de GLM porcino en animales control (CTL) e infestados con *Trichinella spiralis* (*T.sp.*). Análisis por citometría de flujo de la región total (A y B) y la subregión 1 (C y D) de células CD2+ (A y C) y células CD8+ (B y D). Las barras representan el promedio de las células positivas de cinco animales +/- DE a diferentes días postinfestación. El asterisco (*) representa diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba t de Student.

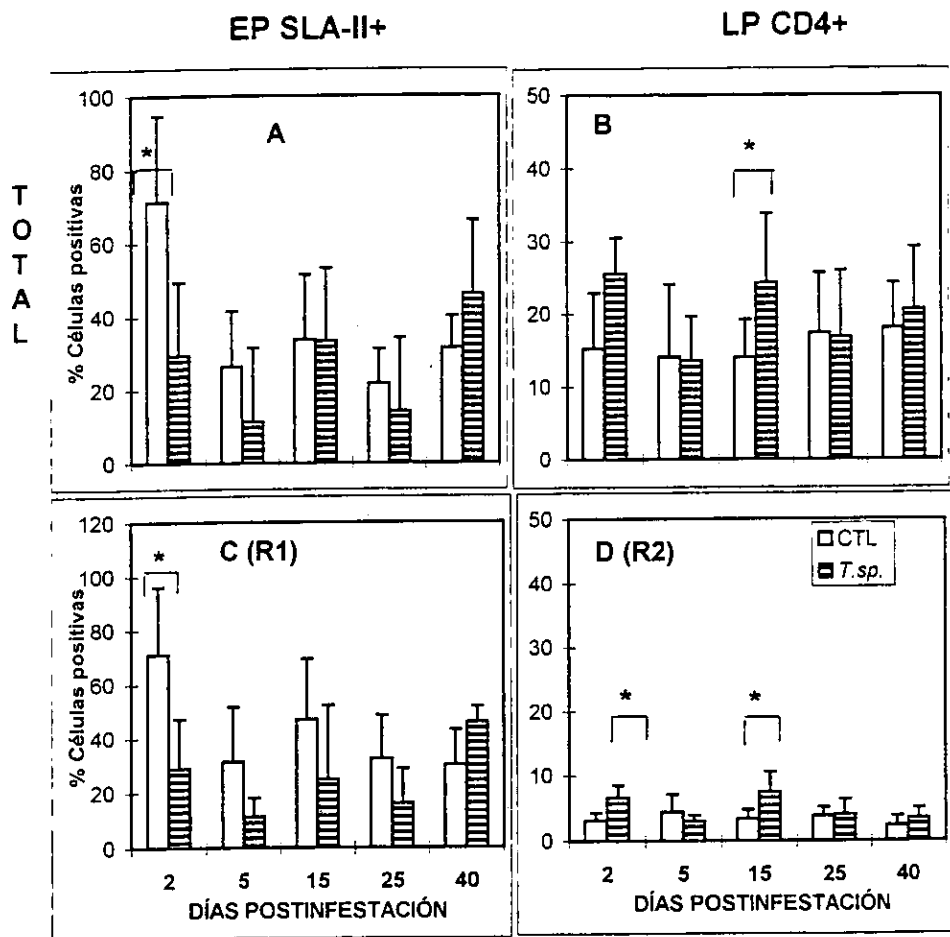


FIGURA 19. Proporciones celulares de **duodeno** porcino en animales control (CTL) e infestados con *Trichinella spiralis* (*T.sp.*). Análisis por citometría de flujo de la región total (A y B) y las subregiones 1 (C) y 2 (D) de células SLA-II+ de epitelio (A y C) y células CD4+ de LP (B y D). Las barras representan el promedio de las células positivas de cinco animales +/- DE a diferentes días post-infestación. El asterisco (*) representa diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba t de Student.

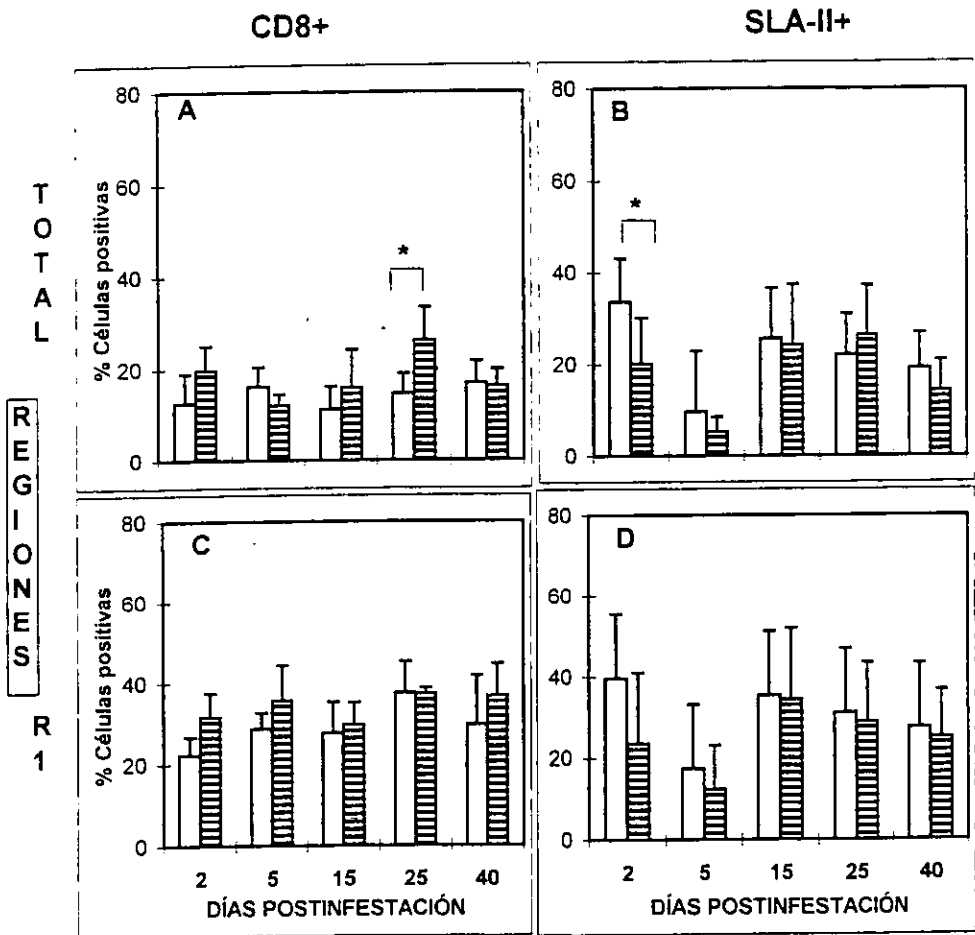


FIGURA 20. Proporciones celulares de **lámينا propia** intestinal porcina en animales control (CTL) e infestados con *Trichinella spiralis* (*T.sp.*). Análisis por citometría de flujo de la región total (A y B) y la subregión 1 (C y D) de células CD8+ (A y C) y células SLA-II+ (B y D). Las barras representan el promedio de las células positivas de cinco animales +/- DE a diferentes días postinfestación. El asterisco (*) representa diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba t de Student.

EDAD (semanas)	6	7	8	10	12
ORGANOS SANGRE					
Región Total	aCD2** /aCD8**				bCD2**↑ /bCD8**↑
1	aCD8** /aIgM*				bCD8**↑ /bIgM*↓
2	aCD2*	aMo***			bCD2*↑ /bMo***↓
3	aSLA-II* /aIgM*	bSLA-II*↓ /bIgM*↓			
GLM Total					
1					
2		(aCD2/aCD4/aCD8)***			(bCD2/bCD4/bCD8)***↑
BAZO Total					
1					
2					
EP Total	aSLA-II*	bSLA-II*↓			
1	aCD2*** /aCD8***	bCD2***↑ /bCD8***↑	bCD2***↑ /bCD8***↑	bCD2***↑ /bCD8***↑	bCD2***↑ /bCD8***↑
2	aSLA-II*	bSLA-II*↓			
3					
LP Total	aCD2** /aIgM***				
1	aCD2** /aSLA-II***	bSLA-II***↓			bCD2**↑ /bIgM***↓
2	aSLA-II** /aIgM**	bSLA-II**↓			bCD2***↑
					bSLA-II**↓ /bIgM**↓

Cuadro 8. Sinopsis de los cambios con la edad en las subpoblaciones de células de los diferentes órganos porcinos. Análisis por citometría de flujo de las subregiones total, 1, 2 y 3 a las 6, 7, 8, 10 y 12 semanas de edad. Las flechas indican aumento (↑) o disminución (↓) significativo en las proporciones entre las edades. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos del mismo marcador, por ejemplo entre a y b existen diferencias significativas. Los asteriscos representan el nivel de significancia estadística de las diferencias por la prueba t de Student (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

ORGANOS	Días PI		5	15	25	40
	Región	Región				
SANGRE	Total					
	1			CD8*↑		
	2					IgM*↓
GLM	Total					
	1	CD2*↑	CD2*↑			
	2	CD2*↑/CD8*↑	CD2*↑/CD8*↑			
BAZO	Total					
	1	SLA-II*↓				
	2	SLA-II*↓				
EP	Total					
	1	SLA-II*↓				
	2	SLA-II*↓				
LP	Total					
	1	SLA-II*↓		CD4*↑	CD8*↑	
	2	CD4*↑		CD4*↑		

Cuadro 9. Sinopsis de los cambios en subpoblaciones de células de diferentes órganos debidos a la infestación con *T.sp.* en cerdos de 6 a 12 semanas de edad. Las flechas indican aumento (↑) o disminución (↓) de los animales infectados en comparación con los controles sin infestar. El asterisco (*) representa diferencia significativa por la prueba t de Student pareada con $p < 0.05$. PI= postinfestación.

8.0 DISCUSIÓN.

8.1. SEPARACIÓN DE CÉLULAS

La separación de células de órganos inmunológicos permite estudiar *in vitro* la correlación de fenotipos y funciones, además con el uso de la citometría de flujo se puede detectar la densidad de marcadores superficiales, sin embargo esta técnica, está limitada por la pureza de las preparaciones celulares y los efectos deletéreos del procedimiento de separación sobre las células.

Se han desarrollado diversas técnicas para la separación de células intestinales, siendo las más estudiadas las de modelos murino y de rata cuyos protocolos involucran lavados de la mucosa intestinal con el objetivo de recuperar células de los dos compartimientos principales, el epitelio y la lámina propia (Davies *et al.*, 1981; Lyscom *et al.*, 1982; Lefrancois, 1987). Recientemente se ha utilizado el modelo porcino en el estudio del sistema inmunológico intestinal (Rothkotter *et al.*, 1994; Bailey *et al.*, 1994; Vega-López *et al.*, 1993, 1994). Así, para un estudio más profundo de esas células se han utilizado diferentes protocolos de separación, tanto del compartimiento epitelial como de la lámina propia, con resultados diversos (Davies *et al.*, 1981; Hariman *et al.*, 1992; Rothkotter *et al.*, 1994; Castillo, 1997).

Las técnicas de separación de células del sistema inmunológico intestinal porcino requieren validarse para su uso rutinario, dicha validación incluye la determinación del fenotipo de las células obtenidas.

Para evaluar el proceso de separación de células intestinales se tomaron como referencia los datos publicados en la literatura de células teñidas por inmunohistoquímica; conociendo la arquitectura del compartimiento intestinal, se diseñó un protocolo de separación secuencial, donde se identificaron las células del epitelio y de la lámina propia, por citometría de flujo. Se utilizó una modificación del método utilizado por Castillo (1997), en el cual se obtienen las células en un tiempo menor al reportado por otros autores y con una viabilidad de más del 90% (Vega-López *et al.*, 1993).

Las proporciones celulares que se obtuvieron de los compartimientos epitelial y de la lámina propia, evaluadas por citometría de flujo, fueron similares a las reportadas de análisis inmunohistoquímicos descritos anteriormente (Vega-López *et al.*, 1993). Así, en los tres lavados con EDTA se obtuvieron entre 80 y 90 por ciento de linfocitos CD2+, de los cuales 85% fueron

CD8+ y muy pocos CD4+ (<5%), lo cual es característico del compartimiento epitelial (Vega-López *et al.*, 1993, 1994). Por otro lado después de los lavados con colagenasa se encontró que del total de linfocitos CD2+, 35-50% eran CD4+ y 30-40% fueron CD8+, proporciones semejantes a lo reportado anteriormente por inmunohistoquímica (Vega-López *et al.*, 1993).

A su vez, para evaluar la eficiencia del proceso de separación de células intestinales, se hicieron cortes histológicos del tejido después de los lavados y frotis teñidos con hematoxilina y eosina de las células que se recuperaban de cada lavado. En este punto se pudo observar claramente que después de los lavados con EDTA se eliminó selectivamente el epitelio, quedando expuesta la lámina propia de las vellosidades (Fig. 12b), mientras que con los lavados con colagenasa, fue clara la separación de las células de la lámina propia quedando pocas estructuras íntegras después del tratamiento (Fig. 12c). En los frotis obtenidos de los primeros tres lavados y después de la purificación de los mismos en los gradientes de Percoll, se observaron linfocitos, con células epiteliales (50%-50%) además de mucho moco y detritus celulares (Fig. 13a). En los frotis de las células de la LP se observó una gran diversidad de células tanto en tamaño como en estructura (Fig. 13b), destacando la obtención de cantidades importantes de linfocitos (70%) y la poca contaminación con células epiteliales.

El uso del Percoll permitió basado en su densidad, la eliminación selectiva de células epiteliales, detritus y de moco que se quedaron en la superficie del gradiente, mientras que las células mononucleares se mantuvieron en la interfase de 40-80%. En este caso el uso de un gradiente de Percoll de 40/80%, para separar células intestinales, recomendado por otros autores no fue totalmente apropiado, ya que también se obtuvieron porcentajes importantes de células epiteliales, como se aprecia en los frotis y en los diagramas de contornos de citometría de flujo (Fig. 15A), además de que se perdían grandes cantidades de LIE, por lo que sería recomendable probar otros porcentajes de Percoll para los gradientes (Gallin *et al.*, 1994).

A pesar de lo anterior, la determinación del fenotipo mediante la tinción de las células separadas del intestino con anticuerpos monoclonales, así como la captura y análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo fue un procedimiento rápido y con resultados reproducibles y representativos de cada compartimiento. Se demostró que con el método de separación de células intestinales porcinas se obtuvieron poblaciones representativas del órgano, al coincidir los resultados de citometría con los obtenidos por inmunohistoquímica (Vega-López *et al.*, 1995).

8.2. RENDIMIENTOS CELULARES

Se utilizaron las técnicas convencionales para separar células mononucleares de sangre (gradientes), bazo (macerado y gradientes) y GLM (macerado). En el caso de sangre y GLM las desviaciones estándar de los rendimientos demostraron separaciones homogéneas y reproducibles en comparación con las de células de bazo donde las desviaciones fueron grandes, esto pudo deberse a que para obtener las células de bazo se utilizaban varios pasos para purificarlas mientras que en el caso de sangre y GLM la obtención era casi directa. En el bazo, primero se maceraba una cantidad de tejido, y de este macerado se tomaba una parte para diluirlo y estratificarlo en un gradiente de Ficoll/diatrizoato de sodio y así obtener la interfase de mononucleares, la cantidad de bazo que se maceraba y la utilizada para el gradiente era diferente en cada experimento, aunque se hacían las cuentas de células para obtener el rendimiento por gramo, por lo que en ciertas ocasiones en que era demasiado tejido, los gradientes se encontraban contaminados por detritus celulares, lo cual pudo influir en las variaciones en la obtención del rendimiento, con esto se podría concluir que entre más pasos lleve a cabo un proceso de separación de células, se aumenta la posibilidad de obtener rendimientos diferentes.

En el método utilizado para la separación de las células intestinales, las desviaciones encontradas en los rendimientos de cuatro experimentos también fueron altas, lo que pudo deberse a dos circunstancias igual de importantes, el proceso de separación de células y la variabilidad individual de los animales. Como ya se mencionó, entre más número de pasos tiene un método para separar células, mayor posibilidad de diferencias en los rendimientos se encontrará. La separación de las células intestinales se llevó a cabo en varios pasos y el rendimiento dependió de diferentes variables como la temperatura, tiempo y agitación de la muestra, concentración de reactivos, entre otros; en general todas se mantuvieron constantes, pero en cada paso se estuvo expuesto a pérdida de células por el manejo, proceso y herramientas utilizadas. Así, una de las soluciones sería reducir pasos de la técnica o mantener un patrón constante en el proceso.

Otro aspecto fue la individualidad de los cerdos, en este experimento se utilizaron animales que, aunque pertenecían a la misma camada, no eran genéticamente idénticos, por lo que pudieron existir diferencias en el desarrollo de los animales que fueran la causa de los valores heterogéneos obtenidos en los rendimientos celulares (Straw, 1994). Esto nos lleva a

decir que la maduración de los animales a esa edad puede afectar sus parámetros inmunitarios, pues no son aún estables y menos después del destete, ya que las células de los diferentes compartimientos están cambiando y la distribución celular todavía está en adaptación activa (Rothkötter *et al.*, 1991; Vega-López *et al.*, 1994 y 1995).

En lo que respecta a las células epiteliales obtenidas con lavados de EDTA, se encontraron rendimientos por debajo (2 a 3×10^6 células/g) de los valores de otros autores. Castillo obtuvo 7.5×10^6 células/g, Rothkötter 26.8×10^6 células/g, y Haverson informa 30×10^6 células/cm. Las diferencias con estos autores podrían explicarse porque sólo se utilizó y contó el primer lavado con EDTA de los tres realizados, en ese lavado fue donde se recuperaba la mayor cantidad de células. Adicionando los valores obtenidos en los otros dos lavados, aunque fueron de menor cantidad, los rendimientos se harían equiparables a los de la literatura, además en los métodos utilizados por Rothkötter y Haverson se usó ditiotreitól como agente para eliminar el moco, mientras que en el procedimiento aquí reportado no se agregó ningún agente mucolítico, lo que posiblemente afectó el rendimiento obtenido, como lo podemos apreciar en los frotis de las células del EP, donde se detectó que el moco atrapaba a las células (Fig. 13a) y las arrastraba hasta la superficie de los gradientes. También se observó una disminución en el rendimiento de células en la décimo segunda semana de edad, tanto de los animales infestados como los controles, situación que se pudo deber a la producción aumentada de moco en los animales de más edad y éste intervino en forma importante en la recuperación de las células, obteniéndose rendimientos pobres, principalmente del epitelio intestinal. Se ha visto, en experimentos realizados con ratas que el rendimiento de células es inversamente proporcional a la edad, por lo que habría que evaluar la conveniencia del uso de agentes mucolíticos o de lavados más cortos y a menor temperatura para tratar de evitar su producción. Así mismo, en el análisis por citometría de flujo se observó que casi la mitad de las células que se obtuvieron del epitelio eran grandes y granulares y sin marcadores inmunológicos, por lo que por su fenotipo y morfología se consideró que eran células epiteliales (Fig. 15A), así que la obtención de las células linfoides se vio contaminada por gran cantidad de células epiteliales, otro factor que seguramente influyó en la variabilidad de los rendimientos obtenidos (Davies *et al.*, 1981; Cerf-Bensussan *et al.*, 1984).

Los valores de las células de la lámina propia en este trabajo fueron de 5 a 12×10^6 células/g, que es parecido al que obtuvo Castillo (10×10^6 células/g) en cerdos de la misma edad,

otros autores han obtenido rendimientos semejantes, aún con cerdos adultos, en lavados con colagenasa por cuatro horas (7×10^6 células/g) por lo que se considera que el procedimiento utilizado para realizar la separación de este tipo de células (LP) es el adecuado para obtener altos rendimientos. Y se pone en relieve la influencia de la presencia del moco en los rendimientos pues en el epitelio, donde hubo mayor producción, provocó una menor recuperación de células y en la LP al estar casi ausente, los rendimientos fueron óptimos, por lo tanto es un elemento que siempre se debe considerar en este tipo de separaciones.

No se encontraron diferencias en el rendimiento de células obtenido entre los animales infestados y los controles sin infestar, posiblemente porque la dosis de infestación utilizada no provocó cambios apreciables en la celularidad de la mucosa, punto que se discutió anteriormente, o porque las variaciones en la purificación de células provocadas por el moco o por la contaminación de las células epiteliales, podrían estar enmascarando algún efecto detectable en el experimento, o porque realmente no haya ningún efecto a nivel de número de células totales provocado por la infestación, como el confirmado en inmunohistoquímica (García, 1997).

Un punto a favor de la técnica utilizada fue el tiempo de separación, pues se demostró que menos y más prolongados lavados (75 minutos) tuvieron un rendimiento similar a los obtenidos con más lavados por menor tiempo y se ha visto que la separación con gradientes de Percoll es mucho mejor que utilizando solo filtración en tela de nylon, pues con esta última hubo mas contaminación de moco y células epiteliales (Lefrancois, 1987; Mosley *et al.*, 1992).

Con esto se hace necesario completar los estudios de separación y purificación con pruebas funcionales y correlacionarlas para tener un parámetro más para elegir el método adecuado.

En conclusión, los resultados mostraron la importancia del utilizar métodos apropiados de separación de células intestinales. La combinación del conteo de linfocitos, el cálculo del rendimiento de células por gramo de tejido, la diferenciación celular por morfología y el análisis de las subpoblaciones de linfocitos son esenciales para obtener datos representativos de las células inmunológicas en compartimentos mucosales. Estos estudios pueden servir como modelo para el análisis de poblaciones celulares mucosales durante el desarrollo normal y en condiciones de enfermedad.

8.3. ANÁLISIS DE POBLACIONES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para determinar los cambios con la edad o debidos a la infestación en las poblaciones celulares de los diferentes órganos, se analizaron individualmente las regiones totales y sus subregiones obtenidas por citometría de flujo.

No se encontraron diferencias con significancia estadística con la edad en el análisis por citometría de flujo de la mayoría de las regiones totales de las células de los diferentes órganos estudiados. Sin embargo, cambios en las proporciones de algunas subregiones llegaron a alcanzar significancia con la edad o entre los grupos de animales infestados y sin infestar. En algunos casos el cambio repercutió en la región total, principalmente debido a que la subregión 1 era la que tenía la mayor cantidad de células, por ejemplo en sangre fue la que tuvo la mayor cantidad de células (Fig. 14A) y la diferencia que hubo de células CD8+ entre la semana 6 y 12 de edad repercutió en la región total (cuadro 2).

Entre los grupos sin infestar (control) y los infestados con *Trichinella spiralis* en pocos casos se lograron detectar cambios en la región total. Esto podría indicar que los cambios se presentaron sólo en ciertas poblaciones específicas o subpoblaciones, que podrían encontrarse en las subregiones, y que sólo haciendo un análisis minucioso de los datos globales se detectarían dichos cambios.

En los gráficos de poblaciones (DOT-PLOT y CONTOUR-PLOT) se distinguió una evidente diferencia en tamaño y granularidad de las células y con base a estos parámetros se delimitaron subregiones para analizarlas. En esas subregiones se encontraron diferencias significativas de algunas poblaciones. La delimitación de subregiones con base al tamaño y granularidad se ha hecho por otros autores siendo útil para analizar diferentes subpoblaciones o células en distintas etapas de activación, por lo que dependiendo de su morfología y fenotipo se puede sugerir o inferir el posible papel del grupo celular en análisis, dependiendo tanto del órgano como de la proporción o cantidad en él, es decir la presencia de cierto tipo o subpoblación de células y del número de ellas (Saalmueller *et al.*, 1988).

8.3.1. MADURACIÓN

8.3.1.1. SANGRE

El análisis de regiones y subregiones permitió, conocer el fenotipo de las células que se obtuvieron en los diferentes órganos. Las células mononucleares de sangre se dividieron en tres

subregiones, la población pequeña (R1), probablemente en estado de reposo, fue la más abundante y estuvo constituida principalmente de linfocitos T (CD2+). En las subregiones 2 y 3, en menor cantidad pero de mayor tamaño que la anterior, fue abundante en células SLA-II+ lo que podría indicar la presencia de células activadas y/o presentadoras de antígeno (CPA), como monocitos y linfocitos B, pues estos marcadores (Mo e IgM) predominaron en esta región. Estos datos confirman el hecho de que dentro de las células en circulación existen pequeñas poblaciones que están involucradas en una respuesta de acción rápida, dependiente de células activadas, pendientes del ataque de algún agente extraño, situación normal en el sistema inmunológico de un individuo sano.

En el cerdo existen poblaciones celulares que no se encuentran en otras especies como son: CD2+CD4+CD8+ (DP) y CD4-CD8- (DN), otras comunes en todas las especies CD2+CD4+CD8-, CD2+CD4-CD8+ y células CD2+ y CD2- que representan un gran porcentaje de LT (Hirt *et al.*, 1990). Un 25% de células en circulación son DP (CD4+CD8+) y en comparación con el humano existen más células CD8+ que CD4+, por lo que la razón CD4+/CD8+ en cerdos maduros es de 0.6 y en humanos de 1.5 a 2.0 (Pescovitz *et al.*, 1984).

En el análisis del total de células de sangre la mayor proporción fue de linfocitos T y la relación CD4/CD8 fue de casi 1:1, diferente a lo reportado en la literatura donde la relación es 1:2 en animales adultos. En la subregión 1 se detectó una relación CD4+/CD8+ de 1:1 en los animales jóvenes (6 semanas), y con el tiempo las células CD8+ fueron aumentando y las CD4+ se mantuvieron estables (cuadro 2) tendiendo a alcanzar la razón de 1:2, vista en cerdos adultos. Estos datos indican que los cerdos menores de 12 semanas de edad aún siguen madurando hasta ir alcanzando las proporciones características de la etapa adulta, llegando paulatinamente al funcionamiento óptimo de su sistema inmunológico, lo que podría explicar que los cerdos jóvenes sean más susceptibles a infestaciones (Vega-López, *et al.*, 1994 y 1995).

Los resultados también sugieren la existencia de células DP (CD4+CD8+) en la subregión 3, considerando que la suma de células con estos marcadores individuales rebasó el porcentaje de células CD2+ (Fig. 14a). También es posible de que existan otras células como los macrófagos, células cebadas y eosinófilos con marcadores CD4+ o CD8+. Se ha encontrado de 12 a 25% de células DP en sangre periférica y en este trabajo se detectó un porcentaje parecido en la región R3 que se mantuvo sin cambios en los días analizados. Pescovitz y colaboradores (1994) reportó aumentos de esta población con la edad durante los primeros meses de vida, se

creo que éstas células son inicialmente CD4+ y que con diferentes estímulos antigénicos se convierten en DP, sugiriéndose que pudieran realizar la doble función, de células tanto cooperadoras (CD4+) como citotóxicas (CD8+), además, de que tienen fenotipo de células de memoria, por lo tanto su actividad en el sistema inmunológico sería relevante pues podrían estar relacionadas en procesos de cooperación y de inmunorregulación. En una infestación serían de gran ayuda para presentar antígenos, ya que también expresan MHC-II, además de tener la capacidad de presentar una reacción inmediata para producir la rápida expulsión del antígeno, estos puntos se van consolidando conforme madura el animal y por lo tanto a edades tempranas las respuestas a este nivel no serían tan efectivas como en la etapa adulta y otros factores tendrían que compensar este aspecto (Saalmuller *et al.*, 1987 y 1991; Pescovitz *et al.*, 1994; Saalmüller *et al.*, 1994(a); Magyar *et al.*, 1995; Zuckermann *et al.*, 1996 (a y b)).

Ahora bien las poblaciones de células no solo se diferencian en cuanto a la presencia de un marcador, sino también a la expresión del mismo teniéndose células con baja densidad del marcador (CD8^{lo}) y otras con una alta expresión (CD8^{hi}) y cuya función dependa de esta diferencia, por ello se sugiere hacer la búsqueda y análisis de este tipo de células en los diferentes compartimientos utilizando dobles marcajes para que, además de conocer su fenotipo particular, se pueda determinar su probable función (Becker *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996).

Diversos autores han realizado tinciones dobles de células inmunitarias para poder caracterizarlas. Al teñir una misma muestra con dos MAb, conjugados con fluorocromos distintos, se obtendría información precisa de la naturaleza (célula T ó B), activación (IL-2R) o estado de maduración (IgM, IgD) de esas células y se podrían seguir los cambios que ocurren con la edad y ante la infestación (Saalmüller *et al.*, 1987 y 1988; Hamad *et al.*, 1994; Janeway *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Zuckermann *et al.*, 1996(b)). En este trabajo, los datos que se obtuvieron fueron con monotinciones de diferentes alícuotas de la misma muestra, cada una tratada con distintos anticuerpos monoclonales, por lo que los datos se interpretaron con la suma de cada uno de los marcadores analizados y con ello se sugirió la existencia de ciertas poblaciones; de esta manera se detectó la presencia de células DN en el análisis de la región total de sangre (Fig. 14a) y cuyo hallazgo se podría confirmar con dobles o triples tinciones, o bien utilizar anticuerpos monoclonales como MAC320 ó CC101 que identifiquen directamente a este grupo de células que podrían ser linfocitos T gama/delta. Los linfocitos T gama/delta se encuentran en grandes proporciones en sangre, timo, pulmón y en intestino porcinos y se

reconocen por ser DN y CD2-CD4-CD8- triple negativas, su función es desconocida pero se ha visto que líneas celulares obtenidas de circulación presentan moléculas de clase II y receptor de IL-2 que podrían indicar su estado de activación (Saalmüller *et al.*, 1989, 1990; Binns *et al.*, 1992; Grimm *et al.*, 1993; Hirt *et al.*, 1993).

Además, por su ubicación y cantidad en diferentes mucosas se piensa que estas células protegen contra infestaciones. Así mismo se ha visto que éstas células expresan el marcador CD44 en rumiantes lo que indica que son capaces de migrar tanto a la piel como a otras regiones donde existan células epiteliales, por lo que se les ha conferido cierta actividad citotóxica en melanomas (Mackay *et al.*, 1988; Richerson *et al.*, 1989; Hirt *et al.*, 1990). Por lo tanto el encontrarlas en la periferia sería indicativo de que están migrando a sitios donde pudieran ser útiles como la mucosa intestinal, punto que se tratará posteriormente.

También se encontró un aumento significativo de células CD8+ en la subregión 1 y de CD2+ en las subregiones 2 y total, lo que podría indicar que con el tiempo los cerdos siguen concentrando mayor cantidad de linfocitos T en sangre después del destete. Las proporciones de T fueron parecidas a las reportadas por otros autores que han encontrado cambios significativos en las células CD2+ y CD8+ de sangre, de las 4 a las 10 semanas de edad (Joling *et al.*, 1994). Con esto se pudiera estar vislumbrando que estos cambios son a causa de que con la edad se están requiriendo mayor cantidad de cierto tipo de células y que están migrando a los diferentes órganos linfoides donde son requeridas; una forma de saberlo sería detectar mediante marcadores trazadores diferentes poblaciones para observar su migración y comprobar esta hipótesis.

En contraste, en este trabajo se detectaron mayores porcentajes de células IgM+ (10-15%) y disminuciones significativas con el tiempo en las R1 y 3 (cuadro 2), mientras que las proporciones de LB (IgM+) que reporta Joling (1994) son mucho menores (2-3%) y sin cambios con la edad. Las diferencias pudieron deberse al uso de distintos MAbs y a las condiciones en que los diferentes autores mantenían a los cerdos (libres de patógenos vs condiciones normales), pues se ha visto que el medio ambiente influye directamente sobre las células inmunológicas en su cantidad y función (Bianchi *et al.*, 1992, 1996). En la R3 las poblaciones que disminuyeron con la edad fueron las IgM+ y SLA-II+, dado que los LB cuentan con estos dos marcadores (IgM y Clase-II) es probable que este tipo de células sean las que estén disminuyendo y una tinción con un marcador exclusivo de LB confirmaría o negaría esta

suposición, esta disminución o aumento de diferentes poblaciones podría estar indicando que el sistema está llegando a un estado basal cuya cantidad es la necesaria para inducir una respuesta con este tipo de células (homeostasis) o que están pasando a otros estados de activación por estímulos antigénicos como por ejemplo los LB que se transformen a células plasmáticas.

8.3.1.2. GLM

En el análisis de las células de GLM la R1, que fue la de mayor cantidad de células, estuvo compuesta de células pequeñas, seguramente quiescentes en donde, predominaron los linfocitos CD2+, además se encontró un porcentaje alto de células SLA-II+, lo que podría indicar la presencia de células T que por su tamaño parecen estar en reposo pero que tendrían marcadores de activación constitutiva (SLA-II), esto se discutirá posteriormente en la parte de intestino.

En la R2 compuesta de células mas grandes, las que predominaron fueron las SLA-II+ así como CD2+ e IgM, lo que indicaría la presencia de células T activadas y células con probable capacidad de presentación de antígenos (CPA), como linfocitos B, pues se detectaron cantidades importantes de células IgM+ y se encontraron cantidades mínimas de monocitos, lo que indicaría que en este órgano, desde edades tempranas, está poblado con células activadas y con capacidad de presentación de antígenos en los cerdos (Vajdy *et al.*, 1993). Por otra parte en esta misma subregión podrían existir células T DN, dado que la suma de los porcentajes de las células CD4+ y CD8+ no alcanzó al total de CD2+; esta población ya la han encontrado en porcentajes altos en cerdos jóvenes (30-55%) y en cerdos adultos (22%) y cuya función todavía está en estudio (Whary *et al.*, 1995; Zuckermann *et al.*, 1996(a)).

Al parecer este tipo de células tiene el potencial de diferenciarse a CD4+ o CD8+, dependiendo del estímulo que reciban y esto las haría de gran importancia ya que dependiendo del tipo de infestación que pueda tener el animal se podrían secretar sustancias que promuevan su diferenciación y actuar específicamente contra el tipo de microorganismo que esté causando daño, y por lo tanto al encontrarse en este órgano probablemente estén a la espera del estímulo o señal del intestino que les indique hacia donde deben diferenciarse.

En este estudio se detectó una disminución significativa de LT en la subregión 2 (cuadro 3), que no fue la de mayor número de células. En cambio en análisis realizados previamente por

inmunohistoquímica no se habían detectado cambios en cerdos desde el nacimiento hasta la etapa adulta en LT de GLM (Bianchi *et al.*, 1992), lo que podría indicar que la disminución fue detectada debido a la sensibilidad del método y nos podría indicar que todavía existe un ligero arreglo en las proporciones de esta población antes de llegar a la etapa adulta y donde los LT estén migrando a otros órganos.

En general los pocos cambios ocurridos en las proporciones celulares de este órgano linfóide indican que el proceso de maduración del animal se acerca al equilibrio y que ya no son necesarios cambios importantes en las poblaciones celulares. Los GLM podrían cumplir una función de recibir a las células activadas en los sitios inductores de la mucosa intestinal y que en ellos se lleven a cabo los procesos de división y diferenciación celular necesarios para desencadenar una respuesta inmunitaria local (Elson *et al.*, 1995; Whary *et al.*, 1995).

8.3.1.3. BAZO

No se encontraron diferencias significativas con el tiempo en ninguno de los marcadores utilizados. Bianchi y col. (1992) no detectaron cambios con la edad en células de bazo de cerdos libres de patógenos específicos (Large white X Landrace), por inmunohistoquímica. En cambio Joling y col. (1994), con el mismo tipo de cerdos, encontraron aumentos significativos de células T, por citometría de flujo. Esto podría deberse a las diferentes condiciones de trabajo, entre las que podemos mencionar: estímulo antigénico, forma de criar a los animales, variantes en la edad, tipo de cerdos y técnicas empleadas, o probablemente porque a esta edad ya se llegó a un equilibrio en la entrada y salida de células de este órgano y no sería necesaria la migración aumentada en condiciones normales. Al parecer el cambio que se puede dar es a nivel de cantidad de células y no en proporciones de poblaciones, esto se pudiera dar si tomamos en cuenta que el bazo es uno de los órganos linfoides principales del organismo y lo primordial es tener las poblaciones requeridas ya establecidas y seguir creciendo en número con la edad.

8.3.1.4. INTESTINO

8.3.1.4.1. LIE

En lo que respecta a los LIE se encontró que más del 90% de las células fueron CD2+, de las cuales 70-80% fueron CD8+ y menos del 5% CD4+ (Fig. 15), resultados que coinciden con lo encontrado por otros autores en cerdos y en humanos, lo que sugiere que se trata de un

compartimiento casi exclusivo de células T (Wilson *et al.*, 1986(b); Ebert, 1989). Es claro que en este compartimiento siguen existiendo aumentos de células CD2+ y CD8+ con la edad (cuadro 5), aunque ya no de forma tan súbita como en las primeras semanas de vida, esto significa que se está llegando a los requerimientos necesarios del órgano en las proporciones de células que lo componen (Vega-López *et al.*, 1995). También es probable que en ese nicho existan células DN (aproximadamente 2-5%) en las subregiones 1 y 2, pues la suma de los marcadores CD4+ y CD8+ no alcanza el total de CD2+. Las células DN se han podido detectar por inmunohistoquímica y se encuentran apicalmente en el epitelio y no se les conoce todavía función alguna; posiblemente se trate de células T $\gamma\delta$ indiferenciadas o inmaduras de índole extratímica y a las cuales les es necesario un estímulo para que lleguen a diferenciarse en CD4+ o CD8+ y con ello entrar en acción cuando se las requiera (Saalmüller *et al.*, 1989; Vega-López *et al.*, 1993).

Por otro lado se ha demostrado en roedores, en este compartimiento, la presencia de células TCR+ $\gamma\delta$ CD8+, que tienen funciones de regulación y pro inflamatorias, pues producen IL-2, IL-6, TNF- α , así mismo se ha encontrado que células CD2-CD4-CD8- son TCR+ $\gamma\delta$ en cerdos (Fujihashi *et al.*, 1990; Guy-Grand *et al.*, 1991; Barret *et al.*, 1992; Carr *et al.*, 1994; Gallin *et al.*, 1994). Una de las características que diferencia a los LIE de otros linfocitos es que contienen gránulos citoplasmáticos, al igual que las células NK, que no tienen marcadores de LT y LB, y por lo tanto se especula acerca de su probable función citotóxica, como primera línea de defensa del intestino, son timo independientes y provienen de las placas de Peyer y en algunos casos son antígeno específicos (Wilson *et al.*, 1986(a); Rothkötter *et al.*, 1995). Dentro de los LIE se han encontrado poblaciones celulares CD4-CD8+, CD4+CD8-, DP y DN, lo que habla de su gran heterogeneidad. La diversidad de subpoblaciones de células T en este nicho podría ser una gran ventaja desde el punto de vista de que se puede utilizar el tipo celular dependiendo del antígeno que penetre por esta vía y probablemente esté relacionado con procesos de tolerancia inmunológica a sustancias no dañinas para el organismo como son los nutrientes.

La mayoría de las células de la R1 del epitelio intestinal, fueron pequeñas y poco granulares, probablemente en reposo por su morfología característica y estuvieron constituidas por células CD8+ con una alta proporción de células SLA-II+ (20-50%), marcador que no se había detectado en este compartimiento por técnicas inmunohistoquímicas, lo que confirma que la técnica de FACS es más sensible para la detección de este marcador (Vega-López *et al.*,

1993 y 1994). Estos datos sugieren la existencia de una población CD8+CD11+, que se ha detectado constitutivamente en sangre porcina y ovina, principalmente en células CD4-CD8+ y en DP; en este trabajo también se detectó en sangre y GLM porcinos (Saalmüller *et al.*, 1991; Dutia *et al.*, 1993). Se ha visto que estos linfocitos tienen funciones de presentación de antígeno *in vitro* en el contexto de clase II ya que presentan aloantígenos a células de su propio linaje, por lo que su papel podría ser de gran importancia dado que el número de CPA presentes en este lugar es limitado y ayudarían a realizar este proceso de presentación más rápidamente aunque no se sabe con que eficacia (Saalmüller *et al.*, 1994b).

En la R2 se encontraron células de mayor tamaño y granularidad con alta expresión de CD8+ y SLA-II+, las que podrían ser células activadas, ya que el intestino está expuesto constantemente a gran variedad de sustancias. Por lo encontrado aquí se propone la existencia de una población celular en el intestino y otros órganos con un relevante potencial de presentación de antígenos parecido al realizado por los LB (Saalmüller *et al.*, 1991).

El marcador SLA-II se ha detectado en células presentadoras de antígeno (CPAs) y también en LB y en células T activadas, formándose esta molécula SLA-II en los linfocitos extratímicamente. Esta molécula es importante en la presentación de antígeno a los linfocitos T cooperadores para que posteriormente activen otros tipos de células y se monte la respuesta humoral o celular (citotoxicidad) (Saalmüller *et al.*, 1991; Becker *et al.*, 1993).

Ahora bien, las células que expresan SLA II podrían también ser del endotelio capilar intestinal con un posible papel como CPA no profesionales y que posiblemente se obtuvieron en los lavados con EDTA. Para confirmar su presencia sería necesario hacer tinciones dobles con el MAb MIL-11 que detecta esas células endoteliales (Stokes *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1996).

Se ha reportado que las células epiteliales del intestino porcino no tienen moléculas Clase II, aspecto que si presentan otras especies como roedores y humanos (Stokes *et al.*, 1996). En este trabajo no se detectó ningún marcador positivo en las células de la región 3 que se consideraron células epiteliales, por su tamaño y fenotipo, por lo que se puede considerar que estas células no están involucradas en el proceso de presentación de antígeno y que las encargadas de hacerlo son otras como las células M, células dendríticas, células endoteliales, Mo y LB en las Placas de Peyer y células T con SLA-II+ (Brandtzaeg, 1995).

En las primeras semanas de edad de los lechones existe un aumento importante de células del sistema inmune en el intestino, las que rápidamente se distribuyen en los diferentes

compartimentos; estos aumentos se acentúan cuando los cerdos son destetados (Vega-López *et al.*, 1995).

En la R1 del epitelio intestinal, constituida principalmente por LT, encontró un aumento de linfocitos CD2+ y CD8+ de las 6 a las 12 semanas de edad, posiblemente debido a la estimulación por antígenos microbianos naturales y a la nueva alimentación a los que se están enfrentando los cerdos en esa etapa (Vega-López *et al.*, 1994 y 1995; Whary *et al.*, 1995; Bianchi *et al.*, 1996).

Estos cambios evidencian que el sistema inmune intestinal continúa madurando de las 6 a las 12 semanas de edad, aunque más lentamente en comparación con las primeras semanas de vida e influido por el destete, como se ha visto en roedores, en donde ocurren cambios a nivel de EP y LP debido al cambio de dieta y al establecimiento de la flora microbiana acercando al animal a su madurez inmunológica y a la adaptación completa al medio que lo rodea (Vega-López *et al.*, 1995; Steege *et al.*, 1997).

8.3.1.4.2 LP

Se encontraron gran variedad de poblaciones celulares en la lámina propia. La R1, constituida de células pequeñas y poco granulares, contenía principalmente células T (70-90% de CD2+), a su vez esta estuvo constituida por células CD4+ (35-50%) y CD8+ (30-40%), posiblemente quiescentes y la proporción de células CD4+ fue sensiblemente mayor que en el epitelio como ya se había reportado (Rothkotter *et al.*, 1991). Así mismo en esta región, se detectó un aumento significativo de células CD2+ con la edad ($p < 0.01$), lo cual podría indicar un requerimiento de estas células en este órgano en la etapa adulta o que el efecto del destete esté incidiendo directamente sobre este tipo de células. Si comparamos las proporciones en sangre y LP nos daremos cuenta que son similares en cuanto a niveles de células T (CD2+, CD4+ y CD8+) y en otras células, pero seguramente difieren en función pues la mayoría de células T de LP tienen fenotipo de memoria y de cooperadores/inductores, y las CD8+ aproximadamente la mitad expresan CD28 que esta asociado a actividad citolítica (James *et al.*, 1986 y 1991). Por lo tanto en este nicho se tienen los elementos necesarios para inducir una respuesta celular en donde principalmente las células T podrían tener como principal actividad la de cooperación en favor de la producción de IgA (Abreu-Martin *et al.*, 1996).

En las subregiones 1 y 2, esta última probablemente compuesta por células en estado de activación por su tamaño, se detectaron disminuciones de células SLA-II+, de la semana 6 a la 7. En la LP la molécula SLA-II está asociada a diferentes células, con potencial función de CPA como podrían ser LT, LB, MO, células dendríticas y células endoteliales y el hecho de que se encuentre en células T podría ser consecuencia del continuo cambio antigénico y mitogénico del medio ambiente intestinal (Abreu-Martin *et al.*, 1996; Stokes *et al.*, 1996).

Para que se lleve a cabo la presentación de antígenos son necesarias moléculas co-estimuladoras como CD28, LFA-1, ICAM-1, y cuya ausencia podría producir un estado de anergia que genere tolerancia inmunológica de las células T (Roitt *et al.*, 1996).

Si se tratara de células presentadoras de antígeno no profesionales (por ejemplo células del endotelio capilar, enterocitos, eosinófilos), podría tratarse de células involucradas en la generación de anergia o tolerancia de LT, además de que pueden ser las responsables de la inducción de apoptosis de células efectoras activadas por antígenos de la dieta y de la flora normal, en la ausencia de IL-2 necesaria para la activación celular (Haverson *et al.*, 1997).

El cambio detectado proporciona información acerca de que a la semana siete de edad los animales sufren un repentino déficit, presuntamente fisiológico de esta molécula en sus células y que probablemente se deba a que están migrando a órganos vecinos donde son necesarios y luego llegan más de la periferia para que a la siguiente semana se tengan proporciones similares. El efecto del destete también pudo haber influido en este suceso, pues ante el cambio drástico que sufre el organismo es probable que exista un ajuste de células en el organismo, existiendo una migración de células hacia otros sitios donde exista poca cantidad; por lo tanto en esta semana de edad su capacidad de presentación de antígenos podría verse disminuida haciéndolos susceptibles a infestaciones.

En la R2 conteniendo células de mayor tamaño y granularidad que la R1, se detectó también una disminución en las células IgM+ de la semana 6 a la 12 (cuadro 8); en este punto se ha observado que en las primeras semanas de vida predominan las células IgM+ y posteriormente son las IgA+ las que al final están en mayor número (Stokes *et al.*, 1994).

Quizá se está detectando el cambio de las células IgM+, por las IgA+ que son las importantes en inmunidad mucosal o también es probable que los LB se estén convirtiendo a células plasmáticas como consecuencia del desafío antigénico y por lo tanto estuvieran perdiendo tal marcador (Bianchi *et al.*, 1992; Janeway *et al.*, 1995). Esto se refuerza si se

considera que el aumento en tamaño es una característica de las células plasmáticas y el tamaño de las células en la R2 es mayor que las de la R1. Conociendo que la diferenciación de LB a células plasmáticas está regulada por citocinas como la IL-5, IL-6, IL-10 y TNF- β , y por células residentes, como LT, epiteliales y macrófagos, el detectar estas citocinas a este nivel apoyaría tal aseveración (Brandtzaeg, 1985; Elson *et al.*, 1995; Roitt *et al.*, 1995).

Por lo tanto, es importante determinar los factores que diferencian entre la tolerancia e inmunidad después de exposiciones de antígenos microbianos en la mucosa, con el fin de encontrar y desarrollar vacunas orales contra agentes infecciosos, pues se han realizado intentos de obtener vacunas orales contra diferentes agentes patógenos en animales (Miller *et al.*, 1984; Murrell, 1984; Gabriele *et al.*, 1985; Holmgren, *et al.*, 1991, 1992, 1993, 1994; Kioyono, *et al.*, 1992; Elson *et al.*, 1995) con resultados poco claros.

Entre los múltiples factores que provocan que no se pueda tener éxito con estas vacunas orales y en especial contra helmintos como *Trichinella spiralis* están: en la mayoría de las infestaciones la quimioterapia es preferible ya que es simple y efectiva, los helmintos tienen ciclos de vida complicados y por lo tanto son antigénicamente complejos, la vacunación contra organismos localizados intestinalmente es menos efectiva que contra los sistémicos, la inmunidad contra la infestación en muchos individuos está ausente o es inefectiva, los parásitos tienen muchas estrategias para evitar, inactivar o revertir la respuesta inmunológica, existen problemas de índole logístico y financiero para implementar con éxito las probables vacunas en países subdesarrollados; por lo tanto es de suma importancia seguir realizando estudios a nivel mucosal para fundamentar los protocolos de vacunación y que tengan éxito (Wakelin, 1995).

Con los resultados que se obtuvieron en los diferentes órganos porcinos, se puede decir que existen poblaciones celulares que van variando con la edad en diferentes tejidos, por ejemplo en epitelio intestinal las células T y en sangre las células B y los Mo/PMN. Esto puede sugerir que existe una dinámica de poblaciones de células inmunes específica en cada órgano para llegar a las proporciones de adulto, dependiendo de su función y todo esto para lograr la homeostasis en los distintos sistemas de defensa del cerdo y estar listos para enfrentarse ante alguna agresión, como pudieran ser las infecciones bacterianas, parasitarias, de hongos o virus. Así también los cambios detectados pudieron deberse al destete que tuvieron los animales, pues el animal se vuelve más vulnerable y es necesario reforzar las diferentes áreas del sistema inmunológico (Vega-López *et al.*, 1995).

Se han realizado estudios en otras partes del intestino con resultados diferentes a los encontrados en duodeno, dado que el sistema inmunitario intestinal no es exclusivo del duodeno, es recomendable hacer el estudio de otros lugares del intestino, como placas de Peyer, íleon y yeyuno pues los datos que se pudieran obtener ayudarían a comprender mejor el sistema inmunológico en este sitio (Lyscom *et al.*, 1982; Harvey *et al.*, 1990; Bianchi *et al.* 1992; Rohkotte *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996; Zuckermann *et al.*, 1996(a)).

8.4. EFECTO DE LA INFESTACIÓN CON *Trichinella spiralis*

El hacer estudios, en el sistema inmunológico durante infestaciones es importante para detectar cambios celulares cuantitativos y/o cualitativos que ayuden a dilucidar las funciones en el sitio de interés inmunológico.

Al recuperar las LM de *T. spiralis* del músculo porcino y observarlas en cortes histológicos de intestino (Fig. 16) se comprobó que los cerdos estuvieron infectados aunque el número de larvas recuperadas por gramo de los diferentes animales fueron variables (cuadro 7). En estudios realizados por otros autores, infestan a los cerdos con larvas de ratas recién digeridas con jugo gástrico artificial situación que podría dañarlas y producir una menor capacidad de infestación. Por ambos métodos de infestación (LM digeridas o con carne de rata infestada) se han obtenido diferencias en las recuperaciones tanto en ratas, ratones y cerdos, por lo que parece indicar que tal variable dependen de los individuos más que del método de infestación (Murrel *et al.*, 1984; Grecis *et al.*, 1985; Marti *et al.*, 1986; Moqbel *et al.*, 1987; Wakelin *et al.*, 1994; García, 1997).

En el análisis por subregiones de los animales infestados con *T. spiralis* se detectó un aumento significativo de células CD2+ y CD8+ en GLM en la región total y subregión 1 (Fig. 18) a los 2 y 5 días postinfestación y de células CD4+ en LP en la subregión 2 (Fig. 19D) a los dos días del desafío. Esto podría representar una respuesta temprana del cerdo ante la invasión del parásito. También a los días 15 y 25 postdesafío se detectaron aumentos de células T a nivel de sangre y lámina propia (cuadro 9), lo que podría indicar que a estos días sigue habiendo un estímulo del parásito, tanto local como sistémico. Un aspecto importante para conocer mejor el tipo de respuesta que se está induciendo, sería conocer a que estado larvario son capaces de responder estas células, pues en ese tiempo postinfestación siguen liberándose LRN y se empiezan a alojar LM en el organismo.

En los primeros días después de la infestación, los parásitos adultos hembras liberan larvas recién nacidas (LRN) lo que provoca una reacción, tanto a nivel sistémico como intestinal aunque por inmunohistoquímica no ha sido posible detectar cambios de proporciones o de cantidades de células intestinales (Grencis *et al.*, 1991; Wakelin *et al.*, 1994; Ramaswamy *et al.*, 1996; García, 1997).

En ratas se ha visto que las células que confieren protección contra *T. spiralis* son del tipo CD4+, pero al parecer las células que actúan ante parásitos en cerdos son tanto las CD4+ como las CD8+ porque en infestaciones con *Toxoplasma gondii* se ha observado un aumento de células intraepiteliales CD8+ a los primeros días después de la infestación y en cerdos adultos infestados con *T. spiralis* se han detectado aumentos en las células CD4+ y CD8+, en sangre periférica, en los primeros días de infección. Se cree que las células que intervienen en la infestación parasitaria en cerdos son las DP (CD4+CD8+) que proliferan *in vitro* ante antígenos de *T. spiralis* y cuya función es aún desconocida (Ivanoska *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1990; Dillender *et al.*, 1993; Chardes *et al.*, 1994; Ramaswamy *et al.*, 1994).

En el ratón también se ha visto que los linfocitos intraepiteliales actúan tempranamente contra *T. spiralis*, eliminando células epiteliales dañadas por el parásito y de esta forma ayudando a su expulsión (Bozic *et al.*, 1996; Marinculic *et al.*, 1996).

Así también se tiene referencia de que la defensa contra la infestación parasitaria en ratones y ratas es la mediada por células T, pues en animales con bajas cantidades de LT se establece el parásito rápidamente mientras que en los animales normales, el establecimiento es más lento (Mayrhofer *et al.*, 1984; Garside *et al.*, 1992).

Además es posible que exista una relación entre LT y células cebadas que induzca modificaciones en la secreción de moco por las células caliciformes y por lo tanto se dificulte el establecimiento y penetración del parásito, estas evidencias y las encontradas en este trabajo indican que la reacción temprana a la parasitosis es principalmente de células T (Thomas *et al.*, 1979).

Otro hallazgo interesante es la disminución significativa de células IgM+ en cerdos infestados en la R2 de sangre a los 15 y a los 40 días del desafío. En este sentido, por el número de células de las subregiones 2 y 3, se puede sugerir que células B IgM+ se están transformando en células plasmáticas, con la consecuente pérdida de ese marcador de superficie, y probablemente se está desencadenando una respuesta de anticuerpos contra el

ESTA TESIS NO DEBE
SAIR DE LA BIBLIOTECA

parásito en los órganos sistémicos al día 15 y ya existan células que están continuamente produciendo anticuerpos ante el estímulo del parásito al día 40 postinfestación, esto se correlaciona con los hallazgos encontrados por ELISA, donde a partir del día 15 después de la infestación se empiezan a detectar anticuerpos contra antígenos de LM del parásito, teniéndose los valores máximos al día 40 (Romero, 1995).

Ahora bien, aunque se observó un aumento de células T en el intestino, no se ha podido detectar respuesta proliferativa de esas células ante antígenos del parásito *in vitro* lo que puede indicar que dichos aumentos no necesariamente son suficientes para la eliminación del parásito en el cerdo, donde su permanencia es muy prolongada en comparación con roedores, sino que sería necesaria la acción de varios componentes del sistema inmunológico como podría ser la producción de anticuerpos a nivel local y sistémica y el efecto de otras células accesorias como las cebadas y eosinófilos (Ebert, 1989; Yépez *et al.*, 1994; Miller, 1996; García, 1997).

Esto se relaciona con las diferencias que existen entre el sistema inmunológico sistémico y el intestinal, pues mientras en el primero después de una activación, existe una marcada producción de citocinas que pueden actuar sobre estas mismas células o sobre otras para proliferar, en el segundo después de una activación existe también producción de citocinas pero sin proliferación celular ya que muchas células se vuelven apoptóticas (Brandtzaeg, 1995; Abreu-Martin *et al.*, 1996).

En este trabajo el marcador SLA-II se encontró disminuido significativamente en células de bazo, epitelio y lámina propia intestinal a los dos días postinfestación (Figs. 19 y 20); esto podría indicar la existencia de una supresión tanto local como sistémica como resultado de mecanismos de evasión del parásito, evitando la presentación de antígenos sobre células SLA-II+. La inmunosupresión es un rasgo universal de las infestaciones parasitarias y se ha visto que afectan tanto a la respuesta de anticuerpos como a la mediada por células, así se tiene que ciertos parásitos causan daño directamente a células linfoides en el tejido, por ejemplo las LRN de *T. spiralis* liberan un factor linfocitotóxico que puede interferir con las funciones específicas de las células inmunológicas y también se han reportado otras acciones inmunosupresoras de antígenos de excreción y secreción del parásito sobre células inmunológicas de cerdos tanto *in vivo* como *in vitro* (Gerencer *et al.*, 1992; Roitt *et al.*, 1996).

Ahora bien, aunque se ha reportado que el duodeno es el sitio donde se aloja preferencialmente el parásito y donde se esperaba que se observarían cambios ante la

infestación, lo modesto y transitorio de la reacción celular detectada, así como las evidencias de la nula respuesta proliferativa de células del sistema inmunológico a antígenos del parásito en otros trabajos relacionados, sugieren la existencia de mecanismos de evasión, supresión y/o generación de tolerancia del parásito para pasar inadvertido ante el sistema inmunológico de ese sitio, mecanismos que deberán estudiarse en otros trabajos o que ese no es el sitio preferencial de alojamiento (Dick *et al.*, 1980; García, 1997).

Dado que se utilizaron dosis infestivas mayores a las utilizadas por otros autores donde detectan anticuerpos circulantes específicos contra el parásito y recuperan LM, debe descartarse que la dosis infestiva del parásito utilizada en este trabajo no fue suficiente como para provocar cambios detectables en el sistema inmunitario. Así entonces se detectaron anticuerpos circulantes contra *T. spiralis* por pruebas de ELISA (datos no mostrados), y se recobraron LM de tejido muscular (cuadro 7) por lo que la infestación fue inequívoca. Esto nos lleva a sugerir también que el parásito pudo haber estado alojado y multiplicándose en otro sitio del intestino delgado, diferente al duodeno, por lo que es necesario hacer estudios en sitios como, yeyuno e íleon, pues además son considerados sitios efectores de respuestas mucosales y probablemente se detecten cambios más claros. También existe la posibilidad de que las respuestas sean sólo focales o localizadas y por lo tanto difíciles de detectar (Van Kapen *et al.*, 1982; Wakelin *et al.*, 1983; Lunney *et al.*, 1988; Coligan *et al.*, 1990; Vajdy *et al.*, 1993; Gallin *et al.*, 1994).

Se ha reportado que ante la infestación con *T. spiralis* se induce una respuesta de tipo TH2, además de que existe una mastocitosis local que interviene en la expulsión del parásito en ratones y ratas. Con las técnicas de separación y tinción de células intestinales aquí empleadas, y con marcadores apropiados, además de la detección de citocinas y anticuerpos locales se podría dilucidar el tipo de respuesta generada en los cerdos (Parmetier *et al.*, 1987; Grecnis *et al.*, 1991; Miller, 1996).

9.0 CONCLUSIONES

SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE CÉLULAS

El análisis por citometría de flujo del número y proporción de las células mucosales obtenidas demostró la eficiencia del protocolo de separación, aunque es necesario modificar algunos pasos para obtener mejores rendimientos celulares.

La utilización de técnicas de separación de células en combinación con la citometría de flujo, aporta datos para el estudio de las poblaciones celulares de diferentes compartimentos inmunológicos, siendo más sensible y efectivo que la inmunohistoquímica.

MADURACIÓN

Las células CD2+ y CD8+ del sistema inmunológico porcino siguen aumentando y las SLA-II+ e IgM+ disminuyen lentamente de las 6 a las 12 semanas de edad. Estos cambios acercan al animal a su madurez inmunológica.

EFFECTO DE LA INFESTACIÓN EXPERIMENTAL

En cerdos infestados con *Trichinella spiralis* se detectaron aumentos significativos de células CD2+ y CD8+ en GLM y de CD4+ en LP del duodeno, los que podrían estar relacionados con respuestas tempranas a la infestación en estos sitios. Además se detectó una disminución de células SLA-II+ e IgM+ en días tanto tempranos como tardíos después de la infestación, situación que podría explicar la larga permanencia del parásito en el intestino porcino.

Es recomendable ampliar el estudio de poblaciones celulares a otros lugares del intestino, como placas de Peyer, íleon y yeyuno, pues los datos que se pudieran obtener ayudarían a comprender mejor la estructura, maduración y función del sistema inmunológico intestinal porcino, sobre todo ante la infestación por *Trichinella spiralis*.

El realizar tinciones citofluorométricas dobles y triples nos darían mayor información para identificar el tipo de células presentes en los diferentes órganos del sistema inmunológico y poder detectar mejor los posibles cambios que ahí ocurren.

10.0 BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

Abreu-Martin, M.T.; Targan, S.R. (1996). Regulation of immune Responses of intestinal Mucosa. *Critical Reviews in Immunology*. **16**, 277-309.

Austyn, J. (1989). Antigen presenting cells. IRL Press; Oxford, Inglaterra. pp 28-45.

Bailey, M.; Hall, L.; Bland, W.; Stokes, C.R. (1994). Production of cytokines by lymphocytes from spleen, mesenteric lymph node and intestinal lamina propria of pigs. *Immunology*. **82**, 577-583.

Barrett, T.A.; Gajewski, T.F.; Danielpour, D.; Chang-E.B.; Beagley, K.W.; Bluestone, J.A. (1992). Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J. Immunol.* **149** (4), 1124-30.

Beaver, P. (1986). *Parasitología Clínica*. 2a. ed. Salvat Editores, México. pp. 251-260.

Becker, BA.; Misfeld, ML.(1993). Evaluation of mitogen-induced proliferation and cell surface differentiation antigens of lymphocytes from pigs of 1 to 30 days of age. *J. Anim. Sci.* **73**, 2073-2078.

Befus, D; Lee, T; Ernst, P; Egwang, T; McElroy, P; Gauldie, J.; Bienenstock, J. (1986). Unique characteristics of local responses in host resistance to mucosal parasitic infections. *Vet. Parasitol.* **20** (1-3); 175-194.

Bianchi, A.T.; Zwart, R.T.; Jeurissen, S.H.; Moonen-Leusen, H.W. (1992). Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **33**, 201-221.

Bianchi, A.T.J.; Zwart, R.J. (1996). The influence of nutritional and microbial antigens on the development of B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs. *Memorias del 4° Simposium internacional de Inmunología Veterinaria, San Diego, EE. UU.* p. 310.

Bienenstock, J.; Ernst, P.B.; y Underdown, B.J. (1987). The gastrointestinal tract as an immunologic organ; state of the art. *Ann Allergy*, **59**, Part II: 17-20.

Binns, R.M.; Duncan, L.A.; Powis, S.J.; Hutchings, A.; Butcher, G.W. (1992). Subsets of null and $\gamma\delta$ T-cell receptor+ T lymphocytes in the blood of young pigs identified by specific monoclonal antibodies. *Immunology*. **81**, 36-42.

- Bland, P.W.;** Richens, E.R.; Britton, D.C.; Lloyd, J.V. (1979). Isolation and purification of human large bowel mucosal lymphoid cells: effect of separation technique on functional characteristics. *Gut*. **20**, 1037-1046.
- Blecha, F.;** Charley, B. (1990). Immunomodulation in domestic food animals, Academic Press.
- Bonner, W.A.;** Hulelt, HR. Sweet, RG., Herzenberg, LA. (1972). Fluorescence-activated cell sorting. *Rev. Sci. Instrum.* **43**, 404-410.
- Boyum, A.** (1976). Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* **5**, suppl. 5, 9-14.
- Bozic, F.;** Forcic, D.; Mazuran, R., Marinculic, A. (1996). $\gamma\delta$ TCR⁺ Intestinal intraepithelial lymphocytes (i-IEL) in reaction against intestinal nematode *Trichinella spiralis*. Abstract book 9th International Conference on Trichinellosis. México, D.F. W4.11.
- Brandtzaeg, P.** (1985). Research in gastrointestinal immunology. State of the art. *Scand. J. Gastroenterol.* **20**, 137-156.
- Brandtzaeg, P.** (1989). Overview of the mucosal immune system. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* **146**, 13-28.
- Brandtzaeg, P.** (1995). Basic mechanism of mucosal immunity, a major adaptive defense system. *The Immunologist.* **3**, 89-96.
- Brown, H.** (1985). *Parasitología Clínica*. 5a. ed. Nueva Edit. Panamericana. México. pp. 114-115.
- Butler, J.E.;** Klobasa, F.; Werhahn, E. (1981). The differential localization of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2**, 53-65.
- Carr, M.M.;** Howard, C.J.; Sopp, P.; Manser, J.M.; Parson, K.R. (1994). Expression on porcine gamma delta lymphocytes of a phylogenetically conserved surfaced antigen previously restricted in expression to ruminant gamma delta T lymphocytes. *Immunology.* **81**(1), 36-40.
- Castillo, M. R.** (1997). Estandarización de técnicas de separación y cultivo de células del sistema inmune porcino. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 15-25.
- Cerf-Bensussan, N.;** Quaroni, A., Kurnick, J.T., and Bhan, A.K. (1984). Intraepithelial lymphocytes modulate la expression by intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **132**, 2244-2252.

- Chardes, T.;** Buzoni, G.D.; Lepage, A. Bernard, F.; Bout, D. (1994). *Toxoplasma gondii* oral infección induces cytotoxic CD8 alpha/beta+Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. *J. Immunol.* **153**(10), 4596-4603.
- Coligan, J.;** Kruisbeek, A.; Margulies, D. (1990). *Current Protocols in Immunology*, Vol 1. Cap. 5. Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Crook, K.;** Wakelin, D. (1993). Induction of T lymphocyte subsets and levels of interleukin-2 and interleukin-3 after infection with *Trichinella spiralis* are similar in mice of high- and low-responder phenotypes. *Int. J. Parasitol.* **24**(1), 119-126.
- Czerkinsky, C.;** Holmgren, J.(1995) The mucosal immune system and prospects for anti-infectious and anti-inflammatory vaccines. *The Immunologist* **3**, 97-103.
- Davies M. D.J. ;** Parrott, D.M.B. (1981). Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut.* **22**, 481-487.
- Devey, M.E.;** Beckman, S. & Kemeny, D.M. (1993). The functional affinities of antibodies of different IgG subclasses to dietary antigens in mothers and their babies. *Clin. Exp. Immunol.* **94**: 117-121.
- Despommier, D.D.** (1983). *Biology*, En: *Trichinella* and trichinosis, WC Campbell (ed.) Plenum Press, New York, p. 75.
- Despommier, D.D.** (1995). *Trichinella spiralis*. En: *Infections of the Gastrointestinal Tract*, Blaser, M.J. (ed). Raven Press, New York, pp.1179-1185.
- Dick, T.A.;** Silver, B.B. (1980). Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. *J. Parasitol.* **69**, 176-180.
- Dillender, M.J.;** Lunney, J.L. (1993). Characteristics of T lymphocytes cell lines established from NIH minipigs challenge inoculated with *Trichinella spiralis*. **35**(4-5), 301-319.
- Doe, W.F.** (1989). The intestinal immune system. *Gut.* **30**, 1679-1685.
- Dupouy-Camet, J.;** Van Knapen, F.; Ancellet, V.; Quang, D.; Lavarde, V.; Lapierre, J. (1988). Study of specific immunoglobulins (total, IgG, IgM, IgA, IgE) in indirect immunofluorescence and ELISA in 40 patients with trichinosis followed over a 9-month period. *Pathol. Biol.* **36**, 803-808.
- Dutia, B.M.;** McConnell, Y.; Bird, K; Keating, P; Hopkins, J. (1993). Patterns of major histocompatibility complex class II expression on T cell subsets in different immunological compartments. 1. Expression on resting T cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2882-2888.

- Ebert, E.C.** (1989). Proliferative responses of human intraepithelial lymphocytes to various T-cell stimuli. *Gastroenterology*. **97**, 1372-1381.
- Ebert, E.C.; Roberts, A.I.** (1995). Pitfalls in the characterization of small intestinal lymphocytes. *J. Immunol. Methods*. **178**, 219-227.
- Elson, Ch.; Mestecky, C.J.** (1995). The mucosal immune system. En *Infectons of gastrointestinal tract*, Editores Blaster, M.J., Smith, P.D., Ravdin, J. I, Greenberg H.B., Guerrant, R.I. Edit. Raven Press, New York. pp. 153-162.
- FACSort™ Training Manual.** (1993). Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Anónimo. San José California. EE.UU.
- Ferguson, JD.; Castro, GA.** (1973). Metabolism of intestinal stages of *Trichinella spiralis*. *Am. J. Physiol.* **255**, 85-89.
- Ferguson, A.** (1996). Mucosal immunology: from bench to the bedside and beyond. *Immunology*. **89**, 475-482.
- Finkelman, F.D.; Shea-Donohue, T. Goldhill, J.; Sullivan, C.A.; Morris, S.C. Madden, K.B.; Gause, W.C.; Urban, J.F.** (1997). Cytokine regulation of host defense against parasite gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 505-533.
- Fujihashi, K.; Taguchi, T. McGhee, J.R.; Eldridge, J.H.; Bruce, M.G. Green, D.R.; Kiyono, H.** (1990). Regulatory function for murine intraepithelial lymphocytes. Two subsets of CD3+, T cell receptor-1+ intraepithelial lymphocyte T cells abrogate oral tolerance. *J. Immunol.* **145** (7), 2010-2019.
- Fukushima, K.; Masuda, T.; Ohtani, H.; Sasaki, I.; Funayama, Y.; Matsuno, S.; Nagura, H.** (1991). Immunohistochemical characterization, distribution and ultrastructure of lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor in the human gut. *Virchows. Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **60** (1),7-13.
- Gabriele, F.; Ecca, A.R.; Aru, A.B.; Palmas, C.** (1985). Vaccination against the gastrointestinal helminths *Trichinella spiralis* and *Hymenolepis nana*; relationship between routes of immunization and effective protection. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* **64** (5), 408-413.
- Gallin, J.I.; Fauci, S. A.** (1994). Advances in host defence mechanisms, en *Mucosal Immunology: Intraepithelial lymphocytes*. Raven Press, EE.UU. capítulo 1. Kiyono, H & McGhee, J.R. (Eds.)

- García, R.P.** (1997). Efecto de la infección experimental con *Trichinella spiralis* sobre las poblaciones celulares del sistema inmune intestinal porcino. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán, UNAM.
- Garside, P.; Grencis, R.K.; Mowat, A.M.** (1992). T lymphocyte dependent enteropathy in murine *Trichinella spiralis* infection. *Parasite. Immunol.* **14**(2), 217-225.
- Gerencer, M.; Marinculic, A.; Rapic, D.; Frankovic, M.; Valpotic, I.** (1992). Immunosuppression of *in vivo* and *in vitro* lymphocyte responses in swine induced by *Trichinella spiralis* or excretory-secretory antigens of the parasite. *Vet. Parasitol.* **44**, 263-273.
- Golinska, Z.; Machnicka, B.; Rysinka, A.** (1986). Circulating immune complexes in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Wiadomosci Parazytologiczne.* **32**, 243-249.
- Grencis, R.K.; Riedlinger, J.; Wakelin, D.** (1985). L3T4-positive T lymphoblasts are responsible for transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology.* **56** (2), 213-218.
- Grencis, R.K.; Hultner, L.; Else, K.J.** (1991). Host protective immunity to *Trichinella spiralis*: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunology,* **74**, 329-345.
- Grimm, D.R.; Richerson, J.T. Theiss, P.M. LeGrand, R.D.; Misfeldt, M.L.** (1993). Isolation and characterization of $\gamma\delta$ T lymphocyte cell lines from Sinclair swine peripheral blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **38**, 1-20.
- Guy-Grand, D.; Cerf-Bensussan, N.; Malissen, B.; Malassis-Seris, M.; Briottet, C.; Vassalli, P.** (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **173**(2), 471-481.
- Hamad, M.; Klein, J. R.** (1994). Phenotypic and functional heterogeneity of murine intestinal intraepithelial lymphocytes defined by cell density: implications for route of differentiation and responsiveness to proliferation induction. *Immunology.* **82**, 611-616.
- Harari, Y.; Russell, D.A.; Castro, G.A.** (1987). Anaphylaxis-mediated epithelial Cl secretion and parasite rejection in rat intestine. *J. Immunol.* **138**, 1250-1255.
- Harriman, G.R.; Hörnqvist, E.; Lycke, N.Y.** (1992) Antigen-specific and polyclonal CD4⁺ lamina propria T-cell lines: phenotypic and functional characterization. *Immunology.* **75**, 66-73.

- Harvey, J.; Jones, D.B. & Wright. (1990).** Differential expression of MHC- and macrophage-associated antigens in human fetal and postnatal small intestine. *Immunology*. **69**: 409-415.
- Haverson, K.; Stokes, C.R.; Bailey, M. (1997).** Immunophenotypic study of cell populations in the pig lamina propria. 9th International Congress of Mucosal Immunology. *Immunol. Cell. Biol.* **75**:Suppl. 1, W2.5.23.
- Haynes, J. (1988).** Principles of Flow Cytometry. *Cytometry Supplement*. **3**, 7-17.
- Hirt, W.; Saalmuller, A; Reddehase, M.J. (1990).** Distinct γ/δ T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2-CD4-CD8- T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **20**, 265-269.
- Hirt, W.; Saalmuller, A; Reddehase, M.J. (1993).** Expression of gamma/delta T cell receptors in porcine thymus. *Immunobiology*. **188** (1-2), 70-81.
- Holmgren, J. (1991).** Mucosal immunity and vaccination. *FEMS-Microbiol. Immunol.* **4**(1), 1-9.
- Holmgren, J; Czerkinsky, C.; Lyccke, N.; Svennerholm, A.M. (1992).** Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiology*. **184** (2-3), 157-179.
- Holmgren, J.; Lyccke, N; Czerkinsky, C. (1993)** Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine*. **11**, 1179-1184.
- Holmgren, J.; Czerkinsky, C.; Lyccke, N.; Svennerholm, A.M. (1994).** Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier, and adjuvant. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 42-54.
- Ivanoska, D.; Cuperlovic, K.; Lunney, J.K. (1990).** Peripheral blood mononuclear cell subsets during *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Res. Vet. Sci.* **49**(1), 92-7.
- Ishikawa, N.; Goyal, P.K.; Mahida, Y.R.; Li, K.F.; Wakelin, D. (1998).** Early cytokine responses during intestinal parasitic infections. *Immunology*. **93**, 257-263.
- James, S.P.; Fiocchi, C., Gaeff, A.S.; Strober, W. (1986).** Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology*. **91**, 1483.
- James, S.P. (1991).** Mucosal T-cell function. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **20**, 597.
- Janeway, C., Travers, P. (1996).** *Immunobiology*. 2a de. Edit. Current Biology Ltd/Gaillard Publishing Inc. Londres.

- Johnson, L.R.** (1983). Physiology of the gastrointestinal Tract. Edit. Raven Press, New York. EE.UU., pp 57.
- Joling, P.; Bianchi, A.; Kappe, A.; Zwart, R.** (1994). Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **40**, 105-117.
- Kazura, J.; Grove, D.** (1978). Stage-Specific antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of *Trichinella spiralis*. *Nature.* **274**: 588-589.
- Kloyono, H.; Bienenstock, J.; McGhee, J.R. y Ernst, P.B.** (1992). The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg. Immunol.* **4**, 54-62.
- Klein, J.R.; Kagnoff, M.F.** (1984). Nonspecific recruitment of cytotoxic effector cells in the intestinal mucosa of antigen-primed mice. *J. Exp. Med.* **160**, 1931-1936.
- Lefrancois, L.** (1987). Carbohydrate differentiation antigens of murine T cells: Expression on intestinal lymphocytes and intestinal epithelium. *J. Immunol.* **138**, 3375-3384.
- Lefrancois, L.** (1991). Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J. Immunol.* **147** (6), 1746-1751.
- Ljungstromm, I.; Hammarstrom, L.; Kociecka, W.; Smith, C.** (1988). The sequential appearance of IgG subclasses and IgE during the course of *Trichinella spiralis* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **75**, 230-235.
- Lunney, J.K.; Pescovitz, M.** (1987). Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**(1-4), 135-44.
- Lunney, J.K.; Murrel, K.D.** (1988). Immunogenetic analysis of *Trichinella spiralis* infections in swine. *Vet. Parasitol.* **29**, 179-193
- Lyscom, N.; Brueton, M.J.** (1982). Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology.* **45**(4), 775-783.
- Mackay, C.R.; Maddox, J.F.; Wijffels, G.L. Mackay, I.R.; Walker, I.D.** (1988). Characterization of a 95,000 molecule on sheep leucocytes homologous to murine PgP-1 and human CD44. *Immunology.* **65**, 93-99.

- Magyar, M.; Mihalik, R.; Olah, Y. (1995).** The surface phenotype of swine blood and tissue eosinophil granulocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **47**, 237-281.
- Marinculic, A.; Bozic, F.; Kozaric, Z. (1996).** Intestinal intraepithelial lymphocytes in the local immune response against *Trichinella spiralis*. Abstract book 9th International Conference on Trichinellosis. México, D.F. W4.12.
- Marti, HP. y Murrell, K.D. (1986).** *Trichinella spiralis*: Antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Exp. Parasitol.* **62**: 370-375.
- Mayrhofer, G.; Pugh, C.W.; Barclay, A.N. (1983)** The distribution, ontogeny and origin in the rat of Ia-positive cells with dendritic morphology and of Ia antigen in epithelia, with special reference to the intestine. *Eur. J. Immunol.* **13**, 112-122.
- Mayrhofer, G. (1984).** Physiology of the intestinal immune system. En: Local immune responses in the gut. Newby, T.J.; Stokes (Eds.), CRC. Press Inc. Florida EE.UU., pp. 143-180.
- Mega, J., Fujihashi, K., Kiyono, H. (1992).** Regulation of mucosal immune responses by T lymphocytes: the effect of chronic CD4+ T cell deficiency on IgA synthesis. *Reg. Immunol.* **4**(2), 70-78.
- Miller, H.R.P. (1984).** The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **6**, 167-259.
- Miller, H.R.P. (1996).** Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **54**, 331-336.
- Moqbel, R.; Wakelin, D., MacDonald, A.J.; King, S.J, Grecnis, R.K.; Kay, A.B. (1987).** Release of leukotrienes during rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats. *Immunology.* **60**, 425-432.
- Mosley, R.L.; Klein, J.R. (1992)** A rapid method for isolating murine intestine intraepithelial lymphocytes with high yield and purity. *J. Immunol. Meth.* **156**, 19-26.
- Mowat, A., MacKenzie, S.; Baca, M.; Felstein, V.; Delphine, M.V. (1986).** Funcional characteristics of intraepithelial lymphocytes from mouse small intestine. *Immunology.* **58**, 627-634.
- Murrell, K.D.; Despommier, D.D. (1984).** Immunization of swine against *Trichinella spiralis*. *Vet. Parasitol.* **16** (1-2), 263-270.

- Murrell, K.D.** (1985). *Trichinella spiralis*: Acquired immunity in swine. *Exp. Parasitol.* **59**, 347-354.
- Murrell, K.D.**; Anderson, W.R.; Schad, G.A.; Hanbury, R.D.; Kazacos, K.R.; Gamble, H.R., Brown, J. (1986). Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for swine trichinosis: Efficacy of the excretory-secretory antigen. *Am. J. Vet. Res.* **47** (5), 1046-1049.
- Nagura, H.**; Sumi, Y. (1988). Immunological functions of the gut, role of the mucosal immune system. *Toxicol. Pathol.* **16** (2), 154-64.
- Negrao-Correa, D.**; Adams, L.S.; Bell, R.G. (1997). The dynamics of IgE production during *Trichinella spiralis* infection in rats. Quantitative significance of transport to the intestine versus serum. En Proceedings del 9º International Congress on Trichinellosis. Edits. Ortega-Pierres, G; Gamble, H; van Knapen, F; Wakelin, D. México, D.F. pp. 363-366.
- Ortega-Pierres, G.**; Chayen, A.; Clark, NWT.; Parkhouse, RME. (1984). The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* **88**, 359-362.
- Parkhouse, R.M.E.**; Ortega-Pierres, G. (1984). Stage-specific antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* **88**, 623-630.
- Parmetier, H.K.**; Teppema, J.S.; van-Loveren, H.; Tas, J.; Ruitenberg, E.J. (1987). Effect of *Trichinella spiralis* infection on the distribution of mast cell precursors in tissues of thymus-bearing and non-thymus-bearing (nude) mice determined by an *in vitro* assay. *Immunology.* **60**(4), 565-571.
- Parrot, D.M.** (1987). The structure and organization of lymphoid tissue in the gut. En Food allergy and intolerance. Brostoff, J.; Challacombe S. J. Eds. Bailliere Tindall, W.B. Saunders Inglaterra. pp. 3-27.
- Perrudet-Badoux, A.** (1978). Immunity against Newborn *Trichinella spiralis* larvae in previously infected mice. *J. Parasitol.* **64**: 187-189.
- Pescovitz M.D.**; Lunney J.K. & Sachs D.H. (1984) Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J. Immunol.* **133**, 368-375.
- Pescovitz, M.D.**; Sakopoulos, A.G.; Gaddy, J.A.; Husmann, R.J.; Zuckermann, F.A. (1994). Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**, 53-62.

- Pincus, S.H.**; Cammarata, P.V.; Delima, M.; Despommier, D.D. (1986). Eosinophilia in murine trichinellosis. *J. Parasitol.* **72**, 321-329.
- Ramaswamy, K.**; Goodman, R.E.; Bell, R.B. (1994). Cytokine profile of protective anti-*Trichinella spiralis* CD4+OX22- and non-protective CD4+OX22+ thoracic duct cells in rats: secretion of IL-4 alone does not determine protective capacity. *Parasite Immunol.* **16**(8), 435-345.
- Ramaswamy, K.**; Negrão-Correa, D.; Bell, R. (1996) Local intestinal immune responses to infections with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* **156**: 4328-4337.
- Reinherz, E.L.**; Kung, P.C.; Goldstein, G.; Scholossman, S.F. (1979). Further characterization of the human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody. *J. Immunol.* **123**, 2894-2900.
- Richerson, J.T.**; Burns, R.P.; Misfeldf, M.L. (1989). Association of uveal melanocyte destruction in melanoma bearing swine with large granular lymphocyte cells. *Inv. Ophth. Vis. Sci.* **30**, 2455-2460.
- Romero Ramírez, H.** (1995). Estudio y evaluación del sistema inmune mucosal. Reporte de Servicio social, FESC, UNAM.
- Roitt, I.**; Brostoff, J.; Male, D. (1996). *Immunology*. Edit. Mosby. Londres. 4a.ed, p.p. 18.1-18.16.
- Rothkötter, H.J.**; Ulbrich, H.; Pabst, R. (1991). The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and Germ-free pigs. *Pediatr. Res.* **29**, 237-242.
- Rothkötter, H.J.**; Kirchoff, T; Pabst, R. (1994). Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs. *Gut.* **35**(11), 1582-1589.
- Rothkötter, H.J.**; Hriesik, C; Pabst, R. (1995). More newly formed T and B lymphocytes leave the intestinal mucosa via lymphatics. *Eur. J. Immunol.* **25**(3), 866-869.
- Ruitenbergh, E.J.** Perrudet-Bardoux, A.; Boussac-Aron Y. (1980). *Trichinella spiralis* infection in animals genetically selected for high and low antibody production: studies on intestinal pathology. In. *Arch. Allergy Appl. Immunol.* **62**, 104-110.
- Russell, D.A.**; Castro, G.A. (1985). Anaphylactic-like reaction of small intestinal epithelium in parasitized guinea-pigs. *Immunology.* **54**, 573-582.

- Russell, D.A;** Castro, G.A. (1987). Physiology of the gastrointestinal tract in the parasited host. En *Physiology of the gastrointestinal tract*, Johnson, L.R.; Christianson, J.; Jackson, M.J.; Walsh, J.H; eds. Raven Press. New York, pp. 1749-1780.
- Russell, G.J.;** Bhan, A.K.; Winter, H.S. (1990). The distribution of T and B Lymphocyte populations and MHC class II expression in human fetal and postnatal intestine. *Pediatr. Res.* **27**: 239-44.
- Saalmüller, A.;** Reddehase, M.J.; Burring, H.J. Junjic, S.; Koszinowski, U.H. (1987). Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **17**, 1297-1301.
- Saalmüller, A.;** Reddehase, M.J. (1988). Immune system of swine: dissection of mononuclear leucocyte subpopulations by means of two colour cytofluorometric analysis. *Res. Vet. Sci.* **45**, 311-316.
- Saalmüller, A.;** Hirt, W.; Reddehase, M.J. (1989). Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **19**, 2011-2016.
- Saalmüller, A.;** Hirt, W; Reddehase, M.J. (1990). Porcine gamma/delta T lymphocyte subsets in their propensity to home to lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol.* **20** (10), 2343-2346.
- Saalmüller, A.;** Weiland, F.; Reddehase, M.J. (1991). Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility antigen. *Immunobiol.* **183**, 102-114.
- Saalmüller, A.(a);** Bryan, J. (1994). Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol. Special Issue.* **43**, 45-52.
- Saalmüller, A. (b);** Maurer, S. (1994). Major histocompatibility antigen class II expressing resting porcine T lymphocytes are potent antigen-presenting cells in mixed leukocyte culture. *Immunobiology.* **190**(1-2), 23-34.
- Selby, W.S.;** Janossy, G.; Goldstein, G.; Jewell, D.P. (1981). T lymphocyte subsets in human intestinal mucosa: the distribution and relationship to MHC-derived antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **44**, 453-458.
- Silberstein, D.S.** (1983). Antigen. En: *Trichinella and trichinosis*. Campell, W.C. ed. Plenum Press, New York. pp. 309-334.
- Smith, M. W. y L.G. Jarvis.** (1978). Grow and cell replacement in the new-born pig intestine. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **203**, 69-89.

- Spiegel, M.** (1995). Estadística. Mcgraw Hill, México, pp.185-200.
- Stæge, J.C.; Buurman, W. A.; Forget, P.P.** (1997). The neonatal development of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the murine small intestine. *Dev. Immunology*. **5**(2), 121-128.
- Steward, G.L.; Despommier, D.D.; Burnham, J.** (1987). *Trichinella spiralis*: behavior, structure and biochemistry of larvae following exposure to components of the host enteric environment. *Exp. Parasitol.* **63**, 195-204.
- Stokes, C.R.** (1988). Immune systems in the porcine gut. *Pig Vet. Soc. Proc.* **20**, 19-30.
- Stokes, C.R.; Bailey, M.; Wilson, A.D.** (1994). Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet. Immunol. Immunopathol. Special Issue.* **43**, 143-150.
- Stokes, C.R.; Haverson, K.; Bailey, M.** (1996). Antigen presenting cells in the porcine gut. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **54**, 171-177.
- Straw, B. E.** (1994). Prácticas que suprimen al cerdo, traducción libre de MVZ Raúl García Peza. Universidad de Nebraska, Pfizer.
- Swindle, M.M.** (1992). Swine as Model in Biomedical Research, Iowa State University Press. EE.UU. pp. 5-15.
- Takeuchi, M.; Miyazaki, H.; Mirokawa, K.; Yokokura, T; Yoshikai, Y.** (1993). Age-related changes of T cell subsets in intestinal intraepithelial lymphocytes of mice. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1409-1411.
- Tlaskalova-Hogenova, H.; Mandel, L.; Trebichavsky, F.; Kovaru, F.; Barot, R.; Sterzi, J.** (1994). Development of immune responses in early pig ontogeny. *Vet. Immunol. Immunopathol. Special Issue.* **43**, 135-142.
- Thomas, H.C.; Jewell, D.P.** (1979). *Clinical Gastrointestinal Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Inglaterra. pp. 20-33.
- Tumbleson, M.E. ed.** (1986) Swine in Biomedical Research. Plenum Press. New York and London. pp. 1-10.
- Tyler, J. W.; Cullor, J.S.; Thurmond, M.C.; Douglas, V.L; Parker K.M.** (1990). Immunologic factors related to survival and performance in neonatal swine. *J. Am. Vet. Assoc.* **51**, 1400.
- Vajdy, M.; Lycke, N.** (1993). Stimulation of antigen-specific T and B-cell memory in local as well as systemic lymphoid tissues follow in oral immunization with cholera toxin adjuvant. *Immunology.* **80**, 197-203.

- Vaillancourt, J.P.**; Stein, T.E.; Marsh, W. E.; Leman, A.D.; Dial G. D. (1990). Validation of producer-recorded causes of preweaning mortality in swine. *Prevent. Vet. Med.* **10**, 119.
- Van Knapen, F.**; Franchimont, J.H.; Verdonk, A.R.; Stumpf, J.; Undeutsch, K. (1982). Detection of specific immunoglobulins (IgG, IgM, IgA, IgE) and total IgE levels in human trichinosis by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 973-980.
- Vega-López, M.A.**; Telemo, E.; Bailey, M.; Stevens, K.; Stokes, C.R. (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig, immunohistological evidence for an organized compartmentalisation in the lamina propria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **37**, 49-60.
- Vega, M.A.** (1994). Sistema inmune intestinal porcino. *Ciencia Veterinaria. UNAM. México.* **6**, 145-172.
- Vega, M.A.**; Stokes, C.R. (1994). Desarrollo del sistema inmune intestinal porcino. *Tec. Pecu. Méx.* **32**(1), 30-8.
- Vega-López, M.A.**; Bailey, M.; Telemo, E.; Stokes, C.R. (1995). Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **44**, 319-327.
- Viney, J.**; MacDonald, T.T.; Spencer, J. (1990). Gamma/delta T cells in the gut epithelium. *Gut.* **31**, 841-844.
- Wang, C.H.**; Korenaga, M.; Greenwood, A.; Bell, R.G. (1990). T-helper subset function in the gut of rats: differential stimulation of eosinophils, mucosal mast cells and antibody-forming cells by OX8-OX22- and OX8-OX22+ cells. *Immunology.* **71** (2), 166-175.
- Wakelin, D.**; Benham, D. (1983). The immune response. In: *Trichinella and trichinosis*, WC Campbell (ed.), Plenum Press, New York. p. 265.
- Wakelin, D.** (1984). *Immunity to parasites: How Animals Control Parasite Infections*, Edward Arnold Publishers Ltd., Londres. p. 258.
- Wakelin, D.**; Goyal, P.K.; Dehlawi, M.S.; Hermanek, J. (1994). Immune responses to *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* in mice. *Immunology.* **81**(3), 475-479.
- Wakelin, D.** (1995). Vaccines against intestinal helminths. En: *Enteric Infection 2*, Farthing, M.J.G; Keusch, G.T.; Wakelin, D. ed. Chapman and Hall Medical. pp. 107-113.
- Werner, H.**; Saalmüller, A. (1990). Distinct gamma/delta T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2⁻CD4⁻CD8⁻ T Lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **20**, 265-269.

- Whary, M.T.;** Zarkower, A. ; Confer, F.L.; Ferguson, F.G. (1995). Age-related differences in subset composition and activation responses of intestinal intraepithelial and mesenteric lymph node lymphocytes from neonatal swine. *Cellular Immunology*. **163**, 215-221.
- Williams, N.A.;** Wilson, A.D; Bailey, M; Bland-P.W; Stokes, C.R. (1992). Primary antigen-specific T-cell proliferative responses following presentation of soluble protein antigen by cells from the murine small intestine. *Immunology*. **75** (4), 608-13.
- Wilson A.D. (a);** Stokes C.R., Bourne F.J. (1986). Responses of intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses. *Immunology*. **58**, 621-627.
- Wilson, A.D. (b);** Stokes, C.R.; Bourne, F.J. (1986). Morphology and functional characteristics of isolated porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology*. **59**, 109-115.
- Wilson, A. D.;** Haverson, K.; Southgate, K.; Bland, P.W. Stokes, C.R.; Bailey, M. (1996). Expression of mayor histocompatibility complex class II antigens on normal porcine intestinal endothelium. *Immunology*. **88**, 98-103.
- Wisniewski, N.;** Mcneil, M.; Grieve, R.B. (1993). Characterization of novel fucosyl-containing and tyelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis*, muscle stage larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, 25-36.
- Yang, H.;** Parkhouse, M.E. (1996). Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulation in blood and lymphoid tissues. *Immunology*. **89**, 76-83.
- Yépez, L.;** Ortega-Pierres, G. (1994). Actualidades sobre *Trichinella spiralis*. *Ciencia y desarrollo*. **20** (117), 44-51.
- Zeitz, M.;** Schieferdecker, H.L.; James, S.P.; Riecken, E.O. (1990). Special funtional features of T-lymphocytes subpopulations in the effector compartment of the intestinal mucosa and their relation to mucosal transformation. *Digestion*. **46** (2), 280-289.
- Zuckermann, F.A. (a);** Gaskins, H.R. (1996). Distribución of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology*. **87**, 493-499.
- Zuckermann, F.A. (b);** Husmann, R.J. (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology*. **87**, 500-512.

ANEXO I

SOLUCIONES.

Solución Salina Balanceada de Hanks sin Calcio ni Magnesio (HBSS⁻).

Glucosa	1.0g
Cloruro de Sodio (NaCl)	8.0g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.4g
Fosfato de potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.06g
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	0.06g
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	0.35g
Rojo de Fenol	0.002g
Disolver en 500 ml de agua bidestilada, y ajustar el pH a 7.3 con HCl 1N o NaOH 1N según sea el caso.	
H ₂ O bidestilada	c.b.p. 1000 ml

HBSS⁻ con EDTA 1.0 mM (HBSS⁻-EDTA)

Acido Etilendiaminotetracético disódico (EDTA)	465 mg
HBSS ⁻	c.b.p. 100 ml

Solución de Ficoll/Diatrizoato de sodio.

Mezclar 12 partes de Ficoll (SIGMA) al 9% p/v en agua, con 5 partes de diatrizoato de sodio (ácido 3,5-Bis[acetilamino]-2,4,-triyodobenzoico) sal sódica. (SIGMA) al 34%. Medir la densidad que deberá ser de 1.076 - 1.077 e índice de refracción n=1.3566. Esterilizar la solución en autoclave 15 min. a 15 libras de presión (120°C).

Medio RPMI-1640 incompleto.

RPMI-1640 (con HEPES 25mM, sin bicarbonato de sodio, SIGMA R-4130) 1 frasco	
Gentamicina	5mg
H ₂ O bidestilada	c.b.p. 1000 ml

Ajustar el pH a 7.2-7.4 y esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.22 μ . Realizar la prueba de esterilidad.

Medio RPMI-1640 completo.

RPMI-1640 (con HEPES 25mM, sin bicarbonato de sodio, SIGMA R-4130)

Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	200mg*
Suero fetal bovino (Hyclone, A-2111-L)	10ml* (descomplementado)
Estreptomina	100 mg*
Penicilina	100,000 UI*
L-glutamina	2 mM concentración final*
H ₂ O bidestilada	c.b.p. 100 ml

Ajustar el pH a 7.2 y esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.22 μ . Realizar la prueba de esterilidad. (*) Estos reactivos se pueden esterilizar aparte y añadir al medio.

HBSS⁻ 10X.

Glucosa	1.0g
Cloruro de Sodio (NaCl)	8.0g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.4g
Fosfato de potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.06g
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	0.06g
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	0.35g
Rojo de Fenol	0.002g

Disolver en 50 ml de agua bidestilada, y ajustar el pH a 7.3 con HCl 1N o NaHCO₃ según sea el caso.

H ₂ O bidestilada	c.b.p. 100 ml
------------------------------------	---------------

Solución madre de Percoll isotónico.

Mezclar a 10 partes de Percoll estéril (SIGMA, P-1644).

1 parte de HBSS⁻ (s/Calcio y Magnesio) 10x.

1 parte de HEPES pH 7.3-/+ 0.1, 1M (In Vitro, 950321).

Solución Isotónica de Percoll al 80%

Mezclar 8 partes de solución madre isotónica de Percoll con 2 partes de HBSS⁻.

Solución Isotónica de Percoll al 40%

Mezclar 1 parte de percoll al 80% con 1 parte de HBSS⁻.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4, 0.1M

Cloruro de Sodio (NaCl)	8.0g
Fosfato de Potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.2g
Fosfato de Sodio dibásico dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.9g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2g

Disolver en 500 ml de agua bidestilada, y ajustar el pH a 7.3 con HCl 1N ó NaOH 5N.

H ₂ O bidestilada	c.b.p. 1000 ml
------------------------------------	----------------

Solución amortiguadora de fosfatos con azida de sodio y suero normal de cerdo (PBA).

Azida de Sodio (NaN ₃)	0.1g
Suero normal de cerdo	2.5 ml (no descomplementado)
PBS	c.b.p. 100 ml

Nota: Se recomienda utilizar el suero normal de cerdo para eliminar la inespecificidad de la tinción.

Solución amortiguadora de fosfatos con azida de sodio para el Citómetro de Flujo.

Azida de Sodio (NaN ₃)	100mg
PBS	c.b.p. 100 ml

Filtrar en membrana de 0.22 μ .

Solución fijadora de p-formaldehído al 1%.

p-Formaldehído	1.0g
PBS	c.b.p. 100 ml

Agregar el paraformaldehído a 70 ml de PBS, calentar en agitación hasta 55°C y entonces agregar 20 microlitros de NaOH 5N esperar a que se disuelva y enfriar.

ANEXO II

PROCEDIMIENTO PARA HACER COMPATIBLES LOS DATOS CAPTURADOS EN EL CITÓMETRO EN PROGRAMAS CON FORMATO DE WINDOWS.

Existen dos formas para realizar esto:

A. Contar con un traductor de archivos, que pasa los datos capturados en el citómetro de flujo en sistema Pascal, a un sistema que puede ser leído en programas de Windows de análisis de datos de FACS. Para conocer más detalles de programas traductores consultar la siguiente página de internet <http://www.bio.umass.edu/mcbfacs/flowhome.html>

B. Formatear los discos en la computadora del citómetro con los siguientes pasos:

1. Una vez encendida la computadora y estando en el menú MASTER PAGE, salir de éste pulsando la tecla QUIT.
2. colocar el disco de 3 ½ " en el drive correspondiente.
3. Al primer mensaje apretar la tecla X (para ejecutar el comando) no presionar la tecla RETURN.
4. En los mensajes subsecuentes, realizar los siguientes acciones:

<u>Desplegado en pantalla</u>	<u>Escribir</u>
Execute what file?	SYSTEM:MEDIAINIT [Return]
Volume ID?	#3 [Return]
Are you shure you want to proceed (Y/N)?	Y
Formatting options (default is 0)	16 [Return]
Interleave factor (default is 1)	[Return]

Con este procedimiento todos los archivos HP (Hewlett-Packard) creados en el programa LYSYS pueden transferirse a PC (Computadora personal) utilizando el comando HPCOPY.

5. Si se quiere formatear otro disco se procede a realizar los pasos del 2 al 4.

PROCEDIMIENTO PARA TRADUCIR LOS ARCHIVOS:

1. En una PC salir de windows a MS-DOS.
2. Insertar el disco HP compatible con PC
3. Para desplegar el directorio del disco ejecutar HPDIR a: [Enter]
4. Copiar los archivos del disco HP a una PC con cualquiera de los siguientes comandos:

HPCOPY a:*. * [Enter]

HPCOPY a:nombre del archivo [Enter]

HPCOPY a:*. * c:\nombre del directorio [Enter]

HPCOPY a:nombre del archivo c:\nombre del directorio [Enter]

Con estos pasos se transfieren los archivos a la PC y se puede utilizar programas DOS o WINDOWS como WinMDI para analizar los datos.

NOTA: El comando Hpcopy acepta solamente nombre de archivos o el comodin *.*, para traducir los archivos, ningún otro comando de DOS es valido (ejemplo: ? o nombres parciales de archivos seguidos de un *)