

20

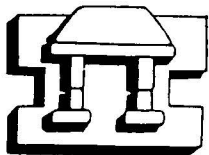


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FES-IZTACALA

"ANALISIS DE POBLACIONES CELULARES DEL
SISTEMA INMUNE INTESTINAL DE CERDOS JOVENES
ANTE LA INFECCION EXPERIMENTAL CON
Trichinella spiralis".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
HECTOR ALONSO BENITEZ BARRETO



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ

2002

TLALNEPANTLA DE BAZ, ESTADO DE MEXICO, MEXICO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA

LUGAR DE REALIZACIÓN

Institución:

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
Deptos. de Genética y Biología Molecular (Lab.2) y Patología
Experimental (Lab.9).**

Este trabajo tuvo apoyo parcial del CONACYT (proyecto 4263-M9406)

LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO FUE POSIBLE GRACIAS AL DOCTOR EN FILOSOFÍA DE LA CIENCIA **MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ**, POR SU ASESORÍA Y APOYO FINANCIERO QUE ME BRINDÓ DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Abel y Juanita, con amor y respeto les dedico este trabajo, a ustedes que han luchado tanto en la vida y que de manera directa intervinieron en mi formación humana y profesional, a ustedes a quien les debo lo que soy.

A MIS HERMANAS

Ivonne (y tu familia) y Anabel que han estado a mi lado durante mi desarrollo profesional, por su apoyo, confianza y sobre todo por su presencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al Doctor Marco Antonio Vega López, por darme la oportunidad de ser un colaborador en su trabajo, por su amistad, comprensión y confianza para que este trabajo saliera adelante.

A la Doctora Guadalupe Ortega Pierres, por las facilidades otorgadas en las instalaciones del laboratorio No. 2 del departamento de Genética y Biología Molecular del CINEVESTAV-I.P.N.

A la Doctora Leticia Moreno Fierros, M. en C. Rafael Jiménez Flores, M. en C. Martha Salcedo Alvarez y Biol. Ma. De los Angeles Sanabria Espinoza, por las sugerencias que enriquecieron este trabajo y contribuyeron a mi formación.

A mis Amigos y compañeros de la carrera, Edgar, Christian, Manolo, Rita, Fátima y muchos más...y del laboratorio, Luigui, Eli, Albert, Raúl, Mary, Arpeta y a todos aquellos que me dieron su ayuda indirectamente y que sería imposible mencionar sin cometer alguna omisión, pero ustedes saben quienes son... Gracias.

A ti Adriana Cecilia por tu apoyo incondicional.

INDICE

Abreviaturas	i
Indice de figuras	ii
Indice de cuadros	iii
Resumen	iv
Introducción	1
Modelos de estudio del sistema inmune intestinal	2
Sistema inmune intestinal porcino	3
Organización del sistema inmune intestinal	3
Maduración del sistema inmune intestinal porcino	6
Linfocitos intraepiteliales (LIE)	7
LIE en el lechón	8
LIE en el cerdo adulto	9
Células accesorias	10
Macrófagos intestinales	10
Células con moléculas de clase II del MHC	10
Eosinófilos	11
El cerdo como modelo experimental	14
<i>Trichinella spiralis</i> como modelo experimental	15
Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	15
Respuesta inmune intestinal hacia <i>Trichinella spiralis</i>	16
Justificación	19
Objetivo	20
Material y métodos	21
Animales	21
Estudio morfométrico	21
Toma de muestras	21
Cortes histológicos	22
Anticuerpos monoclonales	22
Tinción con la técnica inmunoperoxidasa para muestras congeladas	23
Tinción para eosinófilos con cromótopo 2 R	25
Determinación del número de células	25
Resultados	27
Discusión	37
Conclusiones	49
Referencias bibliográficas	51
Anexo	59

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

AbM:	Anticuerpo monoclonal
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
CC:	Célula cebada
CCM:	Célula cebada de la mucosa intestinal
CCTC:	Célula cebada de tejido conectivo
CD:	Grupos de diferenciación biológica
cm :	Centímetro
CP:	Célula plasmática
CPA:	Célula presentadora de antígeno
Cl:	Grupo control
CTL:	Actividad citolítica
DAB:	Diaminobencidina
DN:	Dobles negativos
ECP:	Proteína catiónica eosinofílica
EPO:	Peroxidasa del eosinófilo
FACS	Citometría de flujo con inmunofluorescencia
GALT:	Tejido linfoide asociado al intestino
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias del linaje granulocito-macrófago
h :	Horas
HEV	Endotelio Alto
Ig :	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
kg:	Kilogramo
LcB:	Linfocitos B
LcT:	Linfocitos T
LIE:	Linfocito intraepitelial
LM:	Larva muscular enquistada
LP:	Lámina propia intestinal
LRN:	Larva recién nacida
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MBP:	Proteína básica principal
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad
µm:	Micrómetros
mMCP-I y II:	Proteasa de célula cebada de ratón I y II
Mφ:	Macrófago
Mφ/PMN:	Macrófagos/polimorfonucleares
NK:	Células asesinas naturales
PLP:	Paraformaldehído-lisina-peryodato (fijador histológico de tejidos)
TBS:	Solución salina amortiguada de Tris
TRC:	Receptor de célula T
Th1 y 2	Linfocitos T cooperadores que difieren en función biológica
<i>T. spiralis</i> :	<i>Trichinella spiralis</i>

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Pag. 5
Esquema de la distribución celular del sistema inmune intestinal porcino	
Figura 2	Pag. 13
Representación de la red de interacciones que orquestan la inmunidad protectora	
Figura 3	Pag. 31
Enterocitos totales en vellosidades de duodeno de cerdos destetados	
Figura 4	Pag. 32
Maduración de linfocitos intraepiteliales (LIE) CD2, CD4 y CD8 en duodeno de cerdos recién destetados	
Figura 5	Pag. 32
Desarrollo de eosinófilos en duodeno porcino con relación a la edad	
Figura 6	Pag. 34
Relación entre LIE CD2+, CD4+ y CD8+ y LIE totales en duodeno de cerdos control e infectados con <i>Trichinella spiralis</i>	
Figura 7	Pag. 35
Relación entre LIE y enterocitos por vellosidad en duodeno de cerdos control e infectados con <i>T. spiralis</i>	
Figura 8	Pag. 36
Efecto de la infección con <i>T. spiralis</i> sobre los eosinófilos de la lámina propia de las vellosidades y de las criptas en duodeno porcino	
Figura 9	Pag. 47
Distribución de LIE CD2, CD4 y CD8 en el duodeno porcino al día 5 post infección	
Figura 10	Pag. 48
Eosinófilos en duodeno de cerdos sanos e infectados en lámina propia de vellosidades y criptas al día 25 post infección	

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 _____ Anticuerpos monoclonales para linfocitos T de cerdo	Pag. 22
Cuadro 2 _____ Diluciones y origen de cada uno de los anticuerpos utilizados	Pag. 23
Cuadro 3 _____ Linfocitos intraepiteliales totales por vellosidad en duodeno de cerdos control (sanos) e infectados con <i>Trichinella spiralis</i>	Pag. 33

RESUMEN

La triquinosis es una parasitosis provocada por el nemátodo *Trichinella spiralis*, distribuida a nivel mundial, el cerdo es uno de los hospederos definitivos y la fuente principal de infección para los humanos. Aún así se conoce muy poco acerca de la respuesta inmunológica en el intestino, lugar donde este parásito se aloja por un tiempo y donde debe montarse una respuesta inmunológica que trate de contrarrestar el daño. La mucosa intestinal es una superficie extensa la cuál tiene la capacidad de identificar patógenos y diferenciarlos de las moléculas inocuas.

Estudiamos en un modelo porcino, el efecto de la edad de los animales y la infección experimental con *T. spiralis*, evaluando las diferencias entre las poblaciones celulares de linfocitos intraepiteliales (LIE) y eosinófilos (EØ) dado que estos dos tipos celulares reaccionan tempranamente a antígenos que llegan a la mucosa y participan en la expulsión de parásitos respectivamente.

Se investigó la maduración celular con la edad y el efecto de la infección por *T. spiralis* en cerdos destetados de 6 a las 12 semanas de edad. Las poblaciones celulares se describieron morfométricamente en un total de 5 camadas de 10 cerdos cada una divididas en 5 controles y 5 infectados (700 larvas musculares /kg de peso) los días 2, 5, 15, 25 y 40 post infección (PI). Se realizaron cortes histológicos congelados para evaluar a los LIE y cortes embebidos en parafina para evaluar a los EØ de la región del duodeno de cada uno de los animales, los cortes congelados se tiñeron con la técnica de inmunoperoxidasa (complejo avidina-biotina) utilizando un panel de anticuerpos monoclonales (AbM) anti linfocitos T de cerdo: CD2+, CD4+ y CD8+; y los cortes en parafina se tiñeron con el colorante cromótopo 2R específico para EØ. La determinación del número de células se realizó mediante análisis de imágenes por computadora en diferentes regiones del intestino.

Los resultados indican que las células epiteliales (enterocitos) incrementan su número en las vellosidades duodenales con la edad (semana 2 hasta la 8 post destete -PD-). Los LIE mostraron incrementos relevantes en la población de CD2+ a las semanas 3 y 6 PD y en la de CD8+ a la semana 3 PD. Los EØ aumentaron paulatinamente hacia la semana 8 PD mostrando diferencias significantes en la semana 6 y 8 PD en la lámina propia de vellosidades y en las semanas 3 y 8 PD en la lámina propia de las criptas. Esto indica que los animales aún se encuentran en proceso de la maduración y aún no alcanzan una estabilidad celular en regiones específicas de la mucosa intestinal.

El efecto de la infección en las mismas poblaciones mostró que el número de enterocitos se mantuvo constante, en tanto que los LIE CD2+ mostraron cambios al día 2 PI y los LIE CD8+ a los días 15 y 25 PI. Los LIE CD2+ del total de LIE del epitelio intestinal se acercaron al 60% de los cuáles la mayoría fueron CD2+CD8+ (50-60%). Las células CD4+ no mostraron cambios importantes en ambos grupos experimentales. Se presentó una relación de 1:4 en LIE CD2+ en animales normales y de 1:3 en infectados, caso similar ocurre en CD8+. En tanto los EØ mostraron cambios drásticos desde los primeros días de infección en la lámina propia de las criptas (día 2 PI) hasta finalizar el experimento (día 40 PI), este efecto se vio a en la lámina propia de las vellosidades a partir del día 5 PI, lo que sugiere que el arribo de estas células al intestino se dá a través de las criptas (¿epitelio alto?-HEV-)

(¿epitelio alto?-HEV-) y posteriormente, ante el estímulo de la infección, migrarían a la lámina propia de las vellosidades.

La ausencia de cambios duraderos en los LIE durante la infección sugiere el despliegue de mecanismos de evasión anti-inflamatorios en la mucosa por el parásito. Sin embargo, tales mecanismos no parecen afectar la llegada de eosinófilos indicando que se están generando señales quimiotácticas importantes en el intestino. El papel de las células del sistema inmune en la eliminación del parásito sigue siendo oscuro y la reacción eosinofílica detectada en la mucosa no parece tener un efecto directo en la eliminación del parásito.

Se sugiere ampliar este tipo de estudios a otras células como las células cebadas y los linfocitos B, además de determinar con certeza el fenotipo de los LIE involucrados a través de tinciones dobles y triples por inmunohistoquímica y citometría de flujo (FACS) en diferentes regiones del intestino

INTRODUCCION

Generalidades:

El desarrollo, maduración y activación de las células del sistema inmune se lleva a cabo en diferentes tejidos, entre los cuales destacan el tejido linfóide asociado al intestino (GALT), el tejido linfóide asociado a bronquios (BALT) y el asociado a la mucosa genitourinaria, que en su conjunto forman el tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) (Librado, 1987).

De manera particular, la mucosa intestinal es la superficie de contacto más extensa entre el organismo y el medio ambiente, lo que la hace susceptible a la entrada de una gran variedad de patógenos (McGhee y Kiyono, 1993). En este contexto, el intestino es el órgano linfóide más grande y complejo del cuerpo (Abreu-Martín y Tergan, 1996).

Las estadísticas señalan que en los países del tercer mundo las infecciones en las mucosas ocupan el primer lugar como causa de muerte infantil (más de 10 millones por año) (Martínez, 1985, Stokes, Haverson y Bailey, 1996). Por esta razón la inmunología mucosal ha despertado gran interés ya que la inmunización oral podría representar la mejor vía para el control de diarreas y neumonías y para prevenir enfermedades autoinmunes al inducir tolerancia a antígenos propios (Brandtzaeg, 1995).

El sistema inmune intestinal tiene una doble función, pues posee la capacidad de reconocer patógenos como parásitos, hongos, virus, bacterias y toxinas desarrollando respuestas protectoras que los eliminan (Stokes, Haverson y Bailey, 1996) y, a su vez, puede generar tolerancia contra los antígenos inocuos de la dieta y la flora normal.

La protección a nivel de la mucosa intestinal se efectúa a través de mecanismos inespecíficos (moco, enzimas, pH, peristalsis e inflamación), donde las células caliciformes (productoras de moco), las células epiteliales, dendríticas (Walker y Owen, 1990), los eosinófilos (EØ) y las células cebadas (CC) también intervienen; y específicos (respuesta inmune) donde los linfocitos T y B juegan un papel importante en la respuesta que se monta contra antígenos y patógenos que penetran a la mucosa intestinal (Touhy, *et al.* 1990; Goyal, Hermanek y Wakelin, 1994; Abreu-Martín y Tergan, 1996).

En la mucosa intestinal los linfocitos (Lc) se encuentran en el epitelio (Lc intraepiteliales, LIE) y distribuidos en la lámina propia (LP) de las vellosidades y las criptas, así como en las placas de Peyer (Cummins y Thompson, 1997). Sin embargo el arribo de estas células al tejido, su papel fisiológico y los mecanismos de regulación del sistema inmune intestinal no están aún bien descritos. Por ello, los estudios sobre la dinámica de poblaciones celulares de la mucosa intestinal, en condiciones normales y de infección, proveerán de información valiosa acerca de la inducción, activación y regulación de los sistemas de protección en este sitio.

MODELOS DE ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE INTESTINAL

Lefrancois y cols. (1996) se han enfocado al estudio del desarrollo de LIE intestinales en ratones (BALB/cJ) y ratas (Wistar) así como ratones KOT, determinando su origen y fenotipo a través de estudios por citometría de flujo con inmunofluorescencia (FACS). Chott y cols. (1997) han estudiado las funciones de los LIE humanos y también se han realizado trabajos para estudiar la migración de Lc de la LP intestinal humana hacia la capa epitelial, como consecuencia de la pérdida de células epiteliales debidas a un daño provocado por la presencia de algún agente extraño (Mahida, *et al.* 1997).

Guy-Grand y cols. (1991) demostraron la existencia de dos poblaciones diferentes de LIE en el intestino de ratón en condiciones normales. Estas poblaciones difieren en cuanto a su receptor de células T y son CD8+ α/β -TRC α/β y CD8+ α/α -TCR γ/δ y probablemente participen en la muerte celular normal por apoptosis.

También se han realizado estudios enfocados a observar la distribución, desarrollo y maduración celular en el intestino de ratas, ratones y en menor grado en humanos en base a comparaciones con animales atímicos, tinciones con anticuerpos monoclonales y policlonales y FACS (Lefrancois, Fuller, Olson y Puddington, 1996).

Así mismo, el cerdo ha sido utilizado como modelo para evaluar el sistema inmune intestinal. Xu y cols (1993) realizaron evaluaciones histoquímicas y morfológicas de las células cebadas de intestino porcino. También se han descrito la maduración y

desarrollo de los LIE, LLP y principales células accesorias (MØ/PMN, MHC-II) y la distribución tisular de esas poblaciones, donde se ha demostrado que hay más células CD2 en vellosidades que en criptas y existe una compartimentalización de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ (Vega-López, *et al.* 1993,1995; Vega y Stokes ,1994.).

Rothkotter, Ulbrich y Pabst (1991) estudiaron los cambios postnatales en número y proliferación que ocurren con los Lc de la LP intestinal, comparando animales libres de patógenos y animales normales. Así mismo, Lunney y Pescovitz (1987) describieron la caracterización fenotípica y funcional de las diferentes poblaciones de Lc de cerdos.

Stokes, Haverson y Bailey (1996) se han enfocado a la descripción de las células presentadoras de antígeno en el intestino porcino, observando que la respuesta mucosal es mas efectiva si hay una estimulación local por antígenos extraños al hospedero.

También se ha estudiado la activación de las células T de la lámina propia intestinal porcina, ya sea por organismos comensales o por agentes extraños, y la secreción de interleucinas 2 y 4 que no se observa *in situ* de manera constitutiva sino cuando la mucosa esta dañada por efectos de inflamación (Bailey, Haverson y Stokes,1997; Bailey y cols. 1998).

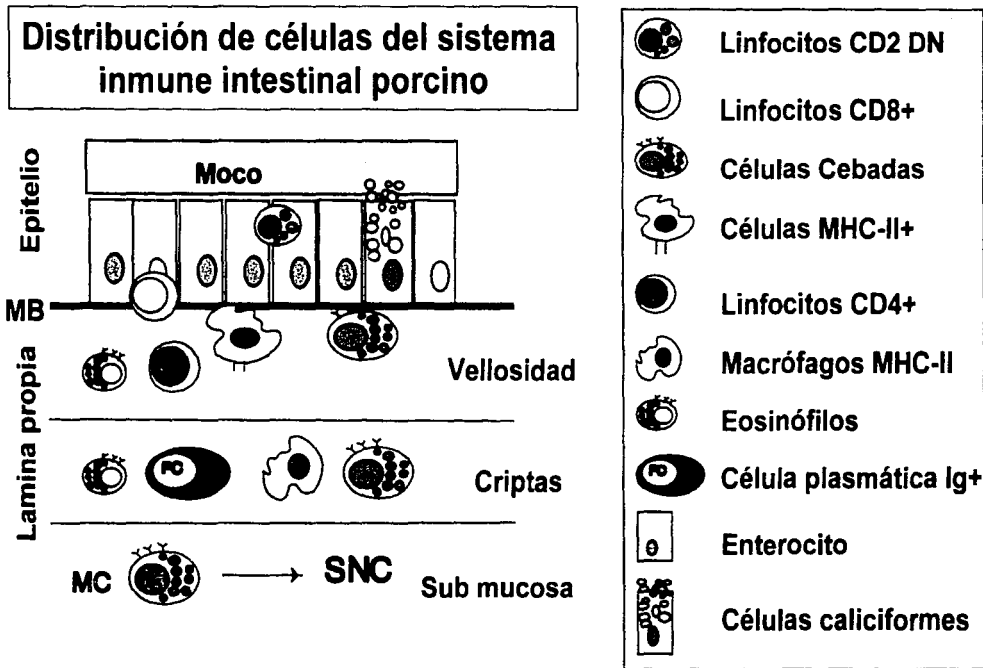
SISTEMA INMUNE INTESTINAL PORCINO

Organización del sistema inmune intestinal

El sistema inmune intestinal porcino esta constituido por linfocitos T y B, células plasmáticas (CP), macrófagos (Mφ), eosinófilos, CC y células presentadoras de antígeno (CPA), que se encuentran en el epitelio y la LP en cantidades variables y en sitios bien definidos (Vega-López, 1994). La LP contiene una de las acumulaciones más grandes de células del sistema inmune, por lo que se considera un sitio de almacenamiento de células efectoras de memoria. La mayoría de los Lc T CD2+ se localizan en las vellosidades, las células CD4+ se localizan en la parte central de la vellosidad y la mayoría de las células CD8+ se encuentran en alrededor de la membrana basal del epitelio (Fig.1) (Vega-López *et al.* 1993,1994).

En la LP intestinal también se encuentran presentes macrófagos, eosinófilos y células que expresan moléculas clase II del MHC, éstas últimas presentan morfología dendrítica, localizadas justo debajo de la membrana basal de las vellosidades y en algunas áreas cerca del epitelio glandular de las criptas (Vega-López *et al.* 1993,1994). Así mismo, las células cebadas se presentan en la lámina propia de las vellosidades y criptas (Fig.1).

Las células de la lámina propia están alejadas del contenido intestinal por medio de las células epiteliales y la membrana basal, en tanto que los LIE se encuentran separados solo por las uniones entre los enterocitos (Vega-López, 1994), por lo que pueden tener contacto directo con los antígenos que llegan al tejido (Fig. 1)



5

Fig.1: Esquema de la distribución celular del sistema inmune intestinal porcino. MB: membrana basal, MC: célula cebada, SNC: sistema nervioso central. (Vega-López, et al., 1993,1995 y 2001 en prensa).

Maduración del Sistema Inmune Intestinal Porcino

Se ha estudiado el desarrollo de las células B y T en los órganos linfoides porcinos en diferentes edades, utilizando técnicas inmunohistológicas con anticuerpos monoclonales específicos (Rothkottter, Ulbrich y Pabst, 1991; Bianchi, *et al.*, 1992, Vega-López, *et al.*, 1993, 1995).

Al nacimiento, todos los componentes celulares del sistema inmune están representados en el animal aunque en bajo número (Vega-López y Stokes, 1994). Es así que el desarrollo de las células T se hace muy evidente después del nacimiento en compartimientos como el bazo y la lámina propia del intestino delgado, observándose que hay diferentes subpoblaciones de células T que se desarrollaron antes del nacimiento (Vega-López y Stokes, 1994). Sin embargo, los lechones desde el nacimiento y hasta después del destete se encuentran con un gran número de antígenos incluyendo patógenos potenciales, los cuales pueden influir en el número y distribución de las poblaciones celulares de la mucosa intestinal. La lactancia y el destete de los animales son etapas de alta susceptibilidad a las infecciones (Vega-López y Stokes, 1994).

En las primeras 7 semanas de vida ocurren cambios cuantitativos importantes en los linfocitos T CD2+CD4-CD8- (dobles negativos, DN) en intestino, así como los monocitos/granulocitos y células con moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II) que se incrementan aún después del destete (Vega-López, *et al.*, 1993; González-Vega, *et al.*, 1993; Vega-López, *et al.*, 1995).

En los animales recién nacidos las células CD2+ intestinales presentan un fenotipo poco común, al ser principalmente DN, esas células son más numerosas en la zona de las criptas, pero después se distribuyen mayoritariamente en las vellosidades intestinales, probablemente por la gran cantidad de estímulos antigénicos provenientes del lumen intestinal (Vega-López, 1994).

Las células CD4+ (linfocitos T cooperadores) y CD8+ (linfocitos T citotóxicos) tienen un patrón diferente de desarrollo. En estudios cualitativos se observó que a la semana de

edad aumentan las células CD4+ mientras que, las células CD8+ son escasas y solo son detectables hasta las 4-5 semanas de edad en animales sin destetar (Vega-López, 1991).

Los linfocitos CD2+ aumentan constantemente después del nacimiento, lo que podría deberse al aumento de las células CD4+, a las DN ó a las células con expresión baja de CD8 (Vega-López, 1994), el desarrollo de esas células en la mucosa intestinal se realiza con un alto grado de compartimentalización para las subpoblaciones celulares (Vega-López y Stokes, 1994). Sin embargo, no existe información acerca de los cambios que podrían ocurrir en esos compartimientos durante infecciones, después del destete y antes de alcanzar la etapa adulta del animal.

Linfocitos Intraepiteliales (LIE)

El GALT, en cerdos neonatos, está expuesto a una gran variedad de antígenos relacionados con la dieta, microflora normal y con patógenos entéricos (Whary *et al.*, 1995). El GALT puede dividirse en dos regiones principales: la LP y el epitelio de las vellosidades, separadas anatómicamente por una membrana basal. Los LIE se localizan entre las células epiteliales columnares de la vellosidad intestinal y son las primeras células del sistema inmune que entran en contacto con los patógenos que invaden la superficie del epitelio intestinal (Beagley y Husband, 1998). Los LIE representan una gran población de células y como Mowat y Viney (1997) lo mencionan "probablemente la población más inusual de linfocitos en el cuerpo". Son células migratorias que continuamente circulan en el organismo, sin embargo, el número de linfocitos en el compartimiento epitelial depende de la entrada de patógenos, su proliferación *in situ*, la muerte celular, así como la migración (Rothkotter, Mollhof y Pabst, 1999).

Cabe hacer mención que los LIE han sido caracterizados extensivamente en ratón, rata y en menor grado en humanos y cerdos (Whary *et al.*, 1995; Vega-López, *et al.*, 2001 en prensa). Los LIE de humano y de ratón contienen una mezcla heterogénea de subpoblaciones con variaciones significantes en fenotipo y capacidad funcional (Lefrancois, 1991). Mediante tinciones inmunohistoquímicas y análisis por citometría de flujo, en modelos murinos, se ha demostrado que la mayoría de los LIE son células T

CD3+ (80%) y CD8+ (75-80 %) (Beagley y Husband, 1998). Así mismo, se ha estimado que el intestino delgado de los ratones contiene de 50 a 100 x 10⁶ LIE, basados en estudios *in situ*, con una relación de 1 LIE por cada 6 a 10 células epiteliales (Ernst, Befus y Bienenstock, 1985; Mosley y Klein, 1992). Los LIE se encuentran asociados con tejidos como la piel, mucosa respiratoria y genitourinaria, sin embargo, la mayoría de ellos se encuentran en la mucosa intestinal (Beagley y Husband, 1998).

El número y composición de los LIE difieren entre especies con la edad y el ambiente (Mowat y Viney, 1997). Los LIE porcinos se componen al menos de tres subpoblaciones, una formada por LIE pequeños (2.5µm de diámetro) localizados sobre la membrana basal y de fenotipo CD8+, otra se compone de células de tamaño mediano localizadas en grupos adyacentes al núcleo de los enterocitos, siendo principalmente células CD2+ DN y otra subpoblación que consiste en células granulares de aprox. 5µm localizadas en la parte apical del epitelio y que no expresa marcadores de linfocitos (¿células nulas?) (Vega-López, et al. 2001, en prensa). Romero-Ramírez (2000) evaluó esas poblaciones a través del análisis por FACS mostrando que la mayoría de los LIE son CD2+ (75-90%) población constituida a su vez por células CD8+ (60-80%), y células CD4+ (5%), sugiriendo que existe una importante subpoblación de células DN que no muestran marcador alguno, puesto que la suma entre CD4+ y CD8+ no llega al total de CD2+.

Chu y cols. (1988) en la descripción de los linfocitos intraepiteliales de la mucosa intestinal de cerdos con base a tinciones histológicas con azul de toluidina, mencionan que morfológicamente presentan gránulos metacromáticos, núcleo grande con invaginaciones de la membrana nuclear y cromatina prominente, por lo que los LIE podrían estar relacionados con las CC del intestino.

LIE en el lechón

Los lechones tienen Lc T, Macrófagos/polimorfonucleares (MØ/PMN) y células que expresan antígenos de clase II del MHC, aunque en bajo número. La mayoría de los Lc T se localizan en la LP y carecen de los marcadores CD4 o CD8 (Vega-López, 1991; Rothkotter, Ulbrich y Pabst, 1991), esta población ha sido descrita en la circulación

sanguínea del cerdo adulto (Salmuller, Hirt y Reddehase, 1989), se desconoce su función, pero se ha sugerido, que intervienen en mecanismos regulatorios (Fujihashi, *et al.*, 1990) y citotóxicos (Wilson, Stokes y Bourne, 1986).

Muchos LIE aparecen en el Intestino del lechón durante el desarrollo, los cuales generalmente tienen el fenotipo DN. Su proporción aumenta de 40 a 50% del total de linfocitos de la vellosidad en las primeras 7 semanas de vida en el duodeno, llegando al 65% en el ileon (Vega-López, 1991; Vega-López *et al.*, 2001 en prensa). También se han observado algunas células que expresan el marcador CD8 a esta edad (Vega-López y Stokes, 1994).

LIE en el cerdo adulto

La mayoría de los LIE en los cerdos adultos expresan el marcador CD2, pero algunos aparentemente no expresan los marcadores típicos de linfocitos por lo que podría tratarse de células nulas (Salmuller, Hirt y Reddehase, 1989). Esta población de células nulas es minoritaria y está presente en la zona apical de los enterocitos cerca del lumen intestinal (Vega-Lopez, *et al.*, 2001 en prensa) por lo que se podría tratar de células en proceso de extrusión (Viney, 1990). Su función e importancia son desconocidas, pero se sugiere que son una subpoblación de células en fase terminal de diferenciación (Guy-Grand, *et al.*, 1991) y programada para morir.

Se han identificado al menos otras dos subpoblaciones de LIE. Una de ellas tiene el fenotipo DN. La otra subpoblación de LIE se concentra en la membrana basal del epitelio y expresa el fenotipo CD2+CD4-CD8+ ambas en proporciones similares (Vega-López, *et al.*, 1993; Vega-López, *et al.*, 2001 en prensa). Su papel en el sistema inmune mucosal es desconocido, pero es posible que tengan un efecto regulador en la supresión de la respuesta inmune como se ha descrito en ratones (Fujihashi, *et al.*, 1990).

Muchas funciones se han descrito para los LIE, basados en estudios *in vitro*, incluyendo citotoxicidad (actividad CTL, actividad NK, actividad antiviral, actividad anti-tumor) y actividad contrasupresora (Beagley y Husband, 1998). Pese a su importante

número y a su estratégica posición en la mucosa intestinal, existen pocos estudios sobre su número y papel durante las infecciones.

CÉLULAS ACCESORIAS

Macrófagos intestinales

Si un organismo logra penetrar la superficie epitelial, es muy probable que se encuentre con células fagocíticas del linaje monocito/macrófago. Estas células son derivadas de células madre de la médula ósea y su principal función es "ingerir" y destruir partículas, incluyendo agentes infecciosos (Roitt, Brostoff y Male, 1989). La activación de estas células se da por la interacción con citocinas como la interleucina (IL)-2, IL-4 o TNF- α (factor de necrosis tumoral-alfa). En modelos murinos, la protección contra la infección por agentes como *Leishmania*, *Candida*, *Rickettsia* y *Legionella* se da a través de este mecanismo (Roitt, Brostoff y Male, 1989).

En el cerdo, estas células se encuentran en la LP intestinal, en número menor a las células CD2+. Los M ϕ al ser activados, son capaces de expresar moléculas de clase II del MHC y receptores para IL-2 en su superficie. Su función en la LP es la limpieza de restos celulares y como barrera de defensa así como la presentación de antígenos (Vega-López, 1994). Al nacimiento, los M ϕ se encuentran localizados en las criptas y en mayor número en el ileon, siendo su distribución diferente a la de las células clase II+, lo que indica que el sistema inmune intestinal porcino presenta una sorprendente distribución celular que seguramente tiene relación con su función (Vega-López, 1991 y Vega-López, *et al.*, 1993).

Células con moléculas de clase II del MHC

Las células presentadoras de antígeno (CPA) son una población de leucocitos con una alta capacidad inmunoestimuladora de la actividad funcional de las células T cooperadoras. Estas CPA son ricas en moléculas del MHC clase II, las cuales son importantes para la presentación antigénica hacia las células T CD4+ (Roitt, Brostoff y Male, 1989).

Las células B también expresan moléculas MHC clase II (especialmente después de la activación) por lo que también pueden procesar y presentar antígenos (Roitt, Brostoff y Male, 1989).

En el intestino porcino las moléculas MHC clase II, se encuentran en células que morfológicamente parecen dendríticas o interdigitantes, con grandes prolongaciones citoplásmicas, justo debajo de la membrana basal del epitelio de las vellosidades. Al nacimiento tienen una distribución homogénea en la LP, aumentando su número constantemente con la edad. En animales de mayor edad su localización se hace más focal en la LP de las vellosidades, probablemente debido a los estímulos antigénicos del medio (Vega-López, 1994).

Eosinófilos

Por muchos años se ha notado que existe una asociación entre las infecciones por helmintos y el incremento en los niveles de eosinófilos en la sangre periférica. En humanos esta asociación es muy marcada en pacientes que sufren de filariasis y triquinosis (Butterworth, 1977). En modelos animales, la infección con *T. spiralis* es uno de los métodos más viables para inducir eosinofilia en la sangre periférica, algunas de las funciones que se han descrito para los eosinófilos son: capacidad preferencial para fagocitar complejos inmunes, modulación en las reacciones de hipersensibilidad tipo I, y la habilidad de mediar el daño dependiente de anticuerpos hacia helmintos, especialmente a los estados larvales de éstos (Butterworth, 1977) así como su asociación al complemento como célula efectora (Capron, Spielberg y Prin, 1984; Venturiello, Giambartolomei y Costantino, 1995).

Morfológicamente se caracterizan por tener gránulos (aprox. 10 gránulos eosinofílicos pequeños) dentro de su citoplasma, presentando generalmente de dos a tres lóbulos nucleares. La cantidad de estas células en sangre periférica de un adulto humano sano, es de 0.25 a 0.55×10^9 células/l y en infecciones con helmintos, la cantidad se incrementa de 10 a 100 veces, en estas circunstancias el eosinófilo cambia su morfología a forma vacuolar y relativamente desgranulado (Butterworth, 1977).

Observaciones en humanos han mostrado que los eosinófilos se activan bajo ciertas condiciones clínicas, lo que incrementa la expresión de receptores para IgE, IgG y complemento (Truong, Gruart y Capron, 1993; Gounni, Lamkhioued y Ochiai, 1994), además aumenta la síntesis y secreción de enzimas y proteínas granulares (Venturiello, Giambartolomei y Costantino, 1995).

Lee (1991) menciona que los mediadores derivados de los eosinófilos como la proteína básica principal (MBP), la proteína catiónica eosinofílica (ECP) y la peroxidasa del eosinófilo, (EPO) en intestino delgado de rata, contribuyen significativamente a la respuesta inmune local mediada por células en contra de la larva recién nacida (LRN) de *T. spiralis*.

El incremento de estas células en el cuerpo sugiere que los eosinófilos juegan un papel proinflamatorio muy importante en las alergias. Sin embargo, estas células no solo son una rica fuente de gránulos citotóxicos, mediadores lipídicos y de metabolitos oxigenados, sino que también liberan varias citocinas, lo que puede tener efectos profundos en el ambiente local, incluyendo efectos autocrinos y parácrinos en la proliferación y función de ellos mismos y de otras células de origen hematopoyético, linfóide y endotelial (Lin y Befus, 1999).

Coyle y cols. (1998) mencionan que los fenómenos de inflamación se caracterizan por infiltrados de células cebadas, eosinófilos y células del perfil Th2. Las células Th2 producen un panel de citocinas que incluyen a la IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TGF α , TGF β , GM-CSF, TNF α y RANTES. La IL-4 es la responsable de la producción de anticuerpos IgE y la IL-5 se relaciona con la maduración, supervivencia y migración (quimiotaxia) de eosinófilos (Moqbel, 1996; Weller, et al., 1996).

La LRN de *T. spiralis* se considera el blanco de la respuesta inmune del hospedero (Venturiello, Giambartolomei y Costantino, 1995), y muchos estudios, en modelos murinos *in vitro* (Knapp y Oakley, 1981; Haque, et al., 1981; Lee, 1991,) sugieren que los eosinófilos pueden ser células efectoras en la infección con helmintos, sin embargo su papel *in vivo* es incierto (Herdon y Kayes, 1992; Hokibara, et al., 1997). Acerca de esto,

los eosinófilos intestinales en cerdos no han sido estudiados *in vivo*, por lo que se desconoce su número y distribución en condiciones normales y de infección.

Existe una relación directa entre los eosinófilos, CC y Lc T. Los eosinófilos, a través de la producción de citocinas como la interleucina 16 (IL-16), IL-6 e IL-1 α , pueden regular o modular la función linfocitaria, esta interacción es bidireccional, ya que los LcT son productores de IL-5 y 3, importantes para la maduración, activación y migración de eosinófilos (Fig. 2) (Befus, 1996; Lin y Befus, 1999).

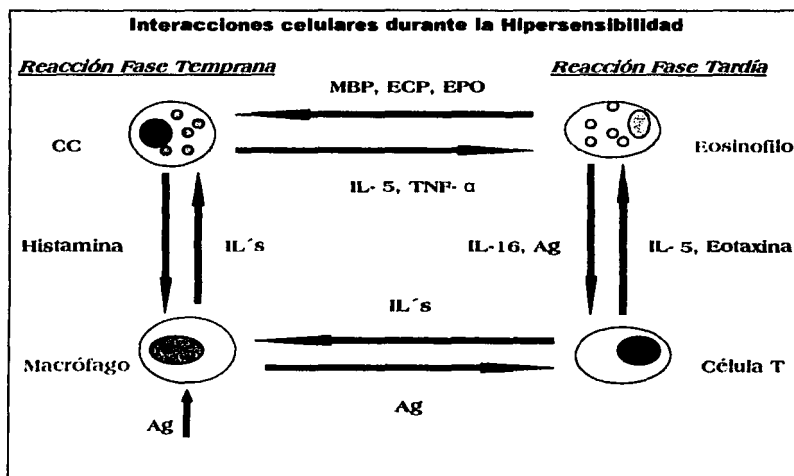


Fig. 2. Representación de la red de interacciones que orquestan la inmunidad protectora. CC: célula cebada, Ag: antígeno, TNF- α : Factor de necrosis tumoral-alfa, MBP: proteína básica principal, ECP: proteína catiónica eosinofílica, EPO: peroxidasa del eosinófilo, IL's: interleucina (Lin y Befus, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El cerdo como modelo experimental

Para llevar a cabo estudios del sistema inmune intestinal bajo condiciones de infección, se han utilizado una gama de agentes infecciosos, administrados experimentalmente al hospedero.

Un modelo apropiado para realizar estudios de inmunología es el cerdo, por su estrecha relación fisiológica y anatómica con los humanos. Muchos investigadores han utilizado al cerdo como un modelo para humanos en una diversidad de estudios (cardiovasculares, dermatológicos, nutricionales, trasplantes e inmunológicos) (Tumbleson, 1986; Stokes, 1988, 1994; Blecha *et al.*, 1990; Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 1994; Vega-López *et al.*, 1994).

Los estudios inmunológicos en este modelo, son limitados, se ha observado la respuesta de las células circulantes y la respuesta inmune humoral/sistémica (Jarry, *et al.*, 1990). También se han realizado estudios acerca de la distribución, desarrollo y número de células intestinales porcinas, donde se ha observado la compartimentalización celular a todos niveles bajo condiciones normales y de infección (Vega-López, *et al.*, 1994; García-Reyna, 1997, Romero-Ramírez, 2000).

En el modelo experimental porcino, hay pocos reportes sobre las poblaciones celulares de intestino que intervienen en la infección por *Trichinella spiralis*, siendo éste un parásito importante ya que la ingesta de carne de cerdo infectada con la larva muscular, representa la fuente principal de infección para el humano (Alcántara, De la Rosa y Correa, 1992). Utilizar al cerdo, infectado experimentalmente con *T. spiralis* es un modelo *in vivo*, filogenéticamente más cercano al humano (anatómicamente), que los modelos de laboratorio, se trata de uno de los hospederos definitivos del parásito y éste, al tener un ciclo de vida dividido en dos fases (sistémica y entérica), permite estudiar la respuesta sistémica y local al mismo tiempo. Además, el fenómeno de expulsión rápida del parásito, presente en modelos de laboratorio (Marti y Murrell, 1986; Stokes, 1994), en el cerdo no ocurre, por lo que la infección es más parecida a la de humanos.

***Trichinella spiralis* COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Ya que muchos de los patógenos causantes de enfermedad entran al hospedero a través de una superficie mucosal, los parásitos tienen un papel relevante en el estudio de la inmunidad local (Blanchi y van der Heijden, 1994; Brandtzaeg, 1995).

Trichinella spiralis ha sido descrito con profundidad en sus diversas fases de desarrollo, sin embargo se conoce poco acerca de la respuesta inmune local que se produce en el tracto gastrointestinal durante la infección (Marti y Murrel, 1986; Wakelin, 1993).

En modelos de laboratorio se ha estudiado con detalle la respuesta inmune sistémica y se han hecho aproximaciones interesantes sobre la respuesta inflamatoria local (Venturiello, Giambartolomei y Costantino, 1993; Hom y Estridge, 1994; Ramaswamy, Negro y Bell, 1996).

El estudio de *Trichinella spiralis* resulta de interés, no sólo por la enfermedad que produce (triquinelosis), sino porque provee de un buen modelo de infección intestinal, ya que el parásito completa su ciclo de vida en un tiempo relativamente corto en un mismo hospedero, lo que hace posible estudiar la relación hospedero/parásito y la respuesta inmune local y sistémica de manera integral.

CICLO DE VIDA DE *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis causa la triquinelosis, una enfermedad raramente fatal para el hombre, pero que tiene distribución mundial, constituyendo un problema de salud médico y veterinario. En México han existido brotes de la enfermedad, siendo la carne de cerdo infectada con la larva muscular de este parásito la fuente principal de transmisión (Yépez y Ortega, 1994).

Trichinella spiralis es un parásito intracelular cuyo ciclo de vida se lleva a cabo en un solo hospedero (Stewart y Giannini, 1982) y tiene dos fases: una entérica, donde presenta cuatro estadios larvarios y uno de adulto; y una sistémica que incluye a la

larva recién nacida (LRN) y a la larva muscular enquistada (LM). Su ciclo de vida, en ratas y ratones de laboratorio es relativamente corto, alcanzando el enquistamiento de las larvas a los 30 días después de la infección y la calcificación del quiste de los 6 a los 12 meses (Blagi, 1986).

Los organismos adultos de *Trichinella spiralis* se desarrollan en el intestino del hospedero después de la ingestión de carne infectada con la larva muscular enquistada. El crecimiento y desarrollo así como la maduración del adulto se lleva a cabo en las células epiteliales del intestino en alrededor de 2 a 3 días (Wright, Weidman y Hong, 1987).

Las hembras, después de haber sido fertilizadas, liberan larvas recién nacidas en la lámina propia intestinal a los 5 días post infección, mismas que atraviesan la mucosa para entrar al torrente sanguíneo y linfático, estableciéndose en el músculo estriado. En este lugar las larvas penetran las células musculares, pasando al estadio de larva muscular en una estructura llamada célula nodriza. La transformación del mlocito a célula nodriza, dura aprox. 20 días (Despommier, 1990; Baruch y Despommier, 1991). En algunos hospederos la célula nodriza puede mantener al parásito durante toda su vida, en otros, esta célula se calcifica poco a poco y muere junto con el parásito en un tiempo de 2 a 6 años (Blagi, 1986, Yépez y Ortega, 1994).

RESPUESTA INMUNE INTESTINAL HACIA *Trichinella spiralis*

El parásito adulto se establece en el epitelio intestinal rápidamente y tarda aproximadamente cinco días en liberar larvas recién nacidas (LRN), este periodo es muy corto para la generación de respuestas inmunes primarias, aunque hay que aclarar que se conoce poco de la respuesta mediada por el sistema inmune innato (Murrell, 1985). En esta zona, el parásito produce un estímulo antigénico muy heterogéneo ya que presenta una gran cantidad de antígenos por cada estadio de desarrollo, generando con esto una respuesta inmunológica celular, humoral y específica (Wakelin, 1993; Yépez y Ortega, 1994). Es así que *Trichinella spiralis* tiene la capacidad de adaptarse a condiciones ambientales y mecanismos de inmunidad diferentes (Despommier, 1990; 1993).

Durante la infección primaria con *Trichinella spiralis* en ratones, se ha descrito la expulsión rápida de parásitos adultos alrededor de la segunda y tercera semana de iniciada la infección (Kasura y Alkawa, 1980). Varios estudios sugieren que la expulsión de parásitos adultos es resultado de un proceso inflamatorio en el intestino relacionado con el fenómeno de mastocitosis, inducido por células activadas por antígenos del estadio preadulto (Miller, Huntley y Newland, 1988; Huntley, Gooden y Newlands, 1990; Yépez y Ortega, 1994).

Las CC del intestino tienen un papel relevante en el proceso inflamatorio, al existir un incremento de sus proteasas, que inducen cambios en la permeabilidad del epitelio intestinal, permitiendo la migración celular y facilitando la expulsión de gusanos adultos (Huntley, Gooden y Newlands, 1990, Friend, Ghildyal y Frank, 1996). Sin embargo el papel preciso de las células cebadas de la mucosa (CCM) en el fenómeno infeccioso es desconocido.

La respuesta inflamatoria provocada se ve asociada con la inmunoglobulina E (IgE), donde al menos 3 poblaciones celulares participan: CC, eosinófilos y basófilos, las cuales actúan durante la expulsión rápida de los parásitos (Scudamore, Newlands y Miller, 1995). Por otro lado, Tsai y cols. (1991), mencionan que el principal factor de estimulación y crecimiento para las CC es la interleucina 3 (IL-3), así como la IL-5 que sirve a los eosinófilos para su maduración y supervivencia.

Por su parte, los eosinófilos, actúan de manera muy importante durante la infección con nemátodos a través del efecto citotóxico mediado por anticuerpos (Friend, Ghildyal y Frank, 1996). Algunos de los mecanismos que contribuyen a la diferenciación y reclutamiento de eosinófilos dentro de los sitios de inflamación incluyen a la IL-3, GM-CSF e IL-5 que funciona como agente quimiotáctico induciendo eosinofilia tanto en tejidos como en sangre, como se ha reportado en ratones ante la infección con *Nippostrongylus brasiliensis* (Coffman, Jackson y Rennick, 1989; Hom y Stridge, 1994), pese a su importancia, su papel en la defensa contra infecciones no se ha establecido.

Trabajos recientes en cerdo, se han enfocado a observar la funcionalidad de las células presentes en la mucosa intestinal, principalmente Lc de la LP y LIE de la región del duodeno. García-Reyna, 1997 realizó estudios morfométricos sobre la maduración de Lc T de la lámina propia intestinal durante y después del destete y sobre el efecto de la infección con *T. spiralis*, analizando también la respuesta *in vitro* hacia antígenos del parásito. Ese trabajo mostró que los animales de las 6 a las 12 semanas de edad no tuvieron cambios relevantes en el número y distribución de Lc T. En cuanto a la infección, no se detectaron diferencias entre los grupos experimentales (control e infectado) y la respuesta hacia antígenos del parásito no fue detectable a nivel sistémico y local, sugiriendo que el parásito podría modular la respuesta inmune para evitar su expulsión.

Romero-Ramírez (2000) analizó por citometría de flujo las poblaciones celulares del sistema inmune porcino ante la infección con *T. spiralis* encontrando solo diferencias sutiles con la edad en los diferentes órganos que se evaluaron, aunque en algunos casos la proporción de células cambió al comparar animales control e infectados, entre las poblaciones cambiantes están CD2+, CD8+ en ganglio linfático mesentérico y CD4+ en LP intestinal. Así mismo, en epitelio de cerdos normales de las 6 a las 12 semanas de edad, las células CD2+ y CD8+ aumentaron de manera continua, en cambio a nivel de infección con *T. spiralis*, estas poblaciones no mostraron diferencias con los animales control, en tanto que la células accesorias disminuyeron su número a los 2 días post infección (Clase II del MHC), lo que sugiere que el parásito se encuentra evadiendo la respuesta inmune de manera continua.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de la maduración de las células del sistema inmune de la mucosa intestinal porcina, después del destete, es de relevancia ya que este periodo de vida está caracterizado por una alta susceptibilidad a múltiples enfermedades. En este contexto ya existen estudios enfocados a observar los cambios que ocurren en la lactancia (Vega-López y Stokes, 1993) y durante el destete (Vega-López, *et al.*, 1995), por lo que estudiar el periodo después del destete, serviría para entender los aspectos involucrados en la maduración de los animales. Las infecciones pueden modificar la distribución y el número de células del sistema inmune de la mucosa por lo que la infección experimental con *Trichinella spiralis* provee de un buen modelo para su evaluación.

Anteriormente ya se estudio *in situ* el efecto de la infección sobre los linfocitos de la lámina propia intestinal (LLP) porcina (García-Reyna, 1997) y de los LIE y LLP *in vitro* (FACS, Romero-Ramírez, 2000), por lo que, en este trabajo se pretende analizar el efecto de la edad y de la infección sobre los LIE *in situ*, con lo que se complementaría el estudio de inmunidad mucosal porcina ante infecciones parasitarias.

Por otro lado, se estudiara el efecto de la infección experimental con *T. spiralis* sobre los eosinófilos intestinales del cerdo, por tratarse de células representantes de los mecanismos inespecíficos de defensa y que se encuentran muy relacionadas con las respuestas inducidas por parásitos helmintos interviniendo en fenómenos como la expulsión, además de ser células que influyen en la respuesta inflamatoria regulada por otras células como las CC y los Lc T.

OBJETIVO

Analizar el efecto de la edad y de la infección experimental con *Trichinella spiralis* sobre los linfocitos intraepiteliales y eosinófilos intestinales, en cerdos recién destetados.

MATERIAL Y METODOS

• Animales.

Se utilizaron 5 camadas, de 10 cerdos destetados cada una, de la raza Yorkshire x Landrace, de 6 semanas de edad, provenientes de una granja libre de enfermedades enzoóticas y que no vacuna a sus animales. Cada camada se dividió en dos grupos (control e infectado con *Trichinella spiralis*) los cuales se mantuvieron en corrales separados dentro del bioterio del CINVESTAV - IPN.

Los animales del grupo infectado fueron inoculados oralmente con carne de rata infectada con *T. spiralis* a razón de 700 larvas musculares / kg de peso. Se sacrificó un animal del grupo control y uno del grupo infectado de cada camada a los días 2, 5, 15, 25 y 40 post infección con una sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico (Anestesal/Smithkline Beecham).

Estudio Morfométrico

a) Toma de muestras

Se tomaron dos muestras de 2 a 3 cm de intestino delgado proximal (10 cm adelante del piloro) de cada uno de los animales control e infectados. Una muestra fue depositada rápidamente en un vial con una solución crioprotectora (Tissue Tek, O.C.T. compound MILES, Diagnostics Division EIKHART, USA) y se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -70° C en un ultracongelador Cryostar-85. Estas muestras se utilizaron para la evaluación de los LIE por la técnica de inmunoperoxidasa (avidina-biotina). La otra muestra de tejido se colocó en una solución fijadora de paraformaldehído-lisina-peryodato (PLP) dejándolo actuar por 24 h a 4°C para su inclusión en parafina (Mc Lane y Nakane, 1974; Gendelman, *et al.* 1983). Estas muestras se usaron para evaluar a los eosinófilos intestinales mediante la tinción concromótopo 2R (Lendrum, 1944) (ver anexo).

b) Cortes Histológicos

Del intestino delgado congelado se realizaron cortes histológicos de 4 μm de espesor en un crióstato (MINITOME, International Equipment, Co.). Los cortes se depositaron en laminillas previamente cubiertas con pol-L-lisina al 0.1% (SIGMA, Lot. 62H0601, 657-27-2) para su mejor adhesión, fueron secados al aire y se fijaron en acetona por 10 minutos a 4°C, conservándose envueltos perfectamente en papel higiénico y papel aluminio a -70° C hasta su utilización. También se realizaron cortes seriados de aproximadamente 2 μm de espesor de las muestras embebidas en parafina en un microtomo (Jung Histocut 820. LEICA, Alemania) se flotaron en un baño maría (aprox. 50° C) para su extensión, enseguida fueron colocados en laminillas y éstas se secaron en una parrilla caliente para la mejor adhesión del corte, terminado el procesamiento se almacenaron a temperatura ambiente.

c) Anticuerpos monoclonales (AbM)

Se utilizó un panel de AbM anti CD2, CD4 y CD8 (Cuadro 1) para la identificación de linfocitos T en la mucosa intestinal por inmunohistoquímica. Estos anticuerpos fueron donados por la Dra. Joan K. Lunney (Immunology and Disease Resistance Lab. LPSI, ARS, USDA) y la Dra. Karin Haverson (University of Bristol, R.U.).

ESPEC.	CLONA	ISOTIPO	REFERENCIA
CD2	MSA-4	IgG2b	(Hammerberg y Shurig, 1986)
CD4	74-12-4	IgG2b	(Pescovitz, Lunney y Sach 1985)
CD8	MIL-12 (288A1)	IgG2a	(Pescovitz, Lunney y Sach 1985)

Cuadro 1. Panel utilizado de anticuerpos monoclonales para linfocitos T de cerdo.

d) Tinción con la técnica de inmunoperoxidasa (avidina-biotina) para muestras congeladas.

*** Hidratación**

Las muestras congeladas se colocaron en solución salina amortiguada de Tris (TBS) (ver anexo) por 10 min para eliminar el exceso de la solución protectora y para su hidratación.

*** Bloqueo de la peroxidasa endógena**

Las muestras fueron tratadas en metanol absoluto con 2.5% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 30%) (ver anexo) por 1 h a temperatura ambiente, para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena del tejido. Después fueron lavadas 3 veces con TBS por 5 min.

*** Tinción**

Se utilizó suero normal de cabra como "suero de bloqueo" (Kit Kirkegaard Perry Laboratories (KPL) Maryland, USA cat. 71-0018) para cubrir por completo las muestras durante 1 h en cámara húmeda, con el objetivo de reducir la unión inespecífica de los anticuerpos al tejido.

*** Anticuerpo primario**

Las muestras se decantaron y se quitó el exceso de suero de los bordes del tejido para enseguida incubarlas con la dilución apropiada del anticuerpo monoclonal respectivo por 2 h en cámara húmeda (Cuadro 2).

ANTICUERPO	DILUCIÓN	ORIGEN
α CD2	1:10	Sobrenadante de cultivo
α CD4	Concentrado	Sobrenadante de cultivo
α CD8	Concentrado	Sobrenadante de cultivo

Cuadro 2. Diluciones y origen de cada uno de los anticuerpos utilizados.

Transcurrido el tiempo, las muestras se lavaron 3 veces con TBS, 5 min c/u.

• Anticuerpo biotinilado (Kit KPL)

Se limpió el exceso de TBS de las laminillas y enseguida se aplicó el anticuerpo biotinilado del kit (cabra anti IgG de ratón) incubándose por 1 h en cámara húmeda. Se lavaron los tejidos 3 veces con TBS por 5 min en c/u.

• Aplicación de estreptavidina – peroxidasa (Kit KPL)

Se limpió el exceso de TBS de las muestras y se colocó la estreptavidina conjugada con peroxidasa del kit por 1 h en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, se lavaron las muestras 3 veces con TBS por 5 min en c/u.

• Diaminobencidina (DAB) (Sigma Chemical Co.)

Se limpiaron las muestras del exceso de TBS y para visualizar la reacción se aplicó la solución de DAB (ver anexo) controlando la intensidad de la tinción en un microscopio óptico. Para detener la reacción las muestras se sumergieron en la solución de TBS, así mismo se realizaron los lavados correspondientes (3 veces por 5 min c/u.).

• Contrateñido y Montaje

El contrateñido se realizó con Hematoxilina de Harris por 30 seg, pasando las muestras por agua corriente (para observar el viraje) y por alcohol ácido (pocos segundos) para eliminar todo exceso de colorante, las laminillas se pasaron nuevamente por agua corriente para lavar los residuos de alcohol ácido. Las muestras fueron deshidratadas colocándolas en un tren de alcoholes: 70%,70%, 90%,90% y 100%,100% por 5 min en c/u. Finalmente se realizó el aclarado con Xilol por 5 minutos. Para el montaje de las muestras se utilizó una resina sintética (Micromount Surgipath, USA).

e) Tinción para eosinófilos con Cromótopo 2R (Lendrum, 1944)

*** Hidratación**

Los cortes en parafina fueron colocados en dos baños de xilol por 5 min, para eliminar la parafina del tejido y enseguida se pasaron por alcohol al 100% y 90% 2 veces en cada uno por 5 min para su hidratación.

*** Aplicación del colorante cromótopo 2R (ver anexo)**

Los tejidos se colocaron en el colorante de cromotopo 2 R por 50 min. Transcurrido el tiempo los tejidos fueron lavados en agua corriente. No hubo contratinción.

*** Deshidratación y Montaje**

Las muestras se colocaron en una solución de alcohol ácido por pocos segundos, para eliminar el exceso de colorante, enseguida se colocaron en un tren de alcoholes: 90%,90%, 100%,100% y Xilol. Para el montaje de las muestras se utilizó resina sintética (Micromount, Surgipath, USA).

f) Determinación del número de células

El conteo de las células se realizó utilizando un sistema semi-automático de análisis de imágenes por computadora de alta resolución (VIDS V, Synoptics, Essex, England). Este programa permite observar la imagen digitalizada de las muestras sobre un monitor a color, haciendo posible medir el área de interés y contar las células positivas al AbM en dicha área.

En cada muestra de intestino se definió el área de interés a medir, como: epitelio de las vellosidades, lámina propia de las vellosidades y lámina propia de criptas.

Linfocitos intraepiteliales

De cada muestra de tejido fueron seleccionadas 5 vellosidades similares en tamaño y orientación del corte, realizando en cada una de ellas un conteo triple sobre el epitelio:

- a) Primer conteo: número total de enterocitos
- b) Segundo conteo: número total de linfocitos intraepiteliales
- c) Tercer conteo: número total de células positivas al AbM

Se obtuvo la relación del número de células por vellosidad, la relación entre LIE positivos al marcador y los LIE totales en la vellosidad y número de células positivas al marcador contra el número total de células epiteliales sobre la vellosidad intestinal (enterocitos).

Eosinófilos

En cinco vellosidades de cada muestra se realizó un conteo de células positivas a la tinción de cromótopo 2R en la LP de las vellosidades y criptas.

Se realizó la comparación de los datos obtenidos en los animales control a las diferentes edades (maduración) y entre los animales control e infectados con *T.spiralis* (Infección).

Se hizo el análisis estadístico empleando la prueba t-Student pareada, para evaluar las diferencias entre ambos grupos experimentales.

RESULTADOS

1) EFECTO DE LA MADURACIÓN

A) ENTEROCITOS TOTALES EN EL EPITELIO DEL INTESTINO DELGADO PORCINO

El número promedio de enterocitos por vellosidad en el duodeno aumentó con relación a la edad, de la semana 2 (319 ± 19) a la semana 8 (394 ± 6) (Fig. 3), mostrando diferencias significativas a las semanas 3 ($p < 0.05$), 4 ($p < 0.05$), 6 ($p < 0.01$) y 8 ($p < 0.001$) post destete, con relación a la semana 2 de edad.

B) CAMBIOS EN LIE CD2, CD4 Y CD8 EN EL EPITELIO INTESTINAL DE CERDOS RECIÉN DESTETADOS

Las células positivas para cada marcador inmune se expresaron en los gráficos como número de células por vellosidad en las diferentes semanas después del destete, los animales fueron destetados a las 4 semanas de edad.

Las células CD2+ aumentaron en las semanas 3 y 6 post destete (102 ± 15 y 118 ± 20 respectivamente) con relación a la semana 2 (71 ± 7) ($p < 0.05$) (Fig. 4).

Se detectaron muy pocas células CD4+ en el epitelio los que oscilaron entre 0.00 y 0.15 células por vellosidad (Fig. 4), sin mostrar cambios estadísticamente significantes con la edad.

Las células CD8+ aumentaron en número conforme pasó el tiempo, encontrándose a la semana 3 el pico máximo (89 ± 12), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) con relación a la semana 2 (70 ± 12) (Fig. 4).

C) EOSINÓFILOS EN EL INTESTINO DE CERDOS RECIÉN DESTETADOS

Los eosinófilos se contaron en la lámina propia tanto de las vellosidades (LPV) como de las criptas (LPC) duodenales de los animales del grupo control ($n = 5$), y representan el promedio de 5 campos microscópicos elegidos al azar en cada uno de los animales. Los resultados se expresaron como densidad de células (cs/mm^2) en el tejido.

En la LPV desde la semana 2 a la 8 post destete, los valores oscilaron entre 600 y 800 células, mostrando diferencias estadísticamente significantes en las semanas 6 (802 ± 93) y 8 (753 ± 83) ($p < 0.05$) con relación a la semana 2 (619 ± 78) (Fig. 5). En la LPC se observó el aumento más importante de células con el tiempo, ya que al inicio del estudio se encontraron cerca de 700 células por mm^2 y al final se alcanzó un valor de 1400 células por mm^2 . En esta zona, se encontraron diferencias significantes en las semanas 3 (771 ± 88) ($p < 0.05$) y 8 (1460 ± 202) ($p < 0.01$) comparados con la semana 2 (695 ± 63) post destete (Fig. 5).

2) EFECTO DE LA INFECCIÓN

A) El número de enterocitos en el epitelio duodenal no presentó cambios en los diferentes días post infección al compararse con el grupo control.

B) LINFOCITOS INTRAEPITELIALES CD2+, CD4+ y CD8+ EN CERDOS INFECTADOS CON *Trichinella spiralis*.

El grupo infectado con *T. spiralis* presentó, al día 2 PI (109 ± 25), un aumento significativo ($p < 0.01$) en las células CD2+ localizadas en el epitelio de la vellosidad, comparado con el grupo control al mismo día (71 ± 16) (Cuadro 3). En los días subsecuentes no se observaron diferencias entre ambos grupos. Los LIE CD4+ en el grupo infectado, mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) solo al día 5 PI (0.30 ± 0.4) (Cuadro 3). Finalmente, los LIE CD8+ del grupo infectado presentaron aumentos estadísticamente significantes los días 15 (114 ± 19) y 25 (117 ± 23) post infección ($p < 0.05$) comparado con el control al mismo día (84 ± 17 y 76 ± 46 respectivamente) (Cuadro 3).

C) PROPORCIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LIE (CD2, CD4 Y CD8) CON RELACIÓN A LOS LIE TOTALES.

El porcentaje de células CD2+ en animales control a las 6 semanas de edad con relación al total de linfocitos presentes en el epitelio fue de cerca del 50% manteniéndose en valores constantes hasta las 12 semanas de edad, en tanto que los animales infectados mostraron valores ligeramente más elevados al día 2 PI (54 ± 4 en infectados y 48 ± 5 en controles) ($p < 0.05$) (Fig. 6a).

El porcentaje de LIE CD4+ con relación al total de LIE en el epitelio fue mínimo en animales control, en tanto que en animales infectados fue de alrededor de 0.50 %, con diferencia estadística al día 5 PI de ($p < 0.05$, 0.67 ± 0.07) (Fig. 6b).

Finalmente la proporción de las células CD8+, no mostró diferencias significativas entre grupos y osciló entre 43 y 60% a lo largo del estudio (Fig. 6c).

D) RELACIÓN DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES CON ENTEROCITOS TOTALES EN LA VELLOSIDAD.

La relación entre LIE CD2+ y células epiteliales (CE) en el grupo control (CII) promedió 1 LIE por cada 4 CE (0.25), mientras que en el grupo infectado los valores aumentaron en el día 2 PI (0.34 ± 0.15) ($p < 0.05$) mostrando una relación promedio de 0.30, es decir, 1 LIE por casi cada 3 CE (Fig. 7a).

La relación entre los LIE CD4+ y las CE en intestino porcino presentó valores promedio muy pequeños debido a su bajo número en el epitelio intestinal (Cuadro 3), tanto en animales CII como en infectados, sin embargo en estos últimos, al día 5 PI (0.0011 ± 0.0004) existió una diferencia ($p < 0.05$) en comparación con el grupo CII (Fig. 7b).

En torno a las células CD8, su relación con las CE mostró que en los animales control mantuvieron una relación promedio de 1 LIE por cada 4-5 CE (0.22), en tanto que en los

animales infectados existió un aumento en dicha zona, mostrando una relación promedio de 1 LIE CD8 por cada 3 CE (0.30), señalando una diferencia estadísticamente significativa en este grupo al día 15 (0.28 ± 0.13) y 25 PI (0.31 ± 0.13) comparado con el grupo CII (0.20 ± 0.08) ($p < 0.05$) (Fig. 7c).

E) EFECTO DE LA INFECCIÓN CON *T. spiralis*. SOBRE LA POBLACIÓN DE EOSINÓFILOS EN EL INTESTINO DE CERDOS RECIÉN DESTETADOS.

Los resultados muestran únicamente los valores obtenidos en la LP de las vellosidades y criptas duodenales, ya que se demostró que en el epitelio no había eosinófilos.

Los eosinófilos detectados en la LP de vellosidades (LPV) de duodeno en los animales del grupo infectado a los diferentes días post infección oscilaron entre 780 y 1300 células por mm^2 , existiendo diferencias significativas con los animales control los días 5 (839 ± 70), 15 (982 ± 103), 25 (1086 ± 107) de ($p < 0.05$) y 40 (1321 ± 106) de ($p < 0.01$) post infección (Fig. 8a).

En la LP de criptas (LPC), los valores oscilaron entre 967 y 1500 eosinófilos por mm^2 , mostrando diferencias estadísticamente significantes con los animales control en todos los días post infección con $p < 0.05$ a los días 2 (1048 ± 139), 5 (1070 ± 166) y 40 (1516 ± 139) y de $p < 0.01$ a los días 15 (1277 ± 227) y 25 (1527 ± 296) PI (Fig. 8b).

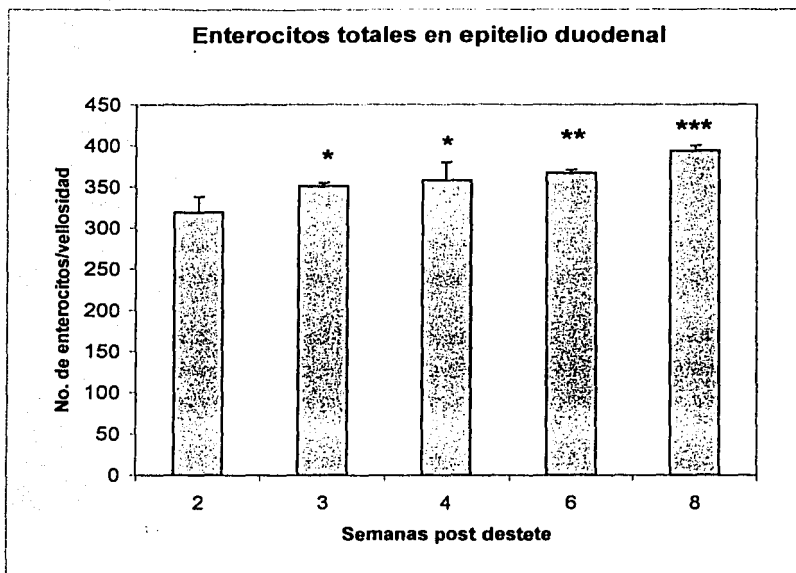


Figura 3. Enterocitos totales en vellosidades de duodeno de cerdos destetados. Las barras representan el promedio de 5 vellosidades elegidas al azar por animal ($n = 10$ por grupo), con su desviación estandar. Los valores de cada semana se compararon contra la semana 2 por la prueba t-Student pareada y la significancia estadística se expresó con asteriscos (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ y (***) $P < 0.001$.

Maduración de LIE en duodeno porcino

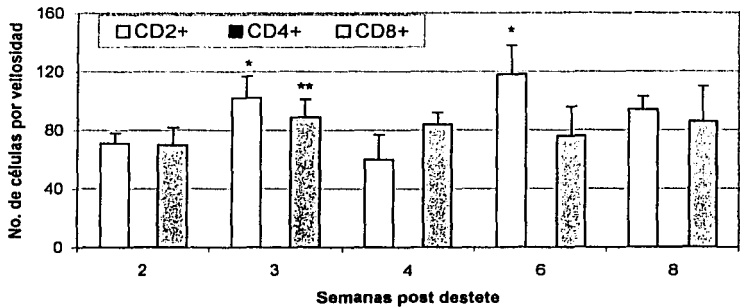


Figura 4. Maduración de LIE CD2, CD4 y CD8 en duodeno de cerdos recién destetados. Las barras representan los valores promedio de 5 vellosidades por animal en un total de 5 animales por grupo \pm el error estandar de la media. Las diferencias (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ son con relación a la semana 2 post destete respectivamente, con la prueba t-Student pareada.

Maduración de eosinófilos en duodeno porcino

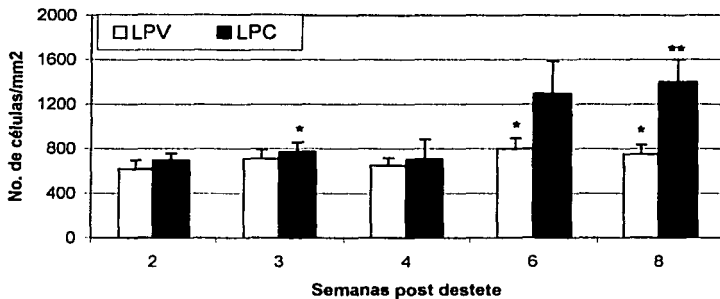


Figura 5. Desarrollo de eosinófilos en duodeno porcino con relación a la edad. Las barras se refieren al valor obtenido del promedio de la cuenta de 5 campos microscópicos elegidos al azar en un total de 5 animales por grupo control en la zona de la lámina propia de vellosidades y criptas más su error estandar. (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ se consideró significativo, mediante la prueba t-Student pareada, comparando las semanas 3, 6 y 8 contra la 2 post destete.

	Días PI	Animales		P <
		Control	Infectados	
LIE totales	2	101 (39)	164 (54)	0.062
	5	116 (47)	164 (74)	0.282
	15	103 (35)	143 (59)	0.258
	25	124 (53)	170 (57)	0.212
	40	125 (40)	152 (61)	0.382
LIE CD2+	2	71 (16)	109 (25)	0.01
	5	102 (33)	130 (24)	NS
	15	60 (38)	89 (24)	NS
	25	118 (47)	121 (22)	NS
	40	93 (46)	108 (35)	NS
LIE CD4+	2	0.13 (0.3)	0.3 (0.2)	NS
	5	0(0)	0.3 (0.4)	0.05
	15	0(0)	0.3 (0.7)	NS
	25	0(0)	0.2 (0.3)	NS
	40	0.15 (0.3)	0.5 (0.6)	NS
LIE CD8+	2	71 (26)	104 (44)	NS
	5	89 (26)	107 (22)	NS
	15	84 (17)	114 (19)	0.05
	25	76 (46)	117 (23)	0.05
	40	86 (54)	115 (19)	NS

Cuadro 3. Linfocitos intraepiteliales (LIE) totales por vellosidad, en duodeno de cerdos control e infectados (700 LM/kg de peso) con *Trichinella spiralis*. Los valores representan el promedio de las cuentas de cinco vellosidades escogidas al azar por animal en un total de 5 animales por grupo experimental y por día postinfección (PI). La desviación estándar se muestra entre paréntesis. Los grupos se compararon con la prueba t-Student pareada. NS= no significativo.

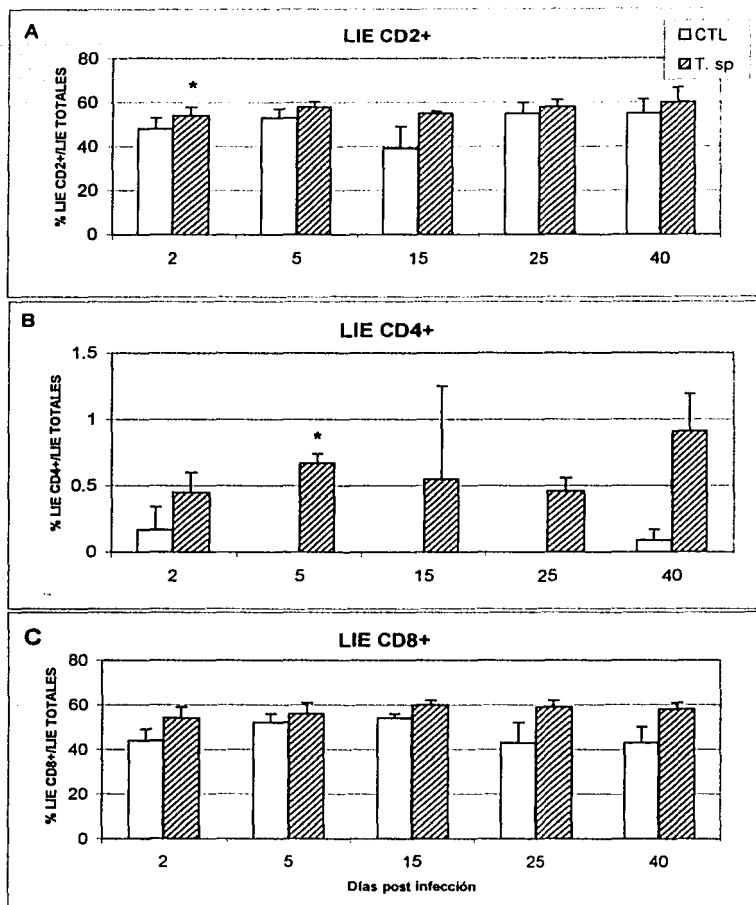


Figura 6. Relación entre linfocitos intraepiteliales CD2+ (A), CD4+ (B) y CD8+ (C) y LIE totales en duodeno de cerdos control e infectados con *T. spiralis*. Las barras representan el promedio obtenido de los cocientes entre LIE positivos a la marca y LIE totales de 5 vellosidades en un total de 5 animales por grupo en A y C y al menos 3 animales en B y por día de infección, más el error estándar de la media. (*) $p < 0.05$ se consideró significativo con la prueba t- Student pareada. Las escalas de los gráficos son diferentes.

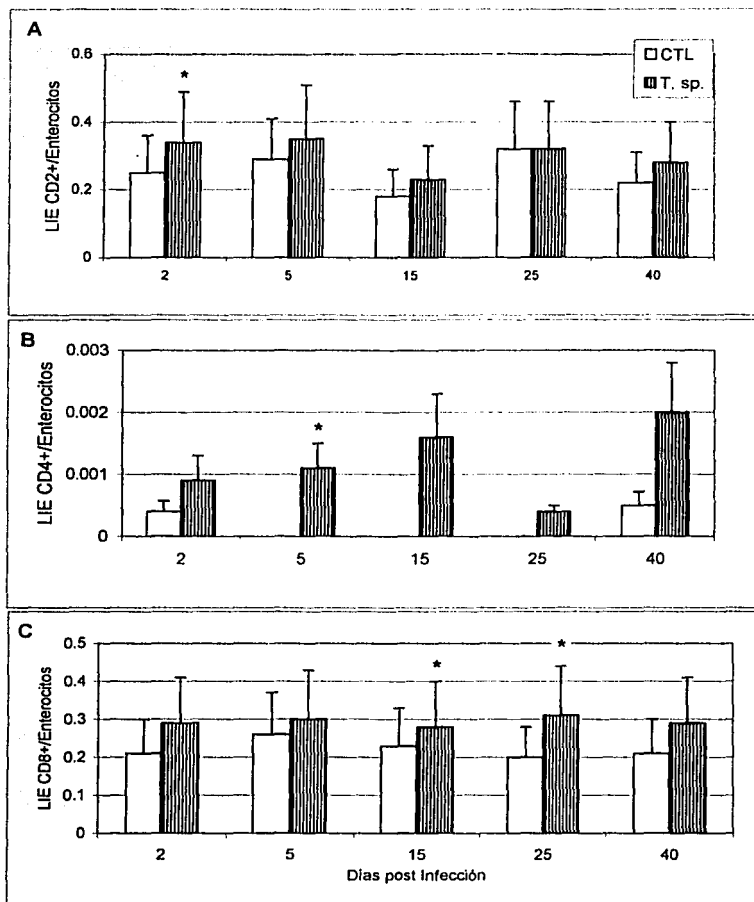


Figura 7. Relación entre LIE y enterocitos por vellosidad en duodeno de cerdos control (barras vacías) e infectados con *T. spiralis* (barras sombreadas). Las barras representan el promedio obtenido de los cocientes de LIE CD2+ (A), LIE CD4+ (B) y LIE CD8+ (C) con los enterocitos totales de 5 vellosidades por animal, en un total de 5 animales por grupo en A y C; y de al menos 3 animales por grupo en B y día post infección (PI), más el error estándar de la media. (*) $p < 0.05$ se consideró significativo usando la prueba t-Student pareada. Las escalas de cada gráfico son diferentes.

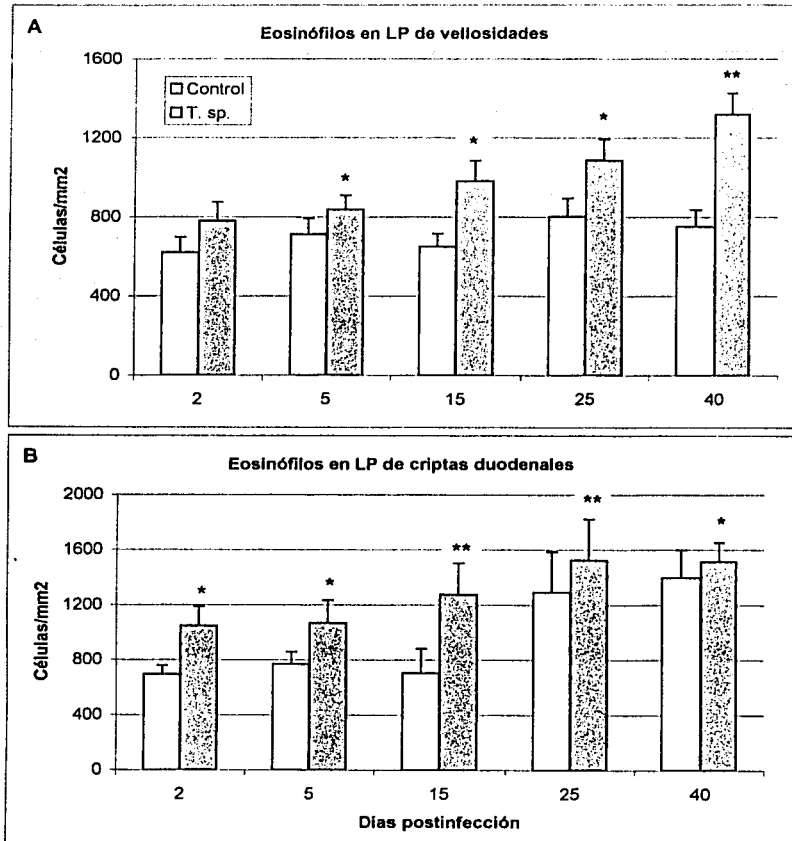


Figura 8. Efecto de la infección con *T. spiralis* sobre los eosinófilos de la lámina propia de las vellosidades (A) y de las criptas (B) de duodeno porcino. Las barras representan los promedios de las cuentas de 5 campos microscópicos elegidos al azar de 5 animales por grupo más su error estándar a diferentes días de infección. (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ por la prueba t-Student pareada comparando ambos grupos experimentales por día de infección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron, mediante inmunohistoquímica, los cambios que ocurren después del destete en algunas poblaciones celulares del sistema inmune intestinal en cerdos jóvenes, así como el efecto de la infección experimental con *Trichinella spiralis* en esas poblaciones. El estudio morfométrico estuvo apoyado en el análisis de imágenes por computadora (Fujita, 1983).

I. MADURACIÓN

A. ENTEROCITOS

Los resultados de este estudio muestran que el número total de enterocitos de las vellosidades intestinales de los animales sin infectar, se incrementó con la edad de la semana 2 a la semana 8 ($p < 0.001$) post destete (Fig. 3), lo que demuestra el crecimiento constante del tejido. Takimoto y cols. (1992), mencionan que con la edad existe un incremento normal de células intestinales en el epitelio de ratas y ratones, asociado al contacto con la dieta normal después del nacimiento (Cummins y Thompson, 1997). Es importante evaluar estos cambios ya que en una etapa como el destete, se presentan cambios importantes en la fisiología intestinal del animal, mismos que correlacionan con los movimientos celulares y reflejan el estado de madurez del órgano. Sin embargo, estudios similares en cerdos no se habían llevado a cabo hasta ahora.

B. LIE

Con relación a la maduración de células inmunológicas, durante el periodo de las 2 a las 8 semanas PD, se encontró que los LIE CD2+ aumentaron significativamente en las semanas 3 y 6 (Fig.4). Los LIE CD8+ aumentaron ligeramente y solo con significancia en la semana 3, sugiriendo que probablemente las células CD2+ y CD8+ pertenecen a poblaciones diferentes, debido a que los cambios en estas células no coincidieron en el tiempo (Fig.4). Esto podría explicarse debido a que los LIE se conforman de varias subpoblaciones de células como las dobles negativas, las CD2+CD4-CD8+ y en mucho menor número las CD2+CD4+CD8-, apareciendo así mismo, otras células denominadas células nulas que no expresan ninguno de los marcadores anteriores (Vega-López y Stokes, 1994). Las células CD2+ dobles negativas son las primeras en incrementar su número después del nacimiento, en tanto que las CD2+ CD8+ solo aparecen a las 7

semanas en animales sin destetar o a los pocos días después del destete (Vega-López y Stokes, 1994; Vega-López, *et al.*, 1995; Stokes, 1996). En este trabajo se demostró que a partir de la semana 2 PD la células CD2+ y CD8+ del epitelio intestinal siguen cambiando, aunque en menor medida que en la lactancia (Vega-López *et al.*, 1993), indicando que el órgano se acerca a su maduración, probablemente influido por el desafío antigénico de la nueva alimentación y de la microflora intestinal. La función de estas células podría ser citolítica (CTL) constitutiva como se ha descrito en el modelo murino (Abreu-Martin y Targan, 1996), lo que puede ser un mecanismo importante de defensa contra patógenos invasores y para la destrucción de células epiteliales infectadas. Las células CD4+ solo se encontraron esporádicamente en el epitelio intestinal (Fig. 4), confirmándose que su localización preferencial es la lámina propia de las vellosidades (Vega-López, *et al.*, 1993; Vega-López, 1994; Bailey, 1998; García-Reyna, 1998).

Takimoto y colaboradores (1992) aseveran que la subpoblación de LIE CD2+CD8+ en la rata Wistar, aumenta con la edad, al comparar ratas SPF (libres de patógenos) con animales normales, debido directamente a la estimulación por la microflora intestinal. Por otro lado, Challacombe, (1980), Bailey (1993) y Husby (1994) proponen que el sistema inmune intestinal responde a antígenos de la dieta, produciendo tolerancia inmunológica, por lo que esta reacción de protección contra respuestas innecesarias hacia antígenos inocuos debe requerir de un sistema inmune local maduro. Los LIE, por su ubicación en el epitelio intestinal, son los primeros en tener contacto con los antígenos que llegan al lumen intestinal, por lo que se sugiere que tienen la capacidad de diferenciar a los patógenos potenciales de las moléculas inocuas de la dieta, aunque esta función podría recaer también en las células presentadoras de antígeno.

C. EOSINÓFILOS

Los eosinófilos son células efectoras en los procesos inflamatorios y son capaces de causar daño a los tejidos a través de la liberación de proteínas altamente tóxicas, así como de mediadores lipídicos (leucotrienos C4) y metabolitos oxigenados, siendo documentado también la presencia de eosinófilos en varios desórdenes inflamatorios como el asma (Hom y Estridge, 1994) así como en las infecciones contra helmintos (Butterworth, 1977; Kazura, 1980; Finkelman, 1991; Venturiello, 1995; Else, 1998).

En este trabajo, los eosinófilos mostraron cambios en su densidad en el tejido con relación a la edad de los animales y al sitio en la mucosa intestinal. En ensayos preliminares, se mostró que en la zona epitelial no había presencia de eosinófilos con la tinción de cromótopo 2R, en cambio en la LP de las vellosidades y las criptas, esta población de células estaba bien representada, por lo que las cuentas aquí reportadas solo incluyen la LP. En la LP de las criptas (LPC) el número de eosinófilos se incrementó hacia la semana 8 post destete ($p < 0.01$), comparado con la semana 2, cambios que se aprecian en menor grado en la LP de las vellosidades (Fig.5). Como se había mencionado anteriormente, la maduración de algunas de las poblaciones celulares de la mucosa intestinal es debida a los estímulos generados por la micro flora intestinal y de moléculas inocuas como los alimentos, provocando así tolerancia inmunológica (Cummins y Thompson, 1997). Los eosinófilos, responden a cualquier desafío intestinal, por lo que su densidad puede cambiar constantemente y aunado a que en este tiempo el desarrollo celular esta en plena actividad (2 semanas PD) tratando de alcanzar una madurez que le permita montar respuestas efectivas. En la región de las criptas se denotó mas el cambio sugiriendo así que es probable que el sitio de llegada de estas células a las vellosidades intestinales, sea a través de los vasos sanguíneos ubicados en esta zona (Δ HEV?). A partir de ese sitio, los $E\phi$ parecen alcanzar la LP de las vellosidades, tal vez atraídos por los mensajes derivados de otras células del lugar que incluyen Lc T, células dendríticas, células MHC-II+ (Vega-López *et al.*, 1993) y células cebadas (Fig.10 A y B).

II. EFECTO DE LA INFECCIÓN

La infección intestinal con *T. spiralis* podría provocar cambios en la celularidad del intestino. Else y Finkelman (1998) demuestran que durante la infección con diferentes nemátodos intestinales como *N. brasiliensis*, *T. spiralis*, *H. polygyrus* y *T. muris* en ratones, algunas poblaciones celulares, como las CD4+ (Th1 y Th2) y células calciformes cambian previo a su expulsión. La respuesta de tipo Th2 observada durante este tipo de infecciones se ve acompañada de una elevación en el número de eosinófilos (incremento en IL-5), secreción de interleucinas a través de las células T CD4+ y mastocitosis.

A. ENTEROCITOS

El número de enterocitos por vellosidad no mostró cambios estadísticamente significativos entre ambos grupos experimentales, por esta razón se decidió integrar los datos de los animales control e infectados en un solo grupo de 10 animales por día de infección con objeto de reducir la variabilidad individual por día. Los valores se mostraron en el apartado I. Maduración, A. Enterocitos, de esta sección.

En ratones y ratas, durante una infección primaria con *T. spiralis*, el sistema inmune intestinal reacciona fuertemente logrando la expulsión del parásito (Ahmad, Wang y Bell, 1991). Ramaswamy (1996), menciona que la expulsión del parásito en ratas ocurre hacia el día 11-12 post infección, evento asociado con incrementos en los niveles de IL-4 y 5 en el intestino delgado, mediado directamente por células efectoras CD4, caso similar al de ratones (Goyal, 1994), donde se ha demostrado que diferentes aislados obtenidos de *T. spiralis* exhiben variaciones en la cinética de infección, observándose una activación de células con perfil Th1 y Th2. En contraste, Ivanoska, *et al.* (1990), mencionan que la respuesta humoral que reconoce al estado larvario de *T. spiralis* en los cerdos de 2 y 4 meses de edad se desarrolla alrededor de los 41 días después de la infección y no se observan cambios importantes en las células del linaje monocito/granulocito en circulación. Sin embargo, las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica presentaron un incremento dramático después de los 60 días de infección, encontrándose inclusive muchas células que expresan ambos marcadores simultáneamente.

B. LIE

Al día 2 post infección se detectó un aumento significativo en las células CD2+ ($p < 0.01$) (Cuadro 3). Esas células fueron probablemente DN (NK?), ya que esos cambios no fueron detectados en las subpoblaciones de células CD4+ y CD8+ (Fig.9 A). Ese aumento podría tratarse de una reacción temprana de LIE NK debido a la presencia del estadio preadulto del nemátodo, o a la liberación de sus antígenos, reacción que desaparece posteriormente debido posiblemente a algún mecanismo de evasión de *T. spiralis* para mantenerse en el epitelio intestinal sin ser reconocido. Despommier, 1998, menciona que las larvas de *T. spiralis* secretan proteínas que no son reconocidas por el sistema inmune y que impiden que las poblaciones celulares reaccionen contra el

parásito permitiéndole pasar inadvertido. La inmunosupresión es un rasgo de las infecciones parasitarias y se ha observado que afectan tanto la respuesta de anticuerpos como la celular, inclusive la larva recién nacida de *T. spiralis* secreta toxinas así como antígenos de secreción-excreción que afectan la funcionalidad de los linfocitos intestinales porcinos (Gerencer, *et al.* 1996).

Se ha referido que la defensa contra la infestación parasitaria en ratones y ratas está mediada por células T, pues en animales con bajas cantidades de Lc T se establece el parásito rápidamente mientras que en animales normales dicho establecimiento es mas lento (Mayrhofer *et al.*, 1984). En ratones se ha observado que los LIE actúan tempranamente contra *T. spiralis*, eliminando células epiteliales dañadas por el parásito y de esta forma ayudando a su expulsión (Kazura, 1981). En el caso del cerdo, no existen estudios similares, pero se ha documentado la larga permanencia del parásito adulto en el intestino del cerdo (Murrel, 1985; Ivanoska y Cuperovic, 1990), lo que sugiere que los mecanismos efectores en roedores son distintos a los prevalentes en los cerdos.

En el epitelio intestinal porcino normalmente no se encuentran células CD4+ (< 5% de los Lc presentes, según Romero-Ramírez, 2000) (Fig.9 B), sin embargo, durante la infección de *T. spiralis* en cerdo, se observó un incremento significativo en esta población al día 5 post infección (Cuadro 3). Probablemente se trate de células cuya residencia sea la lámina propia pero, bajo el estímulo de los antígenos liberados por el nemátodo pudieran migrar hacia el epitelio. En relación a esto, existen evidencias de que linfocitos de la LP pueden migrar hacia la capa epitelial y *viceversa* (Poussier, 1994) a través de microporos ubicados en la membrana basal (Low, 1984). De tal forma que se ha postulado que la migración de un gran número de células de la lámina propia ocurre *in vivo* siguiendo la pérdida de células epiteliales a causa de algún daño (Mahida, 1997). Dicha migración quizá puede representar un tipo de defensa intestinal del hospedero, sin embargo, ese no parece ser el caso en el cerdo pues el número de células involucrado siempre fue muy bajo. También podría tratarse de células doble positivas (CD4+CD8+), relacionadas con el fenotipo de memoria (Zuckermann, Binns y Husmann, 1994) que aparecen en el epitelio, aunque su desaparición posterior no se explicaría fácilmente. Finalmente, Reimman y Rudolphi (1995) indican la existencia de células CD4+ con expresión de la cadena α de CD8+ durante alguna fase de su maduración en ratones. Si este es el caso, se trataría de células inmaduras que cambiarían de sitio en la mucosa al finalizar su maduración.

Los cambios significativos en los LIE CD8+ los días 15 y 25 PI ($p < 0.05$) sugieren una reacción tardía contra *T. spiralis* o algunos de sus componentes, aunque esos aumentos no se observaron en las células CD2+, indicando que probablemente que las células CD8+ están substituyendo a las células dobles negativas (día 25) que antes ocupaban el epitelio (Fig.9 C). En trabajos realizados por Rothkotter, *et al.* (1991) se ha observado que estas células tienen la capacidad de migrar sobre la capa epitelial, en respuesta a la presencia de antígenos o por recambio celular.

Otra posibilidad es que el aumento de células CD8+ en el epitelio intestinal porcino podría deberse al acceso de células de otro linaje que expresen el marcador CD8+, como sería el caso de las células cebadas de peritoneo de ratón y los macrófagos de rata que expresan el homodímero CD8 $\alpha\alpha$ (Jun-Lin, 1998), situación que podría clarificarse realizando tinciones dobles por inmunohistoquímica.

Los cambios detectados al día 5 PI (CD4+) y 15 y 25 PI (CD8+) podrían relacionarse con la liberación de larvas recién nacidas (LRN) del nemátodo como lo menciona Murrell (1985), donde demuestra que alrededor del día 10 PI los adultos de *T. spiralis* disminuyen su número en el intestino porcino pero comienzan a liberar larvas recién nacidas, lo que produciría una gama de señales antigénicas a nivel local y sistémico que estarían provocando alteraciones en la densidad de los LIE al reaccionar contra los nuevos antígenos. En el ratón también se ha observado que los LIE actúan tempranamente contra *T. spiralis*, eliminando células epiteliales dañadas por el parásito y de esta forma ayudando a su expulsión (Bozic, *et al.*, 1996).

Los cambios tardíos en la población de LIE CD8+ podrían relacionarse con la respuesta inmune que finalmente comienza a montarse en contra del parásito, como la producción de anticuerpos tanto locales como sistémicos a la tercera semana PI (Piña Escobedo, comunicación personal), ya sea porque el parásito disminuye sus mecanismos de evasión o porque el sistema inmune finalmente puede superarlos. Se requieren más estudios sobre este punto para clarificar el significado real de esos cambios celulares en el epitelio intestinal.

Cabe recalcar que existen diferencias importantes entre la infección en cerdos con lo que ocurre en roedores. En ratas y ratones el fenómeno de mastocitosis y eosinofilia intestinales son determinantes para la expulsión de *T. spiralis*. Este fenómeno no se ha estudiado en el cerdo, donde la expulsión es más bien tardía (Murrell, 1985; Ivanoska y

Cuperlovic, 1990). Estudios inmunohistoquímicos en la LP duodenal porcina, no han detectado cambios en las células CD2, CD4 y CD8 durante la infección (García-Reyna, 1997). Sin embargo, por citometría de flujo se han evidenciado aumentos en la proporción de células CD4+ y CD8+ en la LP intestinal a los días 15 y 25 PI, aunque en epitelio solo se detectaron reducciones en células MHC-II+ (Romero-Rodríguez, 2000), indicando que las técnicas inmunohistoquímicas carecen de la sensibilidad necesaria para detectar cambios sutiles en las poblaciones intestinales o que las células que acceden a la mucosa tienen una expresión reducida de marcadores por lo que escapan al nivel de detección inmunohistoquímico. Además, tampoco ha sido posible detectar respuesta proliferativa de células intestinales al cultivarse ante antígenos del parásito *in vitro* (García-Reyna, 1997), lo que puede explicar la incapacidad del cerdo para la eliminación temprana del parásito precisando de la intervención de otras células del sistema inmune y de la producción de anticuerpos (Yépez y Ortega, 1994).

Con respecto al fenotipo de los LIE, los porcentajes de células CD2+ prácticamente coinciden con los de las células CD8+ (50-60%, Fig. 6 a y b) a lo largo del estudio, lo que sugiere que la gran mayoría de LIE son células T citotóxicas (CD2+CD8+), aunque se sabe que ese fenotipo también lo tienen algunas células NK y TCR2. Esto confirma hallazgos anteriores que señalan al compartimiento epitelial como casi exclusivo de células T CD8+ en cerdos (Rothkotter, Ulbrich y Pabst, 1991; Vega-López *et al.*, 1993; Romero-Ramírez, 2000) y en ratones (Mowat y Viney, 1997; Baegley, 1998). El restante 40% de células podrían ser células Null o de baja expresión de marcadores, por lo que no pueden ser detectados por inmunohistoquímica.

A diferencia de la cuantificación de células de la LP, que se hace con base a la superficie del tejido, obteniéndose un parámetro de densidad (células/mm²), en el epitelio no tiene sentido medir la superficie puesto que los cortes histológicos solo proveen de una medida unidimensional del epitelio (longitud). Por ello, la cuantificación de células en el epitelio se hace con respecto a su longitud, por cuenta total de células en la vellosidad o relacionando linfocitos con enterocitos. En el primer y tercer caso, las mediciones son independientes de la longitud de la vellosidad por lo que son medidas más confiables que la cuantificación del total de linfocitos en el epitelio de la vellosidad. En este trabajo se obtuvo la relación de subpoblaciones de linfocitos y enterocitos totales tanto para CD2 y CD8, obteniéndose un promedio de 1 LIE por cada 4-5 células epiteliales en los animales control y de 1 LIE por cada 3 células epiteliales en el grupo infectado, con cambios en la

proporción de CD2+ al día 2 y de CD8+ al día 25 post infección (Fig. 7 a y b). Esto corrobora los hallazgos individuales de cada subpoblación indicando que los LIE, por su localización, son las primeras células que responden contra los antígenos liberados por el parásito. Trabajos anteriores en humano y en ratones han demostrado que en condiciones normales hay aproximadamente 1 LIE por cada 6-10 células epiteliales (Chott, 1997, Beagley, 1998). Este tipo de estudios no se han realizado en cerdos sino hasta recientemente (Vega-López, *et al.*, 2001), pudiendo ser un parámetro importante de evaluación de la reactividad del sistema inmune intestinal.

C. EOSINÓFILOS

Ante la infección con *T. spiralis*, los eosinófilos de la LPC aumentaron significativamente ($p < 0.01$) a partir del día 2 PI, cambios que también ocurrieron en la LPV a partir del día 5 post infección (Fig. 8). Estos aumentos sugieren que el arribo de eosinófilos al intestino ocurre principalmente a través de las criptas, posiblemente provenientes de la sangre y a través del endotelio alto de las vénulas de las criptas y en respuesta a señales inflamatorias provenientes del epitelio de las vellosidades (Fig. 10 C y D). Esas señales podrían provenir de los LIE, los Lc CD4 y las células MHC-II de la LP, pero principalmente de las células cebadas de la mucosa (Finkelman, 1991; Befus, 1996; Bailey, 1998; Jun Lin y Befus, 1999). El papel de las CC en el reclutamiento de eosinófilos en diferentes tejidos ha sido documentado plenamente mediante la utilización de ratones KO de células cebadas W/W^v (Kung, 1995), donde la infiltración de eosinófilos hacia diferentes tejidos fue dramáticamente reducida en comparación con ratones controles. Los linfocitos T también intervienen a través de la liberación de factores quimiotácticos para la migración y supervivencia de los eosinófilos (Corrigan y Kay, 1996; Lin y Befus, 1999) e inclusive las células endoteliales presentan una fuente importante de eotaxina estimulando a estas células a su adhesión a un sustrato (Tonnel, 1996).

Estos resultados muestran que los eosinófilos de animales jóvenes se sitúan principalmente en la LPC, mientras no exista un estímulo antigénico que induzca su migración a las vellosidades, donde podrían realizar funciones de regulación del proceso inflamatorio y de la respuesta inmune a través de la liberación de citocinas preformadas que favorezcan el reclutamiento de linfocitos en la zona, es decir que los eosinófilos podrían tener un papel de reguladores mas que efectores de la respuesta inmune, debido a la liberación de IL-16 que contribuye a la activación de las células T (Fig. 2). Cabe

mencionar que en reportes de Herdon y Kayes, 1992; Hokibara, 1997 y Else, 1998 se establece que los eosinófilos no juegan un papel relevante en la respuesta inmune dirigida contra algunos parásitos helmintos entre los que se encuentra *T. spiralis*. Aunque su papel efector *in vivo* es incierto, podrían tener una función más de tipo regulatorio que efector.

En este trabajo se realizó un experimento preliminar para determinar la presencia de antígeno total de *T. spiralis* en el intestino porcino, después de la infección experimental. Empleando anticuerpos policlonales de conejo contra el antígeno total de la fase adulta (3 días después de la administración oral) del parásito, se evaluó la presencia de antígeno libre secretado por el parásito en la mucosa intestinal, a través de tinciones inmunohistoquímicas y se pudo demostrar que se distribuye por toda la mucosa y no solo donde el parásito se encuentra. Se observó que el antígeno, primero se encuentra en la superficie de las vellosidades (día 5 PI), llegando a las criptas posteriormente (día 15 en adelante). El efecto de este fenómeno se desconoce, pero podría tener consecuencias importantes tanto en la supresión o modulación de la respuesta inmune así como en la activación temprana de células efectoras en la vellosidad (CC, CD8+, CD4+, MHC-II+), que indujera el reclutamiento de eosinófilos y la regulación del fenómeno inflamatorio y tardíamente en la activación de células de la LP.

Tenemos entonces un efecto paradójico, por una parte, aunque la infección no parece provocar cambios importantes en las poblaciones celulares de linfocitos ni en la LP (García Reyna, 1997; Romero-Ramírez, 2000), ni en el epitelio intestinal (Romero-Ramírez, 2000 y este trabajo), ni es posible encontrar reacciones linfocitarias *in vitro* a la infección (García-Reyna, 1997); por la otra se establecen dramáticos aumentos de células inflamatorias como los eosinófilos desde el inicio de la infección sin aparente efecto contra el parásito y la respuesta humoral se monta tardíamente (día 25 PI) en suero y mucosa intestinal (Piña-Escobedo, en preparación), demostrando la inducción de una respuesta inmune específica del tipo Th2. La explicación a estos fenómenos requiere de estudios más profundos, sin embargo se puede especular en el sentido de que *T. spiralis* es un parásito que infecta rápidamente el epitelio intestinal (en unas cuantas horas) y secreta de inmediato grandes cantidades de antígenos complejos. De alguna manera, el sistema inmune reacciona tempranamente ante el insulto, sin embargo, la reacción celular que se monta aparentemente no causa daño al parásito ni promueve su expulsión, sino que es

rápidamente modulada por el parásito para la generación de una tolerancia transitoria que le permite pasar inadvertido.

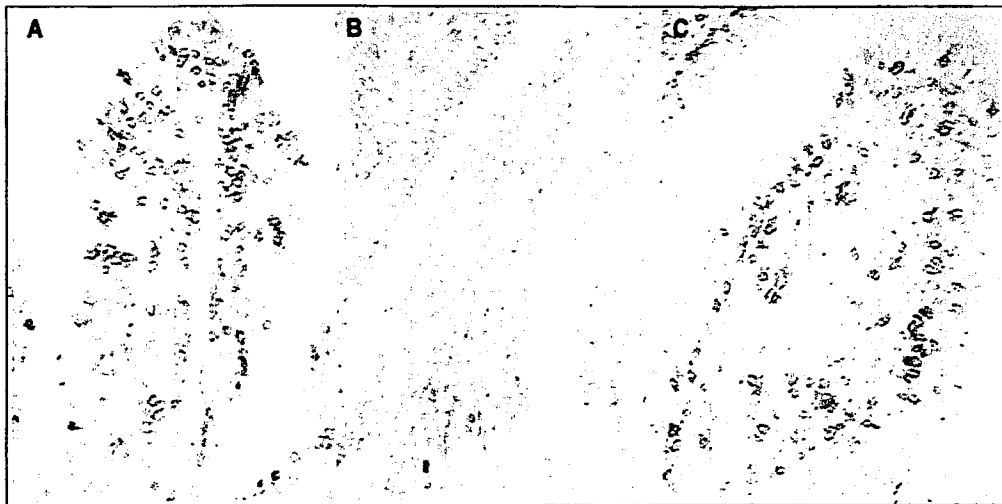


Fig 9 : Distribución de linfocitos intraepiteliales (LIE) en el duodeno porcino. (A) LIE CD2+, (B) LIE CD4+ y (C) LIE CD8+ al día 5 post infección, teñidos mediante la técnica de inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales específicos en cortes histológicos congelados. Fotos obtenidas a 40X por analizador de imágenes.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

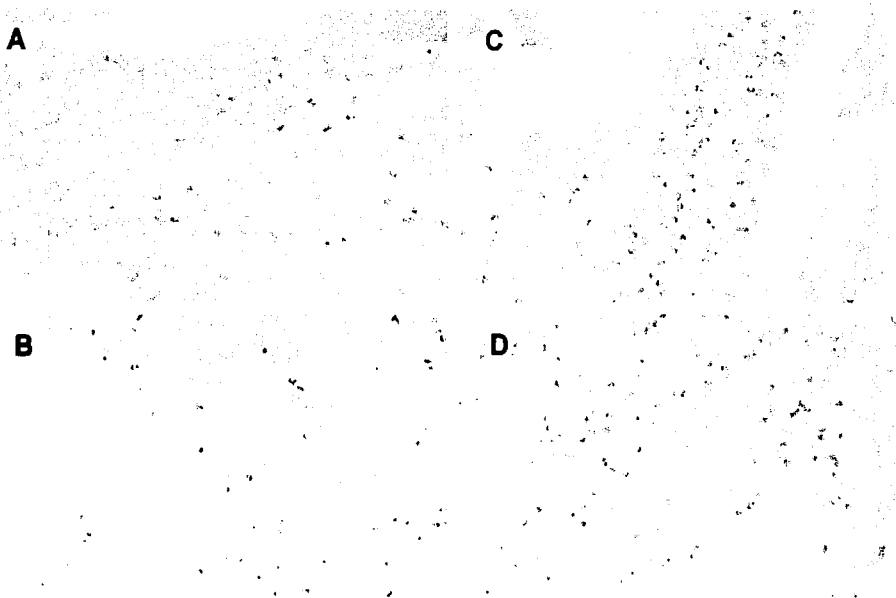


Fig.10: Eosinófilos en duodeno de cerdos sano (A y B) e infectado (C y D) en LP de vellosidades (A y C) y criptas (B y D) al día 25 PI (infectado). Las imágenes son representativas de grupos de 5 animales. La infección se realizó con 700 LM de *T. spiralis* por kg de peso. Las células fueron teñidas con cromótopo 2R en cortes histológicos embebidos en parafina. Fotos obtenidas a 40X por analizador de imágenes.

Conclusiones :

1. MADURACIÓN DE CÉLULAS

Enterocitos

El número de enterocitos por vellosidad en el duodeno de animales destetados se incrementó de manera significativa de la semana 2 a la 8 PD, señalando el crecimiento y maduración de ese sitio anatómico.

Linfocitos intraepiteliales

Las células CD2+ y CD2+CD8+ mostraron aumentos significativos con la edad, aunque esos cambios fueron menos acusados que los encontrados en la lactancia, señalando que el tejido se está acercando a su maduración final.

Cerca del 60% de los LIE del duodeno fueron CD2+, la mayoría de ellos resultaron CD8+.

El restante 40% no expresaron marcadores de linfocitos T lo que sugiere que la población de células null-NK es muy abundante en animales jóvenes.

Eosinófilos

La densidad de eosinófilos en la LP intestinal mostró aumentos significativos con la edad, teniendo a las criptas como sitio preferencial de localización.

2. EFECTO DE LA INFECCIÓN

Linfocitos intraepiteliales

Se detectó un aumento temprano en la proporción de células CD2+, seguida por un incremento de las células CD8+ hacia los días 15 y 25, lo que podría relacionarse con respuestas de células NK a la infección del epitelio y a la reacción inmune tardía contra el parásito.

Se observó, en esos mismos días un cambio en la relación linfocitos/enterocitos de 1:4 en animales normales a 1:3 en infectados, lo que indica que hubo un reclutamiento de células inmunes en el epitelio intestinal de los animales infectados.

Eosinófilos

Los cambios significativos ocurrieron desde el día 2 PI en LPC, y posteriormente también se detectaron en la LPV, señalando que existe una reacción proinflamatoria contra el parásito, tal vez iniciada a nivel epitelial por los LIE y las células de la LP de las vellosidades. Los eosinófilos arriban al intestino por las criptas y después, ante el probable estímulo de las células de las vellosidades, migran hacia ese sitio para quizá, realizar funciones de regulación.

Se sugiere ampliar este tipo de estudios a células como las CC y los linfocitos B, además de determinar con certeza el fenotipo de los LIE involucrados a través de tinciones dobles y triples por inmunohistoquímica y FACS en diferentes regiones del intestino, con la finalidad de comprender mejor la estructura, maduración y funcionamiento del sistema inmune intestinal porcino, sobre todo ante infecciones parasitarias de importancia veterinaria y humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abreu-Martín, M.T. y Tergan, S.T. (1996). Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Critical Reviews in Immunology*. 16:277-309
- Ackert, J.E., Edgar, S.A. y Frick, L.P. (1939). Goblet cells and age resistance of animals to parasitism. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 58:81-89
- Ahmad, K., Wang, C.H. y Bell, R.G. (1991). A role for IgE in intestinal immunity. Expression of rapid expulsion of *T. spiralis* in rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. *J. Immunol.* 146: 3563-3570
- Alcántara, P.P.A., De la Rosa, A.J.L. y Correa, B.M.D. (1992). Triquinelosis: Una parasitosis fuera de serie. Ed. Inst. Nac. de Diag. y Ref. Epidem. (INDRE), México. 16:1-56.
- Bailey, M., Miller, B., Temo, F., Stokes, C. y Bourne, F. (1993). Specific immunological unresponsiveness following active primary responses to proteins in the weaning diet of pigs. *Int. Arch. Allergic. Immunol.* 101:266-271
- Bailey, M., Haverson, K. y Stokes, C. (1997). Models for the function of T cell in the intestinal lamina propria. *Periodicum Biologorum*. 99:3, 307-311.
- Bailey, M., Plunkett, F., Clarke, A., Sturgess, D., Haverson, K. y Stokes, C. (1998). Activation of T cells from the intestinal lamina propria of the pig. *Scand. J. Immunol.* 48:177-182.
- Baruch, A.M. y Despommier, D.D. (1991). Blood vessels in *Trichinella spiralis* infections: a study using vascular casts. *J. Parasitol.* 77:99-103.
- Beagley, K.W., y Husband, A.J. (1998). Intraepithelial Lymphocytes: Origins, Distribution, and Function. *Critical Reviews in Immunology*. 18:237-254.
- Befus, D. (1996). Mast cells heterogeneity and function in mucosal defenses and pathogenesis, *Essential of mucosal Immunology*. ED. Kagnoff y Kiyono. Academic Press. Inc. USA. pp 341-354.
- Biagi, F. (1986). *Enfermedades Parasitarias*. Mc Graw Hill, México. pp 450-462.
- Bianchi, A.T.J., Zwart, R.J., Jeurissen S.H.M. y Moonen-Leusen H.W.M. (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. y van der Heljden, P.J. (1994). Antigen presenting cell and B-cell in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43:63-68.
- Bozic, F., Forcic, D., Mazuran, R. y Marinculic, A. (1996). Gamma-delta TCR+ intestinal intraepithelial lymphocytes in reaction against the intestinal nematode *T. spiralis*. Abstract book 9th International Conference on Trichinellosis. México, D.F. W4.11.

- Brandtzaeg, P. (1995). Mucosal Immunology. A long way to the surface. *The Immunologist*, 3(3):75-77
- Butterworth, A.E. (1977). The Eosinophil and its role in immunity to helminth infection. *Current topics in microbiology and immunology*, 77:127-168. Springer-verlag, Berlin.Heidelberg.New York.
- Capron, M., Spielberg, H. y Prin, L. (1984). Role of IgE receptor in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132:462-468.
- Challacombe, S.J. y Tomasi, B. (1980). Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunisation. *J. Exp. Med.* 152: 1459-1472.
- Chott, A., Gerdes, G., Spooner, A., Mosberger, I y Balk, S.P. (1997). Intraepithelial lymphocytes in normal human intestine do not express proteins associated with cytolytic function. *Am. J. of Pathol.* 151: 2 pp 435-442
- Chu, R.M., Wang, S.H. y Du, Y.H. (1988). Granular mucosal lymphocytes in porcine small intestine. *Am. J. Vet. Res.* 49(9): 1456-1459.
- Coffman, R.L., Jackson, J., y Rennick, D. (1989). Antibody to IL-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*, 245:308-311.
- Corrigan, C.J. y Kay, A.B. (1996). T cell / eosinophil interactions in the induction of asthma. *Eur. Resp. J.* 9:72-78.
- Coyle, A.J., Köhler, G. y Tsuyuki, S. (1998). Eosinophils are not required to induce airway hyperresponsiveness after nematode infection. *Eur. J. Immunol.* 28:2640-2647.
- Cummins, A. y Thompson, M. (1997). Postnatal changes in mucosal immune responses: A physiological perspectives of breast feeding and weaning. *Immunol. and Cell. Biol.* 75: 419-429.
- Despommier, D.D. (1978). *Trichinella spiralis*: Site selection by the larva during the enteral phase of infection in mice. *Exp. Parasit.* 44:209-215.
- Despommier, D.D. (1990). *Trichinella spiralis*: The worm that would to be virus. *Parasitol. Today*, 6(6): 193-196.
- Despommier, D.D. (1993). *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *J. Parasitology*, 79(4):472-482.
- Despommier, D.D. (1998). How Does *Trichinella spiralis* Make Itself at Home?. *Parasitology Today*, 14(8):318-323
- Else, K. y Finkelman, F. (1998). Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanism. *Int. J. Parasitol.* 28:1145-1158.

Ernst, P.B., Befus, A.D., y Bienenstock, J. (1985). Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunologic compartment. *Immunol. Today*. **6**: 211-214.

Friend, D.S., Ghildyal, N. y Frank, A.K. (1996). Mast cell that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *T. spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *The Journal of Cell Biology*. **135**(1): 279-290.

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

García-Reyna, P.B. (1997). Efecto de la infección experimental con *Trichinella spiralis* sobre las poblaciones celulares del sistema inmune intestinal porcino. Tesis de Maestría en Ciencias (Microbiología). UNAM, México.

Gendelman, H.E., Moench, T.R., Nayaran, O. y Griffin, D.E. (1983). Selection of a fixative for identifying T cell subsets, B cell and macrophages in paraffin-embedded mouse spleen. *J. Immunol. Methods*. **65**:137-145.

Gerencer, M., Marinculic, A., Rapic, D., Frankovic, M., Valpotic, I. (1992). Immunosuppression of *in vivo* and *in vitro* lymphocyte responses in swine induced by *T. spiralis* or excretory-secretory antigens of the parasite. *Vet. Parasitol.* **44**:263-273.

González-Vega, D., Cisneros, M.I., Vega-López, M.A., Morilla, G.A. (1993). Perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras diez semanas de edad. *Vet. Méx.* **24**(3):217-221.

Gounni, A.S., Lamkhoued, B. y Ochiai, K. (1994). High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. *Nature*. **367**:183-186.

Goyal, P.K., Hermanek, J. y Wakelin, D. (1994). Lymphocyte proliferation and Cytokine production in mice infected with different geographical isolates of *T. spiralis*. *Parasite Immunology*. **16**:105-110.

Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Briottet, C. y Vassalli, P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T-cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **173**:471-481.

Haque, A., Ovalssi, A., Joseph, M. y Capron, A. (1981). IgE antibody in eosinophil and macrophages mediated *in vitro* killing of *Dipetalonema vitae* microfilarie. *J. Immunology* **127**:716-725.

Hammerberg, C. y Schurig, G. (1986). Characterisation of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **11**:107-121.

Herdon, F.J. y Kayes, S. (1992). Depletion of eosinophil by anti IL-5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *T. spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. *J. Immunol.* **149**(11):3642-3647.

Hokibara, S., Takamoto, M., Tominaga, A. y Jugare, K. (1997). Marked eosinophilia in IL-5 transgenic mice fails to prevent *T. spiralis* infection. J. Parasit. 83(6):1186-1189.

Hom, J.T. y Estridge, T. (1994). Antigen- Induced recruitment of eosinophils: Importance of CD4+ T cell, IL-5, and Mast Cell. Clin. Immunol. Immunopathol. 73(3):305-311.

Huntley, J.F., Gooden, C. y Newlands, F.J. (1990). Distribution of intestinal mast cell proteinase in blood and tissue of normal and *Trichinella spiralis* infected mice. Parasite Immunol. 12: 85-95.

Husby, S., Mestecky, J., Holland, S. y Elson, C.O. (1994). Oral tolerance in humans. T cells but not B cells tolerance after antigen feeding. J. Immunol. 152:4663-4670.

Ishiwata, K., Uchiyama, F. y Murayama, H. (1999). Glycoconjugates and Host-parasite. Relationship in the mucosal defense against intestinal nematodes. Mucosal Immunology. ED. Kagnoff y Kiyono. Cap. 58. Academic Press. N.Y. pp. 546-560.

Ivanoska, D. y Cuperlovic, K. (1990). Peripheral mononuclear cells subset during *Trichinella spiralis* infection in pigs. Res. Vet. Sci. 49:92-97.

Jarry, A., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N., Selz, F. y Guy-Grand, D. (1990). Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3-lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. Eur. J. Immunol. 20:1097-1103.

Kasura, J. y Aikawa, M. (1980). Host defense mechanisms against *Trichinella spiralis* infection in the mouse: Eosinophil-mediated destruction of newborn larvae *in vitro*. J. Immunol. 124:1. pp: 355-361.

Kasura, J. (1981). Host defense mechanism against nematode parasites. Destruction of newborn *T. spiralis* larvae by human antibodies and granulocytes. J. Infect. Dis. 143: 712-718.

Knapp, N.H. y G.A. Oakley (1981). Cell adherence to larvae of *Dictyocaulus viviparus* *in vitro*. Res. Vet. Sci. 31:389-391

Kung, T., Zurcher. J.A., Jones, H., Umland, S., Kreutner, W., Egan, R. y Chapman, R. (1995). Mast cells modulated allergic pulmonary eosinophilia in mice. Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 12:404-409.

Lee, T.D.G. (1991). Helminthotoxic responses of intestinal eosinophils to *T. spiralis* newborn larvae. Infection and immunity. Dec. 59: (12). 4405-4411.

Lefrancois, L. (1991). Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. J. Immunol. 147:1746-51.

Lefrancois, L., Fuller, B., Olson, J. y Puddington (1996). Development of intestinal intraepithelial lymphocytes. Essentials of mucosal immunology. ED. Kagnoff y Kiyono.

Academic press. Inc. USA. pp 183-193

Lendrum, A.C. (1944). The staining of eosinophil polymorphs and enterochromaffin cells in histological sections. *J. Pathol. Bacteriol.* 56(3):441.

Librado, O. (1987). *Inmunología*. ED. Interamericana, México. pp :7-15

Lin, T.J., Hirji, N., Nahara, O., Stenton, G. y Befus, D. (1998). Mast cells express novel CD8 molecules that selectively modulate mediator secretion. *J. Immunol.* 161: 6265-6272

Lin, T. y Befus, D. (1999). Mast cells and eosinophils in mucosal defenses and pathogenesis. *Mucosal Immunology*. ED. Kagnoff y Kiyono. Academic Press. Pp 469-482

Low, F.N. y Mc Clugage, S.G. (1984). Microdissection by ultrasonication: Scanning electron microscopy of the epithelial basal lamina of the alimentary canal in the rat. *Am. J. Anat.* 169:137-147.

Lunney y Pescovitz. (1987). Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17:135-144.

Mahida, Y., Galvin, A., Gray, T., Makh, S. y Sewell, H. (1997). Migration of human intestinal lamina propria lymphocyte, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 109: 377-386.

Mayrhofer, G. (1984). Physiology of the intestinal immune system. In "Local immune responses of the gut" T.J. Newby and C.R. Stokes (Eds) C.R.C. Press Inc. Florida, USA. Pp 1-96.

Marti, H.P. y Murrel, K.D. (1986). *Trichinella spiralis*: Antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Exp. Parasit.* 62:370-375.

Martínez, M. R. (1985). Está aumentando la triquinosis en México?. Podría ser eso una consecuencia inesperada de nuestro desarrollo?. *Sal. Pub. Méx.* 27:40-48.

Mc Ghee, J.R. y Kiyono, H. (1993). New perspectives in vaccine development: Mucosal immunity to infections. *Infect. Agents Dis.* 2(2): 55-73.

Mc Lane I.W. y Nakane, P.K. (1974). Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22(12):1077-1083

Miller, H.R.P., Huntley, J.F. y Newlands, F.J. (1988). Granule proteinases define mast cell heterogeneity in the serosa and gastrointestinal mucosa of the mouse. *Immunology* 65:559-566.

Moqbel, R. (1996). Eosinophil-derived cytokines in allergic inflammation and asthma. *Ann. New York Acad. Sci.* 796:209-217.

Mosley, R.L., y 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.M. y Viney, J.L.(1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol. Rev.* **156**:145-166

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

Pescovitz, M.D., Lunney, J.K., y Sachs, D.H. (1985). Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: Distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cell. *J. Immunol.* **134**:37-44.

Poussier, P. y Julius, M. (1994). Thymus independent T cells development and selection in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:521-553.

Ramaswamy, K., Negro, C.D. y Bell, R. (1996). Local intestinal immune responses to infections with *T. spiralis*. Real-time, continuous assay of cytokines in the intestinal (afferent) and efferent thoracic duct lymph of rats. *J. Immunol.* **156**: 4328-4337.

Reimann, J. y Rudolphi, A. (1995). Co-expression of CD8 alpha in CD4+ T cell receptor alpha-beta+ T cells migrating into the murine small intestine epithelial layer. *Eur. J. Immunol.* **25**:1580-1588.

Romero-Ramirez, H. (2000). "Análisis por citometría de flujo, de las poblaciones celulares del sistema inmune porcino, ante la infección experimental con *Trichinella spiralis*". Tesis licenciatura. FES-Cuautitlán. UNAM, México.

Roitt, I.M., Brostoff, J. y Male, D.K. (1989). *Immunology*, 2a Ed. Churchill Livingstone, Gower medical Publishing, London, Reino Unido. 72-76.

Rothkotter, H.J., Ulbrich, H. y Pabst, R. (1991). The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: Number, proliferation, and T and B cells subsets in conventional and germfree pigs. *Ped. Res.* **29**(3): 237-242.

Rothkotter, H.J., Mollhof, S. y Pabst, R. (1999). The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scand. J. Immunol.* **50**:31-38

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

Scudamore, Ch. L., Newlands, G.F. y Miller, R.P. (1995). Mast cell hyperplasia and activation in the context of helminth infection a role for stem cell factor?. Biological and molecular aspects of mast cell and basophils differentiation and function. ed. by Y. Kitamura, S., Yamamoto, S.J., Galli, and M.W. Greaves. Raven Press. Ltd. N.Y. pp 876-893

Stewart, G.L., y Giannini, S.H. (1982). *Sarcocystis, Trypanosoma, Toxoplasma, Ancylostoma and Trichinella spiralis ssp.* review of the intracellular parasites of striated muscle. *Exp. Parasitol.* **53**:406-410.

- Stokes, C.R. (1988). Immune system in the porcine gut. *Pig vet. Soc. Proc.* 20:19-30.
- Stokes, C.R., Bailey, M. y Wilson, A.D. (1994). Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 143-150.
- Stokes, C.R., Haverson, K. y Bailey, M. (1996). Antigen presenting cells in the porcine gut. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54: 171-177
- Takimoto, H., Nakamura, T., Sumi, Y., Tanaka, T. y Yoshikawa, Y. (1992). Age-associated increase in number of CD4+CD8+ intestinal intraepithelial lymphocytes in rats. *Eur. J. Immunol.* 22:159-164.
- Tlaskalova-Hogenova, H., Mandel, L., Trebichavsky, F., Kovaru, F., Barot, R. y Sterzy, J. (1994). Development of immune responses in early pig ontogeny. *Vet. Immunol. Immunopathol. Special Issue.* 43: 135-142
- Tonnell, A. B., Gosset, P.H., Molet, S., Tille-Lebland, I., Jeannin, P. y Joshep, M. (1996). Interactions between endothelial cells and effector cells in allergic inflammations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 796:9-19.
- Touhy, M., Lammas, D.A., Wakelin, D. y Huntley, J.F. (1990). Functional correlations between mucosal mast cell activity and immunity to *T. spiralis* in high and low responder mice. *Parasite Immunology* 12:675-685
- Troung, M.J., Gruart, V. y Capron, A. (1993). IgE-binding molecules (Mac-2/ BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 23:3230-3235.
- Tsai, M. y Newlands, F.J. (1991). The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cell in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J. Exp. Med.* 174: 125-131.
- Tumbleson, M.E. (1986). *Swine in Biomedical Research*. Plenum Press. N.Y. and London. pp 1-10.
- Vega-López, M.A. (1991). Immune development in the young pig. Tesis de doctorado (Ph D). University of Bristol. Reino Unido.
- Vega-López, M.A., Telemo, E., Bailey, M., Stevens, K. y Stokes, C.R. (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunohistological evidence for an organised compartmentalization in the lamina propria. *Vet. Immunol. immunopathol.* 37(1):49-60.
- Vega-López, M.A. (1994). Sistema inmune intestinal porcino. *Ciencia Veterinaria*, ED. Ricardo Moreno. UNAM, México, D.F. 6:145-172.
- Vega-López, M.A. y Stokes, C.R. (1994). Desarrollo del sistema inmune intestinal porcino. *Tec. Pecu. Méx.* Vol 32 (1):30-38.

- Vega-López, M.A., Bailey, M., Telemo, E., y Stokes, C.R. (1995). Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **44**:319-327.
- Vega-López, M.A., Arenas Contreras, G., Bailey, M., González-Pozos, S., Stokes, C., Ortega, G. y Mondragón, F.R. (2001). Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Dev. Immunol.* **8** (2):En prensa.
- Venturiello, S.M., Giambartolomei, G.H. y Costantino, S.N. (1993). Immune killing of newborn *Trichinella spiralis* larvae by human leucocytes. *Parasite. Immunol.* **15**:559-564.
- Venturiello, S.M., Giambartolomei, G.H. y Costantino, S.N. (1995). Immune cytotoxic activity of human eosinophils against *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Parasit. Immunol.* **17**:555-559.
- Viney, J., Mac Donald, T. y Spencer, J. (1990). Gamma/delta T cells in the gut epithelium. *Gut.* **31**: 841-844.
- Yépez M.L. y Ortega, P.G. (1994). Actualidades sobre la respuesta inmune hacia *T. spiralis*. *Ciencia y Desarrollo.* **117**:Julio-Agosto. 44-51.
- Wakelin, D. (1993). *Trichinella spiralis*: Immunity ecology and evolution. *J. Parasitology.* **79**: 488-494.
- Walker, R.I. y Owen, R.L. (1990). Intestinal barriers to bacteria and others toxins. *Ann. Rev. Med.* **41**:393-400.
- Weller, P.F., Lim, K., Wan, H.C., Dvorack, A.M. Wong, D.T.W., Cruikshank, W.W., Komfeld, H. y Center, D.M. (1996). Role of the eosinophil in allergic reaction. *Eur. Resp. J.* **9**:109-115.
- Whary, M.T., Zarkower, A., Confer, F.L. y Ferguson, F.G. (1995). Age-related differences in subset composition and activation responses of the intestinal intraepithelial and mesenteric lymph node lymphocytes from neonatal swine. *Cellular Immunol.* **163**:215-221.
- Wilson, A. D., Stokes, C.R. y Bourne, F.J. (1986). Morphology and functional characteristics of isolated porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology* **59**: 109-113.
- Wright, K.A., Weidman, E., y Hong, H. (1987). The distribution of cells killed by *Trichinella spiralis* in the mucosal epithelium of two strains of mice. *J. Parasitology.* **73**(5): 935-939.
- Xu, L.R. Corr, M.M., Bland, A.P. y Hall, G.A. (1993). Histochemistry and morphology of porcine mast cells. *Histochemical J.* **25**: 516-522.
- Zuckermann, F.A., Binns, R.M., Husmann, R. (1994). Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD44 and CD45. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**:293-305.

ANEXO
SOLUCIONES PARA INMUNOHISTOQUIMICA

Paraformaldehído lisina peryodato (PLP) (Mc Lane y Nakane, 1974)

Soluciones madre

1) Tampón de lisina-fosfato

a. Monohidrocloreuro de lisina 0.2 M.

Monohidrocloreuro de lisina	3.62 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml

b. Na_2HPO_4 0.1 M.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.78 g (1.42 g sal anhidra)
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Mezclar una parte de a y una parte de b y ajustar el pH = 7.4 con HCl.

2) Paraformaldehído al 8%

Paraformaldehído	8 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Disolver a 60-65° C en agitación y añadirle unas gotas de NaOH 10 N para aclarar. Dejar enfriar la solución y añadirle 5.4 g de glucosa.

Procedimiento

Justo antes de usar, mezclar 3 partes de 1 y una parte de 2 y añadirle meta-peryodato de sodio sólido hasta alcanzar una concentración final de 0.01 M.

Ejemplo:

Tampón lisina	75 ml
paraformaldehído al 8%	25 ml
peryodato	0.213 g

Fijar el tejido de 4 -18 horas a 4° C.

Deshidratar en alcohol (70, 90, 100%), clarificar en xileno (x 2) y montar en parafina.

Poli-L-lisina 0.1% (Sigma Chemical Co.)

Poli-L-lisina al 0.1% en H₂O destilada

Sol. de bloqueo de peroxidasa endógena

Metanol absoluto	100 ml
Peróxido de hidrógeno al 30%	2.5 ml

Tris-HCl (0.05M pH 7.6)

Tris base	1.39 g
Tris HCl	6.06 g
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml
ajustar la solución a pH 7.6	

Solución salina (NaCl 0.15M)

NaCl	8.5 g
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml

TBS (Sol. salina amortiguada de Tris)

Tris-HCl (0.05M pH 7.6)	100 ml
Solución salina	900 ml

PBS (Sol. amortiguada de fosfatos)

Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	2.9 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml
Ajustar la solución a pH 7.2 - 7.4	

Sol. de diaminobencidina (Preparar al momento de usarse)

3,3'- Diaminobenzidina [3,3',4,4'- Tetra-aminobiphenyl] (Sigma Chemical Co.)	3 mg
Tris-HCl (0.05M pH 7.6)	5 ml
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	5 µl
Filtrar en membrana de 0.45µm	

PRECAUCIÓN: Solución cancerígena, usar guantes y cubrebocas

SOLUCIONES PARA TINCIONES ESPECIFICAS

Colorante Cromótopo 2 R

Cristales de fenol	1 gr.
Cromótopo 2R (Aldrich Chemical Co. Ltd, Art. 20,208-8)	0.5 gr
H ₂ O destilada	100 ml

* En un frasco se coloca 0.5 gr de cromótopo 2R y se mezcla con los cristales de fenol, se sumergen en un baño maría a la temperatura señalada para que se disuelvan los cristales de fenol. Ya disueltos se saca el frasco del baño y se le añade el agua destilada al volumen requerido, se cubre bien y se deja enfriar, se puede utilizar al momento.

El fenol se utiliza para que la solución permanezca mas tiempo sin contaminaciones de cualquier tipo. Filtrar antes de usar

Alcohol ácido

HCl concentrado	10 ml
Alcohol 70%	100 ml