

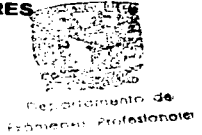
10524
7 A



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**



**DESARROLLO DE CELULAS INTRAEPITELIALES EN EL
INTESTINO DELGADO PORCINO**

P U B L I C A C I O N

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

GONZALO (ARENAS CONTRERAS

ASESOR: DR. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ



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.

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**

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

B

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

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

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

La Publicación: Desarrollo de Células Intraepiteliales en el
Intestino Delgado Porcino.

que presenta el pasante: Gonzalo Arenas Contreras
con número de cuenta: 7201038-3 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Enero de 2003

PRESIDENTE Dr. Marco Antonio Vega López

VOCAL M.en.F.C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

SECRETARIO Dra. Susana E. Mendoza Elvira

PRIMER SUPLENTE M. I. Z. Angel G. Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE M. en .C. Beatriz de Jesús Maya Monroy

C

**A mi padre Ramón A, sin sus enseñanzas
no hubiera concluido ésta etapa de mi vida.
Te tengo en mi memoria.**

**A mi Madre y Hermanos, por su Amor y Apoyo,
continúo caminando con paso firme.**

D

A mi esposa Patricia.

A mis hijos, Ameyali y Omar.

**Por su Amor, Confianza y Fé, estimularon
la energía que me permitió escalar un pedáneo más.**

**A Marcos, Elsa y Beatriz, por compartir
su Amistad y Carño.**

11

El leer un Libro, es como ponerse los lentes.

!deja uno de ver borroso!

Donzato Arenas.

FE

ÍNDICE

1.0 Justificación.....	01
2.0 Objetivos.....	02
3.0 Material y métodos.....	03
3.1 Animales y muestras.....	03
3.2 Técnica histológica para microscopía óptica.....	03
3.3 Procesamiento para microscopía electrónica (ME).....	03
3.4 Conteo de linfocitos y células epiteliales en las velosidades.....	05
4.0 Resultados obtenidos por estudio estadístico por la prueba de T de Students pareada.....	07
5.0 Morfología de los LIE por microscopía óptica.....	09
6.0 Morfología de los linfocitos intraepiteliales por microscopía electrónica.....	10
7.0 Discusión y conclusiones.....	12
Abreviaturas.....	14
Bibliografía.....	16
Artículo en Español.....	19
Artículo Original.....	

1.0 JUSTIFICACIÓN

Las vellosidades intestinales contienen los llamados linfocitos intraepiteliales (LIE). La localización, enumeración, caracterización y función de esas células inmunes no han sido descritas en su totalidad, aunque se sabe que son la primera línea de defensa contra virus, bacterias, parásitos, células tumorales y en la tolerancia inmunológica por vía oral. También existe evidencia del aumento de los LIE en diferentes enfermedades. Algunos autores han descrito unas células que no se unen con anticuerpos monoclonales convencionales, llamándolas "células nulas", las cuales se localizan principalmente en la zona apical del epitelio. Se tiene conocimiento de que se presentan en todo el epitelio de la vellosidad, en diferentes especies, pero no se ha estudiado en detalle su localización, caracterización y fenotipo específico en cada una de las zonas y áreas de la vellosidad. Ni se ha cuantificado su número, por lo tanto es importante tener un conocimiento específico de esos parámetros en modelos animales como el cerdo, cuyas similitudes con el humano son mayores que las de los roedores. Con esa información se podría entender mejor el origen de los LIE, su naturaleza, sus cambios en número en el tejido y su función probable.

2.0 OBJETIVO: Describir la localización, número, fenotipo, desarrollo de linfocitos intraepiteliales y características morfológicas de los linfocitos intraepiteliales en el intestino delgado porcino.

3.0 MATERIAL Y METODOS

3.1 ANIMALES y MUESTRAS. Se tomaron muestras de duodeno e ileon (10 cm adelante del píloro y antes de la unión ileo-cecal respectivamente) de cinco cerdos sanos de 6 meses de edad. Estas porciones de intestino se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M (PBS) pH 7.4 para eliminar el contenido intestinal y, de estas muestras se realizaron cortes de 3 a 5 cm de longitud, los cuales fueron colocados en frascos conteniendo paraformaldehído línea peryodato (PLP) (ver apéndice) para su fijación y procesamiento para microscopía óptica o en frascos conteniendo PBS (ver apéndice) al 0.1M para microscopía electrónica, los cuales fueron colocados en hielo para su transporte.

3.2 TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Las muestras en PLP se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente, hasta llegar a alcohol absoluto y se sumergieron en xilol hasta que todo el alcohol fue desplazado. Luego se colocaron en parafina fundida caliente (57°C) hasta que todo el xilol fue sustituido por la parafina, las muestras se montaron en bloques y se hicieron cortes de 3 μ m de espesor con un microtomo. Los cortes se tiñeron con hematoxilina de Harris y se montaron en un medio soluble en xilol (ENTELLAN) 18.

3.3 PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

Las porciones de intestino para ME se lavaron con PBS, se abrieron y se extendieron (con la ayuda de unos alfileres), formando tapetes sobre unas placas de cera dental en cajas de petri. Se fijaron las porciones de intestino con glutaraldehído

al 2.5% diluido en PBS durante una hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS por tres minutos cada uno hasta eliminar el glutaraldehído. Posteriormente se efectuó una postfijación con tetróxido de osmio al 1% (fijador, estabilizador de lípidos insaturados) en PBS por una hora (30 minutos en hielo y 30 minutos a temperatura ambiente), se continuó con tres lavados con PBS por tres minutos cada uno hasta eliminar el tetróxido de osmio. Se lavaron 6 veces con agua destilada hasta eliminar el PBS. Se procedió a deshidratar con alcohol etílico de concentraciones crecientes 60, 70, 80, 90% por diez minutos cada uno y al 100% tres veces por diez minutos cada uno. Se procedió a infiltrar; primero con resina spurr 1:1 (resina spurr/etanol, epóxica) (spurr baja viscosidad Embedding kit, Polysciences, Inc) y se dejaron por un período de tres horas a temperatura ambiente, seguido de resina 3:1 (spurr/etanol) durante tres horas, finalmente se hicieron tres cambios de resina spurr pura de dos horas cada uno. Ya infiltradas las muestras se polimerizaron en moldes especiales de sílicón flexible a 60°C por 36 horas. Posteriormente los bloques fueron cortados en ultramicrotomo (Ultracut Reicher-Jung) obteniéndose por un lado secciones semifinas de aproximadamente 0.5 μm , y finas de 0.100 μm de espesor para microscopía óptica y electrónica respectivamente. Los cortes semifinos se montaron en portaobjetos de vidrio fijándolos por calor y tñéndolos con azul de toluidina al 0.1%, los cortes tñidos se observaron en un microscopio óptico Zeiss con sistema de fotomicrografía integrado con el fin de observar la ubicación y orientación de las vellosidades. Los cortes finos se montaron en rejillas de cobre de 3mm de diámetro (1 y 200 hoyos) y se tñieron con acetato de uranio y citrato de plomo de la siguiente manera: Las rejillas con los cortes se sumergieron en unas gotas de acetato de uranio al 1.5-2.0% (como

fijador de ácidos nucleicos) en una cámara húmeda (para evitar la desecación) y se dejaron 5 horas en una campana de extracción. Después de ser teñidas, se tomaron las rejillas con pinzas, se secó el exceso de acetato de uranio con un papel filtro y se lavó en cuatro frascos con agua destilada, girando la rejilla con las pinzas con sumo cuidado, finalmente se secaron y se guardaron. Por último para la tinción con citrato de plomo, se colocaron unas gotas de citrato de plomo (0.4%) en un papel parafilm rodeado de perlas de hidróxido de sodio para que absorban el CO_2 del ambiente y de esta manera evitar la formación de carbonato de plomo, las rejillas con los cortes teñidos con acetato de uranio, se sumergieron en las gotas de citrato de plomo por 2 a 5 minutos, seguidas por cuatro enjuagues de 1 minuto cada uno, en cuatro vasos alternados con hidróxido de sodio 0.02N y agua destilada, se secaron y por último se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 2000 EX y se tomaron fotografías de los linfocitos de la zona apical, nuclear y membrana basal de la punta, zona media y base de las vellosidades del duodeno e ileon.

3.4 CONTEO DE LINFOCITOS Y CELULAS EPITELIALES EN LAS VELLOSIDADES

Diferentes técnicas para el conteo celular se han desarrollado a través de los años, como la técnica morfométrica descrita por Niazí, la que ofrece un conteo absoluto y relativo (densidad) de células. También nos permite construir modelos matemáticos, cubos de volumen equivalente, gráficas de volumen-densidad y volumen proporcional 15. Por otro lado se pueden utilizar métodos alternativos que incluyan la medición del número de linfocitos por vellosidad, o por milímetro de epitelio, ó el número de linfocitos por unidad de longitud de mucosa. La técnica

utilizada para este trabajo se describe a continuación. Se tomaron fotografías con microscopio óptico de los cortes histológicos de vellosidades de duodeno e ileon de cerdo, teñidos con hematoxilina. Se utilizó objetivo seco fuerte, oculares de 10, una apertura de 1.6 y una distancia de la cámara a la muestra de 0.25, con una amplificación total de $40 \times 1.6 \times 10 \times 0.25$ y se utilizó película Kodak tri x pan 35mm x 30.5m. tr 402 para fotografías en blanco y negro sea 400. El papel utilizado para la impresión fue Kodabrome II RC.

Los criterios que debían cumplir las vellosidades intestinales fueron los siguientes: Que las vellosidades fueran grandes, anchas y, aproximadamente del mismo tamaño, que presentaran vasos quilíferos, los cuales permiten tener la certeza de que las vellosidades están cortadas longitudinalmente por la parte media, que no presentaran fisuras a lo largo de ellas, doblesces, desprendimiento de epitelio de la lámina propia, ni que el epitelio estuviera comprimido; en sí, que tuvieran todas las características de una vellosidad intestinal representativa (criptas de Lieberkuhn, lámina propia y epitelio).

El conteo se realizó de la siguiente manera: se tomó la distancia de la base de la vellosidad a la punta de la misma y se dividió en tres partes iguales, la parte superior ó punta (p), la parte central ó media (m) y la parte inferior o base (b). Para la cuenta de linfocitos se tomó el criterio siguiente: Se delineó la membrana basal (por medio de un marcador) entre el epitelio y la lámina propia y se realizó el conteo total de linfocitos en las tres partes de la vellosidad, adicionalmente, los linfocitos del epitelio se contaron de acuerdo a su localización en el mismo como sigue: Linfocitos apicales (La), comprendidos entre las microvellosidades y el núcleo del enterocito, linfocitos nucleares (Ln), aquellos encontrados alrededor del núcleo del enterocito y linfocitos de la membrana basal (Lmb), localizados entre el núcleo y la membrana

basal del enterocito. Esos linfocitos se encontraron en las zonas de la punta (p), parte media (m) y base (b) de la vellosidad. Con las cuentas totales y porcentajes de linfocitos y células epiteliales, se llevaron a cabo relaciones en las diferentes zonas de la vellosidad, para conocer su distribución. Al tomar en consideración el tamaño de los linfocitos, su relación núcleo/citoplasma, aspecto y distribución de la cromatina y su citoplasma, la presencia de organelos celulares, tamaño y número de las granulaciones, con las fotografías tomadas con el microscopio óptico y electrónico y con la metodología empleada anteriormente, se caracterizaron morfológicamente los linfocitos intraepiteliales en las vellosidades intestinales de duodeno e ileon.

Los resultados de linfocitos totales y células epiteliales, fueron derivadas del conteo de un total de 52 (duodeno) y 34 (ileon) vellosidades de todos los animales.

El criterio para determinar si las células observadas eran linfocitos, se basó en lo reportado en la bibliografía, en diferentes especies. 02,03,04,05,06,07,10,11,12, 13 14,19.

Para el estudio estadístico se utilizó la prueba de t de Student pareada (Wayne, 1979).

4.0 RESULTADOS OBTENIDOS POR ESTUDIO ESTADISTICO POR LA PRUEBA DE T DE STUDENTS PAREADA SE DESCRIBE A CONTINUACION

DISTRIBUCION DE LINFOCITOS EN LAS VELLOSIDADES INTESTINALES DE DUODENO E ILEON

Los resultados obtenidos del recuento de LIE en duodeno e ileon muestran lo siguiente: El número de LT (LIE+LLP) en duodeno fue de 230 (+/-60), con un 49%

(112 +/- 30) de LIE y un 51% (118 +/- 30) de LLP, mientras que en feon, un total de 189 (+/- 40) LT, con un 52% (99 +/- 24) de LIE y 48% (90 +/- 27) de LLP.

En el análisis de distribución de LIE, en las diferentes partes de la velosidad (punta = p, zona media = m y base = b) y dentro del epitelio (apical = ap, nuclear = n y membrana basal = mb) se encontró lo siguiente: En la zona apical tanto en duodeno como en feon, se encontraron, solo un 5% (5 +/- 2) de LIE por velosidad. En la zona nuclear 43% (48 +/- 13) en duodeno y 42% (42 +/- 11) en feon, y por último, en la zona de la mb se obtuvieron 52% (59 +/- 17) en duodeno y 53% (52 +/- 15) en feon.

La distribución de LIE en las diferentes partes de la velosidad fue la siguiente: En la punta, 32% (35 +/- 12) en duodeno y 34%(33 +/- 11) en feon. En la parte media 37% (42 +/- 13) en duodeno y 38% (39 +/- 11) en feon. Mientras en la base se obtuvieron 31% (36 +/- 15) en duodeno y 27% (27 +/- 9) en feon.

Los LIE distribuidos en las diferentes zonas del epitelio y partes de la velosidad nos proporcionó los siguientes datos: En la punta de la velosidad y en la zona apical 6% (2 +/- 1) de LIE tanto en duodeno como feon, en la zona nuclear 43% (15 +/- 5) en duodeno y 39% (13 +/- 5) en feon y en la zona de la MB 51% (18 +/- 7) en duodeno y 55% (18 +/- 6) en feon.

En la parte media de la velosidad: En la zona apical 5% (2 +/- 1) de LIE tanto en duodeno como en feon. En la zona nuclear, la misma proporción de LIE en duodeno como en feon de 43% (18 +/- 6) y, en la zona de la mb 52% (22 +/- 7) de LIE en duodeno como en feon. En la base de la velosidad tenemos en la zona apical 3% (1 +/- 1) de LIE en duodeno y 4% (1 +/- 1) en feon. En la zona nuclear 44% (15 +/- 8) de LIE en duodeno e feon. Y por último en la zona de la mb 53% (19 +/- 8) de LIE en duodeno y 52% (14 +/- 5) en feon.

El porcentaje de LIE en relación con el número de enterocitos fue el siguiente: LIE 112/ 258 (43.4%) enterocitos en duodeno mientras que 89/243 (40.74%) en ileon.

Con respecto a los linfocitos totales de LP en la punta de la vellosidad fueron: 24% (28 +/-13) en duodeno y de 27% (24 +/- 8) en ileon. En la zm de las vellosidades 38% (45 +/- 15) en duodeno y 39% (35 +/- 10) en ileon, y finalmente en la LP de las vellosidades 38% (45 +/- 18) en duodeno y 34% (31 +/- 13) en ileon.

En relación a los porcentajes de linfocitos totales (LIE + LLP) en las puntas de las vellosidades fueron: 28% (83 +/- 23) en duodeno y 30% (56 +/- 15) en ileon. En la zona media 38% (87 +/- 24) en duodeno y 40% (75 +/- 16) en ileon y en la base de las vellosidades 34%(80 +/-28) en duodeno y 30%(58 +/- 18) de los linfocitos en ileon.

5.0 MORFOLOGIA DE LOS LIE POR MICROSCOPIA OPTICA

La observación de los linfocitos intraepiteliales en duodeno e ileon se realizó por medio de microscopía óptica y por medio de fotografías (con una amplificación de 160 aumentos), que revelaron lo siguiente: Los LIE de la zona apical, nuclear y membrana basal del epitelio de duodeno e ileon, mostraron características de linfocitos pequeños, medianos o grandes, su relación núcleo/citoplasma (en los LIE apicales y de la membrana basal) fue de 2 a 1 y en algunos casos hasta de 3 a 1, mientras que los LIE de la zona nuclear presentaron una relación de 1 a 1 y de 2 a 1, logándose a encontrar linfocitos en las tres zonas, cuyo núcleo ocupó casi la totalidad de la célula dejando al citoplasma tan escaso, que solía ser poco más que una estrecha orilla en torno del núcleo. El núcleo se presentó redondo u, oval con alguna escotadura en un lado, o indentado y se observó su cromatina condensada y coloración azul característica de la tinción con hematoxilina. En algunas zonas del

epitelio se observaron linfocitos intercelulares alineados uno seguido de otro, teniendo contacto sus membranas citoplasmáticas (en algunos casos encontrándose hasta tres linfocitos juntos), y entre éstos se denotó la presencia de vacuolas, como si de esta manera los LIE facilitaran su desplazamiento en el epitelio.

6.0 MORFOLOGIA DE LOS LINFOCITOS INTRAEPITELIALES POR MICROSCOPIA ELECTRONICA.

El estudio morfológico de los linfocitos intraepiteliales se completó con la observación directa de especímenes en el microscopio electrónico y por medio de sus fotografías. Estas células fueron observadas en las zonas apical, nuclear y de la membrana basal (ap, n, mb) del epitelio y en la punta, parte media y base (p,m,b) de las vellosidades de duodeno e ileon, revelando lo siguiente: La mayoría de las células observadas fueron mononucleares, los LIE de la zona ap, n, y mb (en la p,m,b de la vellosidad), mostraron diversidad en su tamaño, pudiéndose encontrar linfocitos pequeños (aproximadamente de 3-5 μ m), medianos (aproximadamente de 5-7 μ m) y grandes, aproximadamente hasta 7 - 8 μ m, aunque en la zona nuclear, se encontraron linfocitos de 8 a 12 μ m. Las características citoplasmáticas de estos linfocitos incluyeron escaso o nulo retículo endoplásmico rugoso, una cantidad pequeña de mitocondrias de 1 a 6 por célula (en una célula de la zona n se observaron de 10 a 15), algunos, sin ninguna mitocondria. Los cuerpos multivesiculares fueron relativamente comunes. Se hallaron hasta 6 granulaciones densas de diferentes tamaños (0.18-1.33 μ) en algunos linfocitos. 07, 11,16. En algunas células de ileon el número y tamaño de sus gránulos (en proporción) era mayor que de los LIE de duodeno (con mayor presencia en LIE de la zona n), en la zona n y mb se detectaron 58% de células con granulaciones, también se

detectaron células sin granulaciones. El núcleo era compacto, denso, frecuentemente indentado y un poco irregular en perfil. 17. El núcleo mostró regiones de cromatina condensada y extendida. Gran parte de la cromatina condensada estuvo distribuida a lo largo de la superficie interna de la membrana nuclear, pero también dispersa en el núcleo, constituyendo islotes. Se encontraron variaciones en el ancho de los LIE, algunos presentaron un perfil casi circular (41% de LIE en la zona n), otros fueron elongados y muchos presentaron cierta pseudopodia sugiriendo movimiento entre las células epiteliales, debido probablemente a la cinética de los miosomas (mostrándose por lo general en dirección hacia la luz intestinal, ver artículo), mientras que otros solo fueron de perfil ameboso irregular (41% encontrados en la zona n) 09, 10. La relación núcleo/citoplasma fue variada, pudiéndose encontrar una relación de 1 a 1, en su mayoría de 2 a 1 y en algunas células de hasta 3 a 1. No se observaron linfocitos con tendencia a degeneración en el epitelio.

En conclusión podemos decir que en la zona apical, nuclear y membrana basal, con respecto a su tamaño, se pudieron encontrar LIE que iban aproximadamente de 3 a 12 μ m, se encontró que aproximadamente 41% de células eran circulares y el resto presentaron prolongaciones irregulares en su citoplasma, algunas con cierta pseudopodia y otras con morfología amebosa (con tendencia de desplazamiento hacia el lumen intestinal), se detectaron células con presencia de 1 hasta 8 granulaciones de 0.18 a 1.33 μ , encontrándose hasta 58% de células granulares y 42% sin gránulos.

Esas células granulares fueron más numerosas y de mayor tamaño en la zona nuclear y en las vellosidades de ileon. Se observó que las células tenían cromatina condensada y difusa, sin degradación del DNA, no se observaron cuerpos

apoptóticos, y en el citoplasma se detectó la presencia de retículo endoplásmico y mitocondrias, indicando células activas.

7.0 DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio indican la presencia de un LIE por cada 2-3 enterocitos en cerdo, mientras que en el ratón, se observan un linfocito por cada 4 enterocitos y en humano un linfocito por cada 6 enterocitos. 05, 06. Esto nos indica que en el epitelio del cerdo es necesario contar con un número mayor de células para mantener una protección adecuada, sugiriendo la ampliación de estudios sobre las características principales de los epitelios y su relación con los linfocitos en cada especie a demás de su fenotipo y su distribución por población en cada zona del epitelio.

En la vellosidad de animales adultos, cerca de la mitad del número total de linfocitos fueron IEL (49% DU, 52% IL). Sobre la mitad de estos IEL (52% DU y 53% de IL) mostraron el fenotipo CD2+ CD4- CD8+ y fueron localizados en la membrana basal del epitelio. Numerosos IEL DN (43% DU, 42% IL) se encuentran en grupos en el nivel del núcleo de los enterocitos y relativamente bajo número de IEL granulares (5% en DU e IL) se encuentran en la zona apical del epitelio. Esta proporción se mantiene homogéneamente a lo largo de la vellosidad, en la punta, parte media y fondo, sugiriendo que los IEL pueden tener su origen en la LP. Este desarrollo secuencial y localización celular en el intestino, puede estar relacionado a la función, a las características particulares de cada célula, a mecanismos específicos de distribución como células de adhesión y a la comunicación formada

entre los linfocitos y el epitelio, sugiriendo estudios al respecto para dilucidar su papel en la respuesta inmune intestinal. 20, 21. Finalmente, esta claro que el compartimiento epitelial del intestino, contiene una población numerosa y heterogénea de células inmunes. Esta heterogeneidad puede explicar algo de las diferentes respuestas que el sistema inmune intestinal es capaz de producir, induciendo ya sea tolerancia/anergia r componentes inocuos de la dieta o desencadenar respuestas inmunes vigorosas a material dañino . Esta heterogeneidad esta tomada en consideración cuando protocolos aislados y estudios funcionales in vitro son ejecutados. Estos estudios cuantitativos establecen un modelo experimental, en una manera mas precisa, el efecto del estimulo antigénico (dieta, flora normal, infección, inmunización oral, etc.) sobre la población de células en el comportamiento epitelial y puede permitir el estudio de la relación entre localización celular, fenotipo y función de los linfocitos intraepiteliales.

ABREVIATURAS

ap	Apical.
b	Base de la velocidad.
CD	Determinante de grupo.
DN	Doble negativo.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
EP	Número de células epiteliales.
K	Célula asesina.
La	Linfocito apical.
LIE	Linfocitos intraepiteliales.
Ln	Linfocito nuclear.
Lmb	Linfocito de membrana basal.
LLP	Linfocito de lámina propia.
LP	Lámina propia.
LT	Linfocitos totales.
M	Molar.
m	Medio de la velocidad.
NK	Célula asesina natural.
n	Zona nuclear del epitelio.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
pH	Potencial hidrógeno.
PLP	Paraformaldehído línea peryodato.

p ————— Punta de la velocidad.

TCR. ————— Receptor de célula T.

Determinantes de grupo (CD).

CD2 ————— Célula T, Timocito, célula NK.

CD3 ————— Timocito, célula T madura.

CD4 ————— Célula-T cooperadora/inductora, monocitos, macrófagos.

CD8 ————— Célula -T citotóxica/supresora

BIBLIOGRAFIA:

- 01) Ferguson, A. 1978. Lymphocytes and cell mediated immunity in the small intestine. *Adv. Med.* 14:278-293.
- 02) Parrot, D.M.V. 1987. The structure and organization of lymphoid tissue in the gut. En "Food allergy and intolerance". J. Brostoff y S.J. Chellecombe (Eds.), Bailliere Tindall, W.B. Saunders, Londres, Reino Unido. pp 3-8.
- 03) Rothkottler-HJ; Kirchoff-T; Pabat-R. 1984 Nov. Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs. *Gut.* 35(11):1582-9.
- 04) Pabat-R. 1987. The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat-Embryol-Berl.* 176(2): 135-44.
- 05) Brandtzaeg, P., Halstensen, T. S., Kett, K., Krajci, P., Kvale, D., Rognum, T. O., Scott, H., and Solld, L. M. 1989. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97, 1562-1584.
- 06) Beste C. Sydora, Beth D. Jamieson, Rafi Ahmed, and Mitchell Kronenberg. 1988. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Respond to Systemic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *Cellular Immunology* 167, 161-169.
- 07) Marsh, M.N. 1980. Studies of intestinal lymphoid tissue. III Quantitative analyses of epithelial lymphocytes in the small intestine of human control subjects and of patients with celiac sprue. *Gastroenterology* 79, 481-492.
- 08) Ferguson Anne. 1977. *Gut*, 18, Progress report, 921.
- 09) Matsueda K; Yamada G; Tsuji T. 1991 Jun. Immunohistochemical characterization of the lymphocyte and the immunoglobulin-containing cell in the

epithelium and the lamina propria of normal human intestines. *Acta Med Okayama*. 45(3): 161-9.

10) Lundqvist-C; Baranov-V; Hammarstrom-S; Athlin-L; Hammarstrom-ML. 1995 Sep. Intra-epithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extratymic T cell maturation in the epithelium. *Int-Immunol*. 7(9): 1473-87.

11) Wilson. A.D., Stokes.C.R., Bourne. F.J. 1986. Responses of Intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses. *Immunology*. 58, 621-626.

12) Vega-Lopez, M.A., Telemo, E., Bailey, M., Stevens, K. and Stokes, C. R. 1992. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunohistological evidence for an organised compartmentalization in the lamina propria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* en prensa.

13) Ebert-EC; Roberts-AJ. 1996 Jan. Human intestinal intraepithelial lymphocytes bind to mucosal mesenchymal cells through VLA4 and CD11A. *Cell-Immunol*. 167(1): 108-14.

14) Fujihashi-K; Yamamoto-M; Mcghee-JR; Kiyono-H. 1993 Dec. alpha beta T cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes with CD4+, CD8- and CD4+, CD8+ phenotypes from orally immunized mice provide Th2-like function for B cell responses. *J Immunol*. 15; 151(12): 6881-81.a

15) Niazi-NM; Leigh-R; Crowe-B; Marsh-MN. 1984. Morphometric analysis of intestinal mucosa. V Methodology, epithelial volume compartment and enumeration of inter-epithelial space lymphocytes. *Virchows-Arch-A-Pathol-Anat-Histopathol*. 404(1): 4960.

16) Alberti, S. Colota, F. Spreafico, F. Della, D. Pasqualeto, E. and Luini, W. 1985. Large granular lymphocytes from mucosal blood and intestinal epithelium:

Comparison of surface antigens, natural killer activity, and morphology. *Clinical immunology and immunopathology* 36, 227-238

17) Toner, P.G. and Ferguson, A. 1971. Intraepithelial cells in the human intestinal mucosa. *J. Ultrastructure Res.* 34. 329-344.

18) Ham, A.W. 1975. *Tratado de histología VII. Edición. Edit. Interamericana.*

19) McDonald, G. A. Paul, J. Cruickshank, B. 1989. *Atlas de Hematología. Editorial Médica Panamericana, S. A.*

20) Yamamoto M. Fujihashi K. Kawabata K. McGhee J.R. and Kiyono H. 1988 A mucosal internet: Intestinal epithelial cells down-regulate intraepithelial, but not peripheral, T lymphocytes. *The Journal of Immunology.*- 2188-2196.

21) Fujihashi K. Kweon M. Kiyono H. VanCott J.L. Ginkel F.W. Yamamoto M. McGhee J.R. 1997. A T cell/B cell/ epithelial cell internet for mucosal inflammation and immunity. *Springer Semin Immunopathol.* 18., 477-494.

Developmental Immunology, 2001, Vol. 8(2), pp. 147-158
 Reprints available directly from the publisher
 Photocopying permitted by license only

2001 OPA (Overseas
 Publishers Association)
 N.V. Published by license
 under the Harwood Academic
 Publishers imprint, part of The
 Gordon and Breach Publishing
 Group, a member of the Taylor
 and Francis Group.

Desarrollo de Células Intraepiteliales en el Intestino Delgado Porcino.

M.A. VEGA-LOPEZ(a), G. ARENAS-CONTRERAS(e), M. BAYLEY(f), S. GONZÁLEZ-POZOS(b), C.R. STOKES(f), M.G. ORTEGA(c) y R. MONDRAGON-FLORES(d).

a Centro de Investigación y Estudios avanzados (CINVESTAV-IPN), Departamento de Patología Experimental, b Unidad de Microscopía Electrónica, c Departamento de Genética y Biología Molecular y d Departamento de Bioquímica, Av. IPN 2508, México 07360, D. F., MEXICO, e Laboratorio de Inmunología Humana, FES-Cuautitlán-UNAM, México y f División de Biología Molecular y Celular, Departamento de Ciencias Clínico Veterinaria, Universidad de Bristol, U.K.

El número, fenotipo, localización y desarrollo de linfocitos intraepiteliales (IEL) de duodeno (DU) e ileon (IL) fueron estudiados por inmunohistoquímica (IHC) y por microscopía de luz y electrónica en cerdos recién nacidos (0-7 semanas) y de 6 meses. Cambios desarrollados al nacer mostraron que el 38% de los linfocitos en la vellosidad fueron IEL, principalmente del fenotipo CD2+ CD4-CD8- Doble Negativo (DN). La proporción sobre el 50% a las 5 semanas después de nacidos, parecida a la de la población adulta, aunque con menos células que en cerdos adultos. Los

células CD4+ aparecieron relativamente temprano en la vida, aunque ellas fueron confinadas a la Lámina Propia (LP) y las células CD8+ se encontraron en número bajo. En la vejez de animales adultos, cerca de la mitad del número total de linfocitos fueron IEL (48% DU, 52% IL), Sobre la mitad de estos IEL (52% DU y 53% de IL) mostraron el fenotipo CD2+ CD4- CD8+ y fueron localizados en la membrana basal del epitelio. Numerosos IEL DN (43% DU, 42% IL) se encuentran en grupos en el nivel del núcleo de los enterocitos y relativamente bajo número de IEL granulares (5% en DU e IL) se encuentran en la zona apical del epitelio. Esta proporción se mantiene Homogéneamente a lo largo de la vejez, en la punta, parte media y fondo, sugiriendo que los IEL pueden tener su origen en la LP. Por lo tanto el comportamiento de los IEL en el intestino porcino se desarrollaron lentamente con la edad y está actualmente compuesto por una población heterogénica de células (Null, DN y CD8+). Estos resultados pueden explicar el incremento en la susceptibilidad de animales jóvenes a enfermedades durante el período de lactancia y debe de tomarse en cuenta estudios funcionales de los IEL fuera. Los resultados cuantitativos de este estudio estableció un modelo para estudiar los efectos de la edad, dieta, flora normal, infección e inmunización oral sobre los IEL del intestino.

Palabras clave: IEL, desarrollo inmune, linfocito, inmunología mucosal, intestino delgado, cerdo.

Abreviaturas: BM, membrana basal, Du, duodeno, IL, ileon, IHC, inmunohistoquímica, IEL, linfocito intraepitelial, DN, doble negativo, LP, lámina propia, LPL, linfocito en lámina propia, OM, microscopía óptica, PLP, paraformaldehído-laina-peryodato, TEM, microscopía electrónica de transmisión.

Introducción.

La inmunización oral a despertado gran interés y expectación, desde esta ruta puede acrecentar una alternativa para el control de enfermedades y también para prevenir y controlar enfermedades autoinmunes por tolerancia inducida a antígenos autólogos (Brandtzaeg, 1995). El sistema inmune mucosal tiene algunas similitudes pero también muchas diferencias con el sistema inmune sistémico (Stokes, 1988., Kiyono, et al, 1992). Por una parte, ambos sistemas contienen células siguiendo un modelo de desarrollo similar y funciones efectoras (McGhee y Kiyono, 1993). Las diferencias en la distribución de células y regulación inmune tiene que ser descritas (Kiyono, et al, 1992). A diferencia del tejido sistémico inmunológico, el sistema inmune mucosal en el intestino tiene que continuamente trabajar con una enorme cantidad de material extraño y debe ser capaz también de discriminar entre antígenos del alimento inofensivo y microorganismos comensales y material riesgoso, induciendo Anergia o tolerancia a lo anterior y una fuerza local y una respuesta inmune sistémica posterior (Blanenstock, et al, 1987, Moqbel y MacDonald, 1990; Stokes, et al, 1994). Sin embargo, el sistema inmune local mantiene un balance apropiado entre el organismo y las bacterias de la flora normal del intestino por mecanismos tales como exclusión inmune IgA-mediada (Stokes, et al, 1975; Walker, 1987; Husby, 1988; Brandtzaeg, 1995). Estas dos funciones del sistema inmune local están probablemente siendo llevadas fuera por diferentes mecanismos regulatorios continuos, fundados en el sistema inmune sistémico y, quizás, seguir sutilmente, pero diferencias substanciales en el tipo y función de las células en el sitio mucosal.

El intestino contiene un número grande de células inmunes en el organismo, aproximadamente 60% de todos los linfocitos (Parrot, 1987; Hamad y Klein, 1984; Takahashi y Kiyono, 1999). Muchas células T se localizan en la Lámina Propia (LPL) y dentro del epitelio (Linfocitos Intraepiteliales, IEL) (Moqbel y MacDonald, 1990). Porque de su visita al lumen intestinal y tienen acceso a los antígenos del alimento, IEL están estratégicamente localizados e inducen , regulan y ejecutan respuestas

inmunes (Pabat 1987; Cerf-Benussan y Guy-Grand, 1991; McGhee, et al; 1992. Estudios previos en el cerdo han demostrado diferencias con roedores y humanos , los componentes linfoides de la velocidad intestinal están probablemente desarrollados al nacer (Vega-López, et al; 1993 Pabat y Rothkottter, 1999). El desarrollo postnatal de este compartimiento parece que se deriva por la exposición a antígenos microbianos, esto no ocurre en cerdos libres de gérmenes (Pabat y Rothkottter, 1999) y esta acelerada por cerdos destetados y convencionales (Vega López, et al ; 1995). El cerdo por lo tanto provee un sistema apropiado para el estudio del desarrollo de los IEL en sus compartimientos en respuesta a antígenos . A pesar de estos, y de estudios extensivos en otras especies (Guy-Grand, et al , 1978; Tagliabue et al, 1981 Flexman, 1983, Brandtzaeg, et al, 1989; Ebert, 1989; Jerry, et al , 1990, Sanchez-Garcia, et al; 1999), relativamente pocos estudios de IEL desarrollados en cerdos se han llevado a cabo (Wilson et al, 1996a; 1996b, Whary, et al ; 1995; Pabat y Rothkottter, 1999). Por lo tanto en este estudio nosotros determinamos el número , fenotipo, localización y desarrollo de los IEL en el intestino del cerdo.

RESULTADOS

Cambios en el desarrollo en las células intraepiteliales en el intestino porcino.

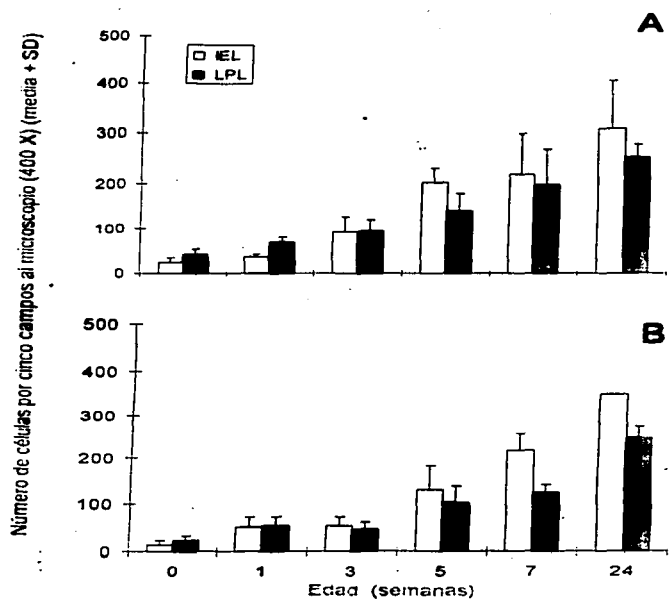
El número de IEL CD2+ en animales amamantando (del nacimiento hasta siete semanas de vida) es mostrado en la Figura 1. El número de células CD2+ fueron inicialmente bajas en epitelio y lámina propia (LP), incrementándose rápidamente después en ambos compartimientos (Figura 1). El incremento fue más evidente en DU comparado con IL en el nacimiento, en tres y cinco semanas ($P < 0.05$) (Figura 2). Al nacer el epitelio contiene 38% del total de células CD2+ en Du y 35% de IL en la vejeidad, y el porcentaje tiene un aumento uniforme después a 52% y 64% respectivamente, a siete semanas de vida (dato no mostrado). CD2, CD4, CD8 teñidos por inmunohistoquímica (IHC) en secciones congeladas seriadas de 4 animales por grupo de edad (nacimiento, 1, 3, 5, y 7 semanas) mostraron que más células intestinales en animales jóvenes fueron CD2+ doble negativo (DN) (figura 3). Las células CD4+ aparecen tempranamente en la LP en el intestino (figura 3), pero no en el epitelio y, células CD8+ aparecen más tarde en la vida y permanecen bajas en número (figura 3).

Determinación de número, fenotipo y distribución topológica de células intraepiteliales en la vejeidad del intestino delgado de cerdos adultos

El número promedio de linfocitos totales por vejeidad (IEL+LPL) en 5 animales adultos se muestran en la tabla 1. Arriba de la mitad de estas células fueron localizadas en el compartimiento epitelial en duodeno (Du) (48%) e ileon (IL) (52%) (Tabla 1), la proporción de células intraepiteliales fue homogéneamente distribuida en la punta (32% en Du, 34% en IL) aunque en la media (37% Du, 39% IL), y en la

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Desarrollo de IEL en el intestino porcino



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Determinación de células CD2+ en vellosidades de duodeno (A) e ileon (B) de animales no castrados (0-7 semanas, n=4 por grupo de edad) y cerdos adultos criados convencionalmente (24 semanas, n=5). Cada columna representa el número promedio de células CD2+ de linfocitos (IEL = barras blancas) y linfina propia (LPL = barras negras) contenidas en el epitelio de las vellosidades de 6 campos seleccionados aleatoriamente por animal (400 X).

23-B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

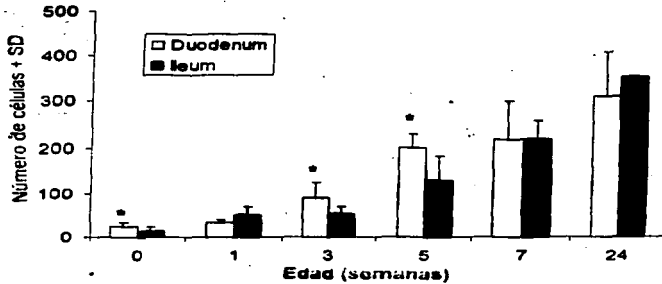


Figura 2. Desarrollo de células intraepiteliales en el intestino delgado de animales no destetados (0-7 semanas, n= 4 animales por grupo de edad) y animales adultos criados convencionalmente (24 semanas, n=6). Cada columna representa la media de IEL de duodeno (barras blancas) e ileon (barras con diagonales), contadas en el epitelio de las vellosidades de 6 campos en el microscopio (400 X) por animal. El asterisco sobre las barras representa la diferencia estadística ($P < 0.05$) entre duodeno e ileon, dada por la prueba de t-Student paradas.

Desarrollo de IEL en el intestino porcino



Figura 3. Tinción inmunofluorescente representativa de CDE (A, D, F), CD4 (B, E, H) y CD8 en secciones congeladas seriadas de duodeno de recién nacidos (A, B, C), lechones no destetados de 3 semanas (D, E, F) y cerdos adultos de 6 meses de edad (G, H, I), muestran la localización diferencial de estos células en el epitelio y la lámina propia de la villosidad. Puntos células CD4 y CD8 son evidentes en el leucocitos recién nacido (flechas). Resultados idénticos fueron encontrados en duodeno a lo largo de cuatro lechones por grupo de edad y de cinco animales adultos. Amplificación = 200X (Ver lámina VII).

base (31%Du, 27% II) del epitelio de la velocidad (Figura 4A y Tabla I). La distribución topológica de IEL dentro del epitelio (Figura 4B) mostró que la mitad está localizada preferentemente en la membrana basal (BM) (52%Du, 53%II), en la punta, en la media y base de la velocidad. Otra proporción importante de células (43%Du, 42%II) se encuentran al rededor del núcleo de los enterocitos y solo una pequeña proporción (5%Du 5%II) de células fue localizada en la zona apical del epitelio (Tabla 1). Tinciones histoquímicas de secciones congeladas seriadas de animales de 6 meses de edad (n=5), mostró que los IEL en la BM fueron células CD2+ CD4- CD8+ (Figura3) mientras que los IEL localizados en la zona apical de los enterocitos y en el nivel nuclear mostró células DN (Figura 3). Queda claro que la mayoría de las células CD4+ están confinadas en la LP de la velocidad (Figura 3).

Estudio ultra estructural de células intraepiteliales del intestino delgado en cerdos adultos .

Células morfológicamente celulares al linfocitos y con distribución intraepitelial fueron detectados por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en muestras de DU e II de 5 animales de seis meses de edad. El rango de estas células en su tamaño fue de 2.5 a 7 μ m de diámetro. En el nivel apical del epitelio (Figura A5) los IEL fueron principalmente células redondas de aproximadamente 5 μ m de diámetro y con grandes prolongaciones citoplásmicas interlazadas con la membrana plasmática de los enterocitos (Figura 5B). Gránulos densos de 0.6 μ m de diámetro y muchos ribosomas fueron detectados en el citoplasma. Al lado, células epiteliales adyacente tuvieron un número alto de vesículas pequeñas de 0.2 μ m de diámetro (Figura 6A). Muchos IEL fueron localizados en la zona nuclear epitelial, algunos de estos fueron elongados, alcanzando arriba de 7 μ m de largo (Figura 5C). El

Tabla 1. Número y localización de células intraepiteliales en el intestino delgado porcino. Los números representan la media y desviación estándar (SD) del conteo de células de 10 vellosidades en duodeno y 7 en ileon de 5 cerdos sanos de 6 meses de edad. Los datos fueron analizados por la prueba t de Student pareada. IEL = linfocitos intraepiteliales, LPL = linfocitos de lamina propia.

	Duodeno		Ileon	
	Media (SD)	%	Media (SD)	%
Linfocitos en una vellosidad				
IELs	112 (6)	49	99 (16)	52
LPL	116 (17)	51	89a (13)	48
Localización de IEL a lo largo de la vellosidad				
Punta	35 (12)	32	33 (11)	34
Media	42 (13)	37	39 (11)	39
Base	35 (15)	31	27 (9)	27
Localización de IEL dentro del epitelio				
Apical	5 (2)	5	5 (2)	5
Nuclear	48 (13)	43	42 (11)	42
Membrana Basal	59 (17)	52	52 (15)	53

a. $P = 0.033$ en duodeno.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

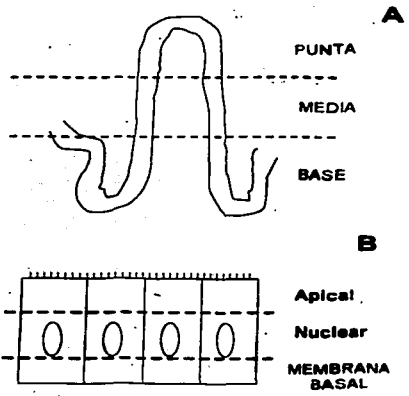


Figura 4. Diagrama de una vellosidad intestinal (A) y el cripto (B) el cual muestra los áreas de división en las cuales se determinará el número y localización de células intracriptales en animales de seis meses de edad.



Figura 5. Microfotografía de transmisión electrónica representativa de epitelio duodenal porcino (A). Células intrapiteliales son mostradas en la zona apical (B), nuclear (C), membrana basal (D). Muestras tomadas de cerdos de seis meses de edad. Resultados idénticos fueron encontrados en duodeno e ileon en cinco diferentes animales. LU = lumen intestinal, e = enterocito. Escala de la barra A = 2 μ m, B, C y D = 1 μ m.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

citoplasma fue dos veces mas grande que el núcleo y varias mitocondrias, ribosomas y retículo endoplásmico fue detectado (Figura 5C). Dos o mas células en el mismo espacio intravacuolar fueron frecuentemente vistas en esta área de tejido (Figura 3G, Figura 6A). Los IEL pequeños ($2.5 \mu\text{m}$ de diámetro, fueron detectados cerca de la BM (Figura 5A). Estas células casi fueron esféricas en forma y localizadas en una vacuola en el espacio intraepitelial (Figura 5D). El núcleo fue prominente con bajo volumen citoplásmico y organelos. Además, células dejando el epitelio fueron ocasionalmente detectadas aunque en bajo número. Estas células no mostraron características morfológicas de apoptosis (Figura 6B). Mostrando núcleo y citoplasma íntegro.

DISCUSION

En el compartimiento intraepitelial, un grupo grande heterogéneo de células tiene el potencial para tener contacto temprano con material antigénico derivado del intestino (Cerf-Bansussan y Guy-Grand, 1991). La habilidad de individuos normales a diferenciar entre componentes inofensivos de la dieta y potencialmente riesgosos y a elevar la respuesta inmune apropiada implica la presencia de confianza pero a un no se identifican los mecanismos regulatorios. Estudios previos han justificado (Ferguson, 1978, Parrot, 1987) y caracterizados en humanos e IEL de roedores en términos de morfología (Marsh, 1980), fenotipo (Brandtzaeg, et al., 1988; Jarry, et al., 1990; Lefrancois, 1991; Van Kercihove, et al., 1992; McGhee y Kiyono, 1993) y funciones efectoras (Ebert, 1989; Fujihashi, et al., 1990; Guy Grand, et al, 1991; McGhee, et al., 1992; Mega, et al, 1992; Beate, et al., 1995; Fujihashi, et al., 1997) han sido estudiados. Se ha reportado que las células con características heterogéneas se encuentran en el compartimiento epitelial (Tagli: bue et al., 1991; Flexman, 1993; Lefrancois, 1991; Christ y Blumberg, 1997).

25-A



TESTES CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Microfotografía de microscopio electrónico de transmisión representa el epitelio de duodeno porcino de animales de 6 meses de edad. Tras NELa ocusan un espacio intracanal (A, flecha). El enterocito adyacente muestra un citoplasma altamente vacuolado (A, flecha). Un NELa aparentemente intacto es expulsado del epitelio (B), estableciendo un enterocito desorganizado (B, flecha). Resultados similares se encontraron en cinco animales diferentes en duodeno e ileon. Escala de la barra = 2 μ m.

Además, algunos autores han sugerido que las células granulares en el epitelio pueden ser una población de precursores de células cebadas (Febman, 1983). Sin embargo, poca información está disponible para otras especies incluyendo los cerdos (Chu et al., 1979; Wilson, et al., 1988a, 1988b; Olivier, et al., 1994; Whary, et al., 1995), unas especies cuyas similitudes con la anatomía y fisiología humana, hacen un buen modelo experimental (Tumbleson, 1988). Además poca información está dada para estos modelos acerca de la distribución de IEL a lo largo de la vellosidad y dentro del epitelio y además, estudios cualitativos en estos compartimientos son necesarios. En este estudio el número, fenotipo localización y desarrollo de linfocitos alojados en estos diferentes compartimientos epiteliales del intestino delgado son descritos. Está bien establecido que animales jóvenes son susceptibles a infecciones, esto puede correlacionarse con el número bajo de LPL y de IEL presentes al nacer y con relativa y baja acumulación subsecuente (Vega-Lopez et al., 1993 Pabat y Rothkottler, 1999). Este estudio muestra que sobre el 50% de células totales en el intestino delgado fueron localizadas en el epitelio en animales de 6 meses de edad, apuntando la importancia de estas células localizadas sobre la entrada de material extraño. Además fue de interés estudiar el camino de estas células para alcanzar la proporción en cerdos jóvenes. Aunque el número total de células intestinales fueron bajas al nacer, una proporción significativa (38 y 35% en Du e II) está en el compartimiento epitelial. Una proporción de células fue DN, células CD4+ y CD8+ son detectables tardíamente en la vida (Figura 3, Vega-López et al., 1993; Pabat y Rothkottler, 1999). Hay un interés que considerar en este descubrimiento ya que los animales vienen de un ambiente prácticamente estéril, donde la estimulación antigénica está mas bien limitada, sugiriendo que la población de IEL puede tener un rol distinto al de protección. Después del nacimiento hay un incremento dramático de IEL CD2+, especialmente en la semana 3 y 5 en Du donde estos incrementos fueron mas altos que los encontrados en II

($P < 0.05$) (Figuras 2 y 3) estos cambios pueden sugerir que el estímulo para los IEL, al alcanzar su localización final, puede venir de la boca, (antígenos del alimento), aunque la microflora normal puede también concluir a la estimulación antigénica en la conducción de linfocitos al compartimiento epitelial, mas bien que a la LP, aun en la ausencia de contacto con alimento sólido, lo cual está demostrado en destetados (Vega-López, et al., 1995). El número absoluto de células en animales jóvenes sigue en menor cantidad que en los adultos, una característica que puede contar para la alta susceptibilidad de los cerdos jóvenes a infecciones entericas.

Al nacer la mayoría de las células linfoides intestinales fueron de DN (NK?) y células CD4+ fueron también evidentes, aunque principalmente localizadas en la LP (Figura 3A, B, E). En contraste, células CD8+ aparecen relativamente más tarde en la vida (Figura 3C, F, Vega-López et al, 1995). Este desarrollo secuencial y localización celular en el intestino, puede estar relacionado a la función y se sugieren estudios al respecto para clarificar el rol en la relación inmune intestinal.

El origen de los IEL es obscuro, pero desde que estas células estuvieron distribuidas uniformemente a lo largo de la punta, media y base de la vellosidad (Tabla1), ellas pueden migrar de la LP al epitelio, donde hay selectividad retenida en la vecindad de la BM (Figura 3), en donde la alta proporción de los IEL fue localizado (52 y 53% en Du e II, Tabla1). La mayoría de estas células con fenotipo CD2+CD4-CD8+, sugieren un rol citotóxico y regulatorio para ellos. Esta localización particular es similar a la encontrada en otras especies y pueden dejar que estas células también interactuen con células CD4+ de la LP (Figura3I) y con células con el MHC-II (Vega-López et al., 1993).

Sin embargo otra proporción importante de IEL fue localizada en el nivel nuclear de lo enterocitos (43 y 42% en Du y II, Tabla1) y otros menos numerosas (5% en ambos Du y II, Tabla1) apicales cerca del lumen intestinal. Esas células fueron principalmente DN en su fenotipo (Figura3G), como previamente a sido descrito

(Vega-López et al., 1993). El rol de estas células sigue siendo desconocido pero pueden estar compuestas por un grupo heterogéneo de células, incluyendo células T TCR1($\gamma\delta$) y células NK, relacionadas a la respuesta innata inmune a material extraño como a sido descrito en humanos (Lefrançois et al., 1997) y en roedores (Beagley y HusBand, 1998).

IELs apicales son generalmente granulares con prolongaciones citoplásmicas prominentes interlazadas con la membrana plasmática de los enterocitos que mostro pérdida de microvellosidad y un alto citoplasma vacuolado (Figura 5A, B y 6A). Algunos autores han sugerido que los IEL apicales, son una población apoptótica de células en proceso de extrusión hacia el lumen intestinal (Viney y McDonald, 1990). Sin embargo, análisis ultra estructural con TEM de cada célula no mostro evidencia de células encogidas o condensación de cromatina celular y fragmentación (Figura 5B), rasgo característico de células apoptóticas. Estas características también estuvieron ausentes en linfocitos arrojados dentro del lumen intestinal (Figura 6B), sugiriendo posibles diferencias entre cerdos y ratones, y dejando la posibilidad de estas células puedan ser expulsadas por otras causas como la destrucción del enterocito. Considerando la baja proporción de células encontradas en la zona apical, el almacén de las células no puede tener un suceso frecuente en animales normales (no infectado), pero puede estar relacionado a la eliminación de enterocitos infectados o dañados. Esta situación puede ser diferente en animales infectados. Localización inmune de moléculas apoptóticas puede clarificar este punto.

En el nivel del núcleo de los enterocitos, ahí los IEL también presentaron un largo citoplasma, sugiriendo movimiento activo. En muchos casos se encontraron agrupados, aconsejando un modelo de viaje a través del epitelio, seguido por otros (Figura 3G, 5A y 6A). Si esta fue la causa, estas células nunca se acumulan en la zona apical de los enterocitos, quizás porque la estimulación antigénica esta dada en la parte basolateral de los enterocitos (Christ y Blumberg, 1997). La morfología

heterogéneas y el fenotipo de los IEL mostró que ellos pueden estar en diferente estado de diferenciación/activación o que ellos puedan tener diferentes orígenes (precursores de células cebadas ?), además la identificación de fenotipo es necesario para clarificar esta naturaleza.

Finalmente, está claro que el compartimiento epitelial del intestino contiene un numeroso y más bien una población heterogénea de células inmune. Esta heterogeneidad puede explicar algo de las diferentes respuestas que el sistema inmune intestinal es capaz de producir induciendo ambas tolerancia/energía a componentes de la dieta inofensivo o aparecer fuertes respuestas inmunes a material dañino. Esta heterogeneidad está tomada en consideración cuando protocolos aliados y estudios funcionales *in vitro* son ejecutados. Estos estudios cuantitativos establecen un modelo experimental, en una manera más precisa, el efecto del estímulo antigénico (dieta, flora normal, infección, inmunización oral, etc.) sobre la población de células en el comportamiento epitelial y puede permitir el estudio de la relación entre localización celular, fenotipo y función de los IELs.

MATERIAL Y METODOS

Cerdos

También determinar el número, distribución y estudios estructurales de células dentro del intestino, de 5 cerdos sanos de 6 meses de edad, de una enfermedad mínima y libre de neumonía enzootica de rebaño fueron usados. También se estudiaron los cambios en la población de los IEL con la edad, cuatro pequeñas camadas lactando por grupo de edad (recién nacidos, 1, 3, 5 y 7 semanas) fueron usadas. Los animales fueron mantenidos con la cerda sin acceso a alimentos sólidos hasta su muerte. Los animales fueron obtenidos del departamento de Ciencias Clínico Veterinarias de la Universidad de Bristol, UK.

Procesamiento de muestras para estudios con microscopía óptica (OM) y microscopía electrónica de transmisión

Las muestras de Du y II de cada animal fueron tomadas inmediatamente después de que los animales fueron sacrificados con pentobarbiton sodico (Euthatal, RMB animales sanos, Ltd., Dagenham, UK). Las muestras de los cerdos jóvenes, fueron lavadas en PBS frío y fijados en paraformaldehído-bains-perdoyato (PLP) con descripción previa (Vega-López et al., 1993). Para estudios estructural, para muestras intestinales de animales adultos, previamente inmerso en PBS frío, fueron fijados en glutaraldehído (Ciencias en microscopía electrónica, Washington, PA) en PBS por 60 minutos a temperatura ambiente después de lavados en PBS, los tejidos fueron post-fijados con tetróxido de osmio al 1% en PBS por 60 minutos a 4°C. Siguiendo con enjuague y deshidratada con concentraciones crecientes de etanol, los especímenes fueron embebidos en resina Spurr's (Embedding Kit, Polysciences, Inc.) Siguiendo las instrucciones de manufactura. secciones de 0.5 µm para OM y 100 nm para TEM fueron entonces cortadas en un ultramicrotomo (Ultracuts, Reichert-Jung) y finalmente teñidos con acetato de uranio al 2% y citrato de plomo al 0.4%, para observación con microscopía electrónica, con un microscopio JEM-2000EX (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) sobre película Kodak Electron (East-man Kodak, Cc., Rochester, NY).

Análisis de muestras de tejido intestinal

Células teñidas IHC fueron contadas en LP y epitelio en diferentes campos al microscopio (400X) para cada muestra de intestino del cerdo. El área del tejido fueron medidos usando un analizador de imágenes computarizado semiautomático (VIDS V, Synoptics, Ltd., UK) y las células positivas dentro del área fueron contadas y registradas. En número y localización de células intraepiteliales fueron analizadas en muestras intestinales de cerdos adultos teñidas con hematoxilina de Harris y las células con morfología de linfocitos fueron contadas en 10 vellosidades de Du y 7 de Il por cada uno de los cinco animales, evitando las placas de Peyer's de la vellosidad. La vellosidad fue seleccionada al azar sobre la base de una similitud de corte a lo largo y en ángulo. Cada vellosidad fue dividida en 3 partes iguales: punta, media y base (Figura 5A), de la punta de la vellosidad a la parte profunda de la cripta. Células intraepiteliales de estas partes fueron contadas y registradas. En la localización de las células dentro del epitelio, el epitelio fue dividido en 3 zonas: apical, nuclear y membrana basal (Figura 5B) las células localizadas en estos compartimientos en la vellosidad de cada muestra fue contada y registrada usando el análisis de imagen. Para las características estructural celular y la localización detallada de IEL, fotografías para Du e Il con TEM fueron tomadas de 5 animales adultos y las características morfológicas y topológicas fueron analizadas y registradas.

Inmunohistoquímica

Anticuerpos monoclonales (Mab) Anti-CD2(MSA-4, Hammerberg y Schurig, 1986), anti-CD4 (74-12-4, Pescovitz et al., 1984) y anti-CD8 (76-2-11, Pescovitz et al., 1984) fueron usados en IHC. Para el desarrollo del estudio, células positivas MSA-4 en el epitelio y LP de la vellosidad de Du e Il para los 5 campos (400 x amplificación)

fueron contadas y registradas de las muestras embebidas con parafina de los 4 pequeños cerdos lactando (0, 1, 3, 5 y 7 semanas de edad) en cada grupo de edad. Muestras congeladas de Du e II de 5 animales de 6 meses de edad fueron teñidos con MSA-4,74-12-4 y 76-2-11 Mab x IHC, y también determinado el fenotipo y la localización de los IEL dentro del epitelio por OM. Estas células fueron contadas y registradas usando el analizador de imágenes. La prueba de t-Student Pareada fue usada para comparar los datos entre los grupos de edades y entre los sitios intestinales (Du vs II).

Agradecimientos

Este trabajo fue llevado acabo por fondos del CONACYT-México (proyectos 4263-M y 26361-B) y el BSSRC del Reyno Unido. GAC soporte parcial reservado de la "Cátedra de investigación (1.24)" de la FES-Cuautlilan- UNAM-México. Los autores agradecen a Bec Mónica Mondragón por la asistencia técnica y al profesor Derek Wakelin (U. Nottingham, UK) por la crítica a la lectura del manuscrito de este trabajo.

Referencias

- Beagley K.W. and Husband A.J. (1998). Intraepithelial lymphocytes: Origins, distribution and function. *Crit. Rev. Immunol.* 18:237-264.
- Beste C., Sydora B.D., Jamieson R. A. and Kronenberg M. (1996). Intestinal intraepithelial lymphocytes Respond to Systemic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *Cellular Immunology* 167:161-169.
- Blenkinson J., Ernst P.B. and Underdown S.J. (1987). The gastrointestinal tract as an immunologic organ: State of the art. *Annals of Allergy* 59 (Part II):17-20.
- Brandtzaeg P., Halvorsen T.S., Kett K., Krajl P., Kvist D., Rognum T.O., Scott H and Solild L.M. (1989). Immunology and immunopathology of human g. mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 87:1562-1584.

- Brandtzaeg P. (1985). Mucosal immunology. A long way to the surface. *The Immunologist* 3(3):75-77.
- Cerf-Bennusson N. and Guy-Grand D. (1991). Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 20:549-578.
- Christ A.D. and Blumberg R.S. (1997). The intestinal epithelial cell: Immunological aspects. *Springer Semin. Immunopathol.* 18:449-461.
- Chu. R. M., Gluck R. and Ross D. (1978). Gut associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) to the small intestine. *Ann. J. Vet. Res.* 40:1720-1728.
- Ebert E.C. (1980). Proliferative responses of human intraepithelial lymphocytes to various T-cell stimuli. *Gastroenterology* 97:1972-1981.
- Ferguson A. (1978). Lymphocytes and cell mediated immunity in the small intestine. *Adv. Med.* 14:278-293.
- Fleisner J.P. (1983). Natural cytotoxic responsiveness to interferon and morphology of intraepithelial lymphocytes from the small intestine of the rat. *Immunology* 49:733-741.
- Fujishashi K., Taguchi T., McGhee J.R., Eldrige J.H., Bruce M. G. Green D.R., Singh B. and Kiyono H. (1990). Regulatory function for murine intraepithelial lymphocytes T cells abrogate oral tolerance. *J. Immunol.* 145(7):2010-2019.
- Fujishashi K., Kweon M-N., Kiyono H., VanCott J.L., van Ginkel F.W., Yamamoto M. and McGhee J.R. (1997). A T cell/B cell/epithelial cell interact for mucosal inflammation and immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 18:477-494.
- Guy-Grand D., Grice C. and Vassalli F. (1978) The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell: nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J. Exp. Med.* 148:1661-1677.
- Guy-Grand D., Cerf-Bennusson N., Malanin-Seris M., Briotet C. and Vassalli F. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 173:471-481.
- Hamad H. and Klein J.E. (1994). Phenotypic and functional heterogeneity of murine intestinal intraepithelial lymphocytes defined by cell density: Implications for route of differentiation and responsiveness to proliferation induction. *Immunology* 82:611-616.
- Hanszberg C. and Scherling G. (1986). Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11:107-121.
- Husby B. (1988). Dietary antigens: Uptake and Immoral immunity in man. *APMIS* 96 (Suppl. 1): 5-40.
- Jerry A., Cer-Bennusson N., Bronson N., Sels F. and Guy-Grand D. (1990). Subset of CD3+ (TcR α 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.
- Kiyono H., Bienenstock J., McGee J. R. and Ernst F.B. (1992). The mucosal immune system: Features of inductive and effector sites to co-*Ider* in mucosal immunisation and vaccine development. *Reg. Immunol.* 4:54-62.

- Lefrançois L. (1991). Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of small intestine. *J. 147:1746-1751.*
- Lefrançois L., Fuller B., Hutless J.W., Olson E. and Puddington L. (1997). on the front lines: Intraepithelial lymphocytes as primary effectors of intestinal immunity. *Springer Semin. Immunopathol. 18:463-492.*
- Marrs M.N. (1980). Studies intestinal lymphoid tissue. III. Quantitative analysis of epithelial lymphocytes in the small intestine of human control subjects and of patients with celiac sprue. *Gastroenterology 79:481-492.*
- McGhee J.R., Mestecky J., Dartschong M.T., Eldrige J.H., Hirvanen M. and Kiyono H. (1992). The mucosal immune system: From fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine 10:75-88.*
- McGhee J.R. and Kiyono H. (1993). New perspectives in vaccine development: Mucosal immunity to infections. *Infectious Agents and Disease 2:55-73.*
- Mega J., McGhee J.R. and Kiyono H. (1992). Cytokine and Ig producing cells in mucosal effector tissues: analysis of IL-5 and INF-gamma producing T cells from mouse salivary gland-associated tissues. *J Immunol. 148:2030-2039.*
- Moghel R. and MacDonald A.J. (1990). Immunological and inflammatory responses in the small intestine associated with helminthic infections. In: *Parasites: Immunity and pathology.* J.M. Behke, Dc. (Taylor and Francis, UK), pp249-281.
- Olivier M., Barton P. and Salmon H. (1994). Immunohistochemical localization in the intestine of swine of the cellular and humoral components of the immune response. *Vet-res. 25(V): 57-65.*
- Palst R. (1987). The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat. Embriolo. Bari. 176(2):135-144.*
- Palst R. and Rothkötter H.J. (1999). Postnatal development of lymphocytes subset in different compartments of the small intestine fo piglets. *Vet. Immunol- Immunopathol. 72:167-173.*
- Parrot D.M.V. (1987). The structure and organization fo lymphoid tissue in the intestine. In: *Food allergy and intolerance.* J. Brostoff and S.J. Chalmers Eds., (Bailliere Tindal, W.B. Saunders, UK), pp 3-6.
- Pescovitz M.D., Lumley J.K. and Sachs D.H. (1984). Preparation and characterization monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J. Immunol. 133:368-375.*
- Sanchez-García F.J., Aller W.W. and McCormack W.T. (1997). Impaired calcium mobilization and differential tyrosine phosphorylation in intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunology 91:81-87.*
- Stokes C.R., Southall J.F. and Turner M.W. (1975). Immune exclusion is a function of IgA. *Nature (London) 255:745-746.*
- Stokes C.R. (1988). Immune systems in the porcine gut. *The pig veterinary society proceedings 20:19-30.*
- Stokes C.R. Bailey M. and Wilson A.D. (1994). Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet. Immunol. Immunopathol. 43:143-150.*
- Teglsliere A., Laine W., Soldatenchi D. and Boraschi D. (1981). Natural killer activity of gut mucosal lymphoid cells in mice. *Eur. J. Immunol. 11:919-922.*
- Tumblson M.E. (1986). Preface. *IN swine in biomedical research.* June 17-20, 1985, University of Missouri, USA (New York:Plenum Press), pp v.

- Van Kerkhove C., Ransel G.J., Demich K., Reich K., Ehm A.K., Darfiñonias H. and Brenner, M.B. (1992). Oligoclonality of human intestinal intraepithelial T cells. *J. Exp. Med.* 175:5763.
- Vega-López M.A., Tolamo E., Bailey M., Stevens K. and Stokes C.R. (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37:49-60.
- Vega-López M.A., Bailey M., Tolamo E. and 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.
- Vinney J. and McDonald T.T. (1990). Selective death of T cell receptor gamma/delta+ intraepithelial lymphocytes by apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 20(12):2809-2912.
- Walker W.A., (1987). Pathophysiology of intestinal uptake and absorption of antigen in food allergy. *Annals of Allergy* 59:7-16.
- Whary M.T., Zerkower A., Confar F.L. and Ferguson F.G. (1995). Age-related differences in subset composition and activation responses of intestinal intraepithelial and mesenteric lymph-node lymphocytes from neonatal swine. *Cellular Immunology* 163:215-221.
- Wilson A.D., Stokes C.R. and Bourne F.J. (1986a). responses of intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses. *Immunology* 58:621-625.
- Wilson A.D., Stokes C.R. and Bourne F.J. (1986b). Morphology and functional characteristics of isolate porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology* 59:109-113.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

Development of Intraepithelial Cells in the Porcine Small Intestine

M.A. VEGA-LÓPEZ^{a*}, G. ARENAS-CONTRERAS^a, M. BAILEY^c, S. GONZÁLEZ-POZOS^b, C.R. STOKES^c,
M.G. ORTEGA^a and R. MONDRAGÓN-FLORES^d

^aCenter for Research and Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), Dept. Experimental Pathology, ^bElectronic Microscopy Unit, ^cDept. Genetics and Molecular Biology and ^dDept of Biochemistry, Av. IPN 2508, Mexico 07360, D.F. MEXICO, ^eLaboratory of Human Immunology, FES-Cuautitlán-UNAM, México and ^fDivision of Molecular and Cellular Biology, Department of Clinical Veterinary Sciences, University of Bristol, U.K

The number, phenotype, localisation and development of intraepithelial lymphocytes (IEL) from duodenum (Du) and ileum (Il) were studied by immunohistochemistry (IHC) and light and electron microscopy in unweaned (0-7 weeks old) and six months-old pigs. Developmental changes at birth showed that 38% of the total lymphocytes in the villi were IEL, mainly of the CD2⁺CD4⁺CD8⁻ double negative (DN) phenotype. That proportion rose to over 50% at week 5 after birth, resembling adult proportion, although still with fewer cells than in adult pigs. CD4⁺ cells appeared relatively early in life although they were confined to the lamina propria (LP) and CD8⁺ cells were found only in low numbers. In the villi of adult animals, almost half of the total number of lymphocytes were IEL (49% Du, 52% Il). Over half of these IEL (52% Du, 53% Il) showed the CD2⁺CD4⁺CD8⁻ phenotype and were localized at the epithelium's basement membrane. Numerous (43% Du, 42% Il) DN IEL were found grouped at the enterocyte nucleus level and relatively few (5% in Du and Il) granular IEL were found apically in the epithelium. These proportions were homogeneously maintained along the villi's tip, middle and bottom, suggesting that the IEL may have their origin in the LP. Therefore, the IEL compartment in the porcine intestine develops slowly with age and is actually composed by a heterogeneous population of cells (sull, DN and CD8⁺). These results may explain the increased susceptibility of young animals to disease during the lactation period and should be taken into account when functional studies are carried out with IEL. The quantitative results of this paper established a model for studies on the effect of age, diet, normal flora, infection and oral immunization on the IEL of the gut.

Keywords: IEL, immune development, lymphocyte, mucosal immunology, small intestine, swine

Abbreviations: BM, basement membrane, Du, duodenum, Il, ileum, IHC, immunohistochemistry, IEL, intraepithelial lymphocyte, DN, double negative, LP, lamina propria, LPL, lamina propria lymphocytes, OM, optical microscopy, PLP, paraformaldehyde-lysine-periodate, TEM, transmission electron microscopy

* Senior author for correspondence: Marco A. Vega-López, PhD, Assistant Professor, CINVESTAV-IPN, Dept. Experimental Pathology, Av. IPN 2508, México 07360, D.F., México. Telephone 0052-5-747-3800 Ext# 3655. Fax: 0052-5-747-9890. e-mail: mavegal@yahoo.com

INTRODUCTION

Oral immunization has aroused great interest and expectation since this route may represent an alternative for disease control and also to prevent and control autoimmune diseases by inducing tolerance to autologous antigens (Brandtzaeg, 1995). The mucosal immune system has some similarities but also many differences with the systemic immune system (Stokes, 1988; Kiyono, *et al.*, 1992). On the one hand, both systems contain cells which follow similar developmental patterns and effector functions (McGhee and Kiyono, 1993). On the other, differences in cell distribution and immune regulation have also been described (Kiyono, *et al.*, 1992). Unlike the systemic immunological tissues, the mucosal immune system in the gut must continuously deal with an enormous array of foreign material and must be able to accurately discriminate between harmless food antigens and commensal microorganisms and hazardous material, inducing anergy and/or tolerance to the former and a strong local and systemic immune response against the latter (Bienenstock, *et al.*, 1987; Moqbel and MacDonald, 1990; Stokes, *et al.*, 1994). Moreover, the local immune system must maintain an appropriate balance between the organism and bacteria from the normal flora of the gut by mechanisms such as IgA-mediated immune exclusion (Stokes *et al.*, 1975; Walker, 1987; Husby, 1988; Brandtzaeg, 1995). These two functions of the local immune system are likely to be carried out through regulatory mechanisms different to those found in the systemic immune system and, perhaps, through subtle but substantial differences in the type and function of the cells found at the mucosal sites.

The gut contains the largest number of immune cells in the organism, approximately 60% of all lymphocytes (Parrot, 1987; Hamad and Klein, 1994; Takahashi and Kiyono, 1999). Many T cells are located in the lamina propria (LPL) and within the epithelium (intraepithelial lymphocytes, IEL) (Moqbel and MacDonald, 1990). Because of their vicinity to the intestinal lumen and their access to food antigens, IEL are strategically located to induce,

regulate and perform immune responses (Fabst, 1987; Cerf-Bensussan and Guy-Grand, 1991; McGhee, *et al.*, 1992). Previous studies in the pig have demonstrated that, unlike rodents and humans, the lymphoid components of the intestinal villi are poorly developed at birth (Vega-Lopez, *et al.*, 1993; Fabst and Rothkottler, 1999). The postnatal development of this compartment appears to be driven by exposure to microbial antigens, since it does not occur in germ-free pigs (Fabst and Rothkottler, 1999) and is accelerated by weaning in conventional pigs (Vega-Lopez, *et al.*, 1995). The pig therefore provides an appropriate system to study the development of IEL compartments in response to antigen. Despite this, and despite extensive studies in other species (Guy-Grand, *et al.*, 1978; Tagliabue *et al.*, 1981; Flexman, 1983; Brandtzaeg, *et al.*, 1989; Ebert, 1989; Jarry, *et al.*, 1990; Sanchez-Garcia, *et al.*, 1997), relatively few studies of IEL development in pigs have been undertaken (Wilson *et al.*, 1986a; 1986b; Whary, *et al.*, 1995; Fabst and Rothkottler, 1999). Therefore, in this paper we determined the number, phenotype, localization and development of IEL in the pig gut.

RESULTS

Developmental Changes In Porcine Intestinal Intraepithelial Cells

The number of CD2+ IEL in unweaned animals (birth up to 7 weeks of age) is shown in Figure 1. The number of CD2+ cells was initially low in epithelium and lamina propria (LP), but increased rapidly thereafter in both compartments (Figure 1). The increase was more evident in Du compared with Il at birth and weeks 3 and 5 ($P < 0.05$) (Figure 2). At birth the epithelium contained 38% of the total CD2+ cells in Du and 35% in Il villi, and that percentage increased steadily thereafter up to 52% and 64% respectively, at 7 weeks of age (data not shown). CD2, CD4 and CD8 staining by immunohistochemistry (IHC) in serial

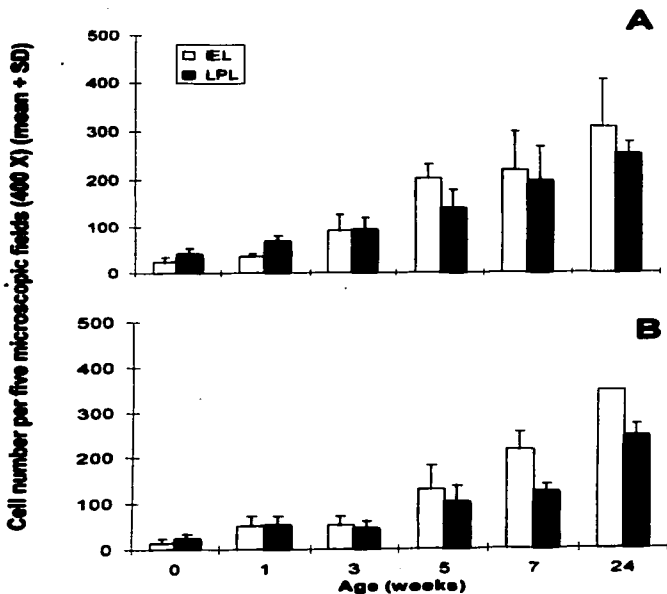


FIGURE 1 Determination of CD2+ cells in duodenum (A) and ileum (B) villi of unweaned (0-7 weeks, n=4 per age group) and conventionally reared adult (24 weeks, n=5) pigs. Each column represents the mean number of intraepithelial (IEL = empty bars) and lamina propria (LPL = alashed bars) CD2+ cells, counted in the villi's epithelium of five randomly chosen microscopic fields (400 X) per animal

frozen sections from 4 animals per age group (birth, 1, 3, 5, and 7 weeks) showed that most intestinal cells in young animals were CD2+ double negative (DN) (figure 3). CD4+ cells appeared early in the intestinal

LP (figure 3), but not in the epithelium and CD8+ cells appeared late in life and remained low in number (figure 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS EN
FALLA DE ORIGEN

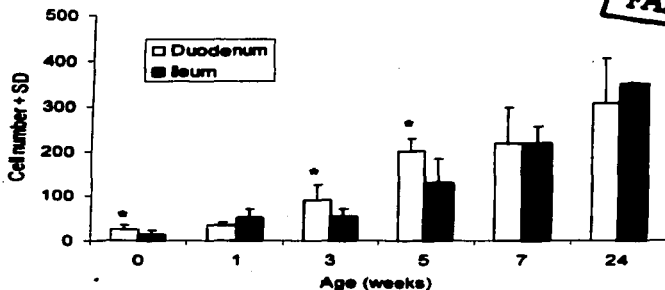


FIGURE 2 Development of intraepithelial CD2⁺ cells in the small intestine of unweaned (0-7 weeks old, $n = 4$ animals per age group) and conventionally reared adult animals (24 weeks old, $n = 3$). Each column represents the mean number of IEL of duodenum (empty bars) and ileum (shaded bars), counted in the villi's epithelium of five randomly chosen microscopic fields (400 X) per animal. The asterisks above the bars represent statistical difference ($P < 0.05$) between duodenum and ileum at that time point by paired *t*-Student test.

Determination of the Number, Phenotype and Topological Distribution of Intraepithelial Cells in the Small Intestinal Villi of Adult Pigs

The average number of total lymphocytes per villus (IEL+LPL) in five adult animals is shown in Table I. Up to half of these cells were located at the epithelium compartment in duodenum (Du) (49%) and ileum (I) (52%) (Table I). The proportion of intraepithelial cells was homogeneously distributed from the tip (32% Du, 34% I), through the middle (37% Du, 39% I), and the bottom (31% Du, 27% I) of the villi's epithelium (Figure 4A and Table I). The topological distribution of IEL within the epithelium (Figure 4B) showed that half of them located preferentially at the basement membrane (BM) (52% Du, 53% I) of the tip, middle and bottom of the villi. Another important proportion of cells (43% Du, 42% I) was found around the enterocyte nucleus and only a small proportion (5% Du, 5% I) of cells was located at the epithelium's apical zone (Table I).

Immunohistochemical staining of serial frozen sections from 6 months old animals ($n = 5$), showed that most IEL at the BM were CD2⁺CD4⁻CD8⁺ cells (Figure 3). Whereas IEL localized at the enterocyte's apical and nuclear level were mostly DN cells (Figure 3). It was clear that most of the CD4⁺ cells were confined to the villus LP (Figure 3).

Ultrastructural Study of Small Intestinal Intraepithelial Cells in Adult Pigs

Cells morphologically similar to lymphocytes and with intraepithelial distribution were detected by transmission electron microscopy (TEM) in duodenal and ileal samples from five six months old pigs. These cells ranged in size from 2.5- to 7 μ m of diameter. At the epithelium's apical level (Figure 5A), the IEL were mainly round cells of approximately 5 μ m in diameter and with numerous long cytoplasmic prolongations interlaced with the enterocyte's plasma

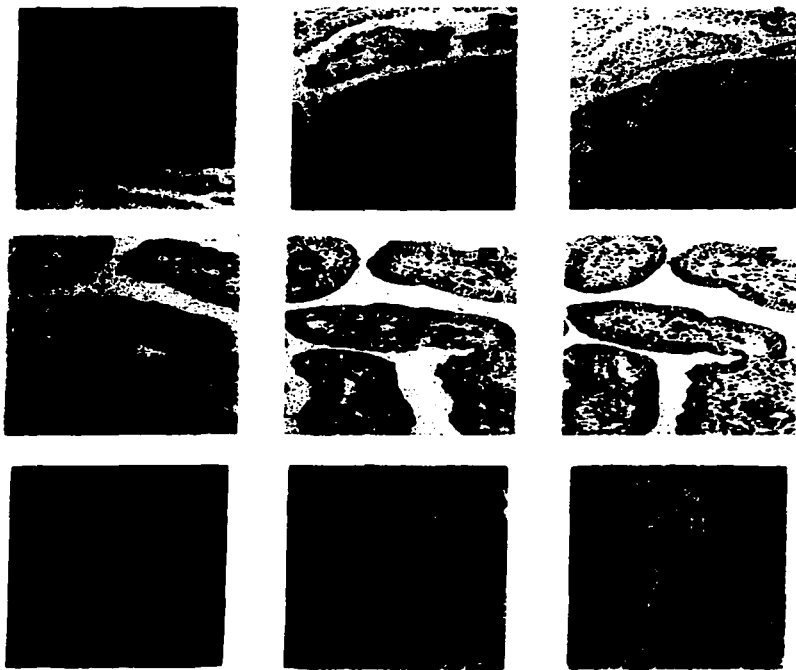


FIGURE 3 Representative immunohistochemical CD2 (A, D, G), CD4 (B, E, H) and CD8 (C, F, I) staining in duodenal serial frozen sections of a newborn (A, B, C), a 3 week-old unweaned piglet (D, E, F) and a 6 month-old (G, H, I) adult pig, showing the differential localization of these cells in the epithelium and LP of the villi. Few CD4 and CD8 cells are evident in the newborn piglet (arrows). Identical results were found in duodenum and ileum from four piglets per age group and five adult animals. Magnification = 200 X (See Color Plate VII at the back of this issue)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

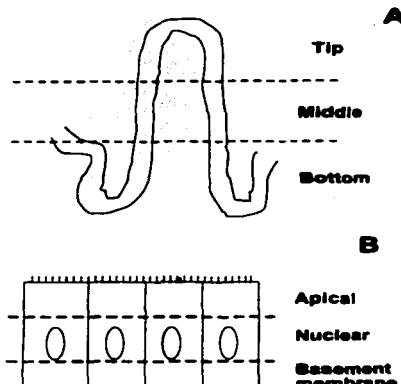


FIGURE 4 Diagram of a small intestinal villus (A) and the epithelium (B) which shows the areas into they were divided to determine the number and localization of intraepithelial cells in six months old pig

membrane (Figure 5B). Dense granules of 0.6 μm in diameter and many ribosomes were detected in the cytoplasm. Besides, adjacent epithelial cells had a high number of small vesicles of 0.2 μm in diameter (Figure 6A). Many IEL were located at the epithelial nuclear zone, some of them were elongated, reaching up to 7 μm of length (Figure 5C). The cytoplasm was twice as large as the nucleus and several mitochondria, ribosomes and endoplasmic reticulum were detected there (Figure 5C). Two or more cells in the same intravacuolar space were frequently seen in this area of the tissue (Figure 3G, Figure 6A). The smallest IEL (2.5 μm in diameter), were detected near the BM (figure 5A). These cells were nearly spherical in shape and located into a vacuole in the intraspherical space (figure 5D). Their nuclei were prominent with

few cytoplasm volume and organelles. Moreover, cells leaving the epithelium were occasionally detected although in low number. These cells did not show morphological features of apoptosis (figure 6B), showing nuclei and cytoplasm integrity.

DISCUSSION

At the intraepithelial compartment, a large, heterogeneous group of cells has the potential for early contact with antigenic material derived from the gut (Cerf-Bensussan and Guy-Grand, 1991). The ability of normal individuals to discriminate between harmless dietary components and potentially hazardous material and to mount appropriate immune responses implies the presence of reliable but yet not well identified regulatory mechanisms. Previous studies have quantified (Ferguson, 1978; Parrot, 1987) and characterized human and rodent IEL in terms of morphology (Marsh, 1980), phenotype (Brandtzaeg, *et al.*, 1989; Jarry, *et al.*, 1990; Lefrancois, 1991; van Kerckhove, *et al.*, 1992; McGhee and Kiyono, 1993) and effector functions (Ebert, 1989; Fujihashi, *et al.*, 1990; Guy-Grand, *et al.*, 1991; McGhee, *et al.*, 1992; Mega, *et al.*, 1992; Beate, *et al.*, 1996; Fujihashi, *et al.*, 1997). It has also been reported that cells with heterogeneous characteristics are found at the epithelial compartment (Tagliabue *et al.*, 1981; Flexman, 1983; Lefrancois, 1991; Christ and Blumberg, 1997). Besides, some authors have suggested that the granular cells in the epithelium may be a population of mast cell precursors (Flexman, 1983). However, little information is available for other species including the pig (Chu *et al.*, 1979; Wilson, *et al.*, 1986a, 1986b; Olivier, *et al.*, 1994; Whary, *et al.*, 1995), a species whose similarities with human anatomy and physiology makes it a good experimental model (Tumbleson, 1986). Moreover, little information is available in any of these models about the IEL distribution along the villi and within the epithelium and therefore, quantitative studies on these compartments are needed. In this paper the number, phenotype, localization and development of lymphocytes lodged in these different epithelial compartments of the small intestine are described.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE I The number and localisation of intraepithelial cells in the porcine small intestine. Numbers represent the mean and standard deviation (SD) of cells counted from 10 villi in duodenum and 7 villi in ileum in each of five six-months old healthy pigs. The data was analysed by paired t-Student test. IEL = intraepithelial lymphocytes, LPL = lamina propria lymphocytes

	Duodenum		Ileum	
	Mean (SD)	%	Mean (SD)	%
Lymphocytes in a villus				
IEL's	112 (6)	49	99 (16)	52
LPL	116 (17)	51	89 ^a (13)	48
IEL localisation along the villus				
Tip	35 (12)	32	33 (11)	34
Middle	42 (13)	37	39 (11)	39
Bottom	35 (15)	31	27 (9)	27
IEL localisation within the epithelium				
Apical	5 (2)	5	5 (2)	5
Nuclear	48 (13)	43	42 (11)	42
Basement membrane	59 (17)	52	52 (15)	53

a. $P = 0.033$ with duodenum

It is well established that young animals are quite susceptible to infection. This may correlate with the very low numbers of LPL and IEL present at birth and with their relatively subsequent slow accumulation (Vega-Lopez *et al.*, 1993; Pabst and Rothkotter, 1999). In this paper it was shown that over 50% of the total T cells in the small intestine were located at the epithelium in 6 months old animals, pointing out the importance of these cells located at the very entrance of foreign material. Therefore it was of interest to study the way those cells reach that proportion in the young pig. Although the total number of intestinal cells was low at birth, a significant proportion (38 and 35% in Du and Il) was in the epithelial compartment. Most of these cells were DN since CD4+ and CD8+ cells are only detectable later in life (Figure 3, Vega-López *et al.*, 1993; Pabst and Rothkotter, 1999). This is an interesting finding considering that the animal comes from a virtually sterile environment, where antigenic stimuli are rather limited, suggesting that this IEL population may have a role distinct to protection. Soon after birth there was a dramatic increase of CD2+ IEL, especially in weeks 3 and 5 in Du where these increases were higher than those found in Il ($P < 0.05$) (Figures 2 and 3). These changes

may suggest that the stimuli for IEL, to reach their final localization, might come from the mouth (food antigens), although the normal microflora might also contribute to these antigenic stimuli in driving lymphocytes to the epithelial compartment, rather than the LP, even in the absence of contact with solid food, as it has been demonstrated at weaning (Vega-Lopez, *et al.*, 1995). The absolute number of cells in young animals was still far less than that of adults, a feature that may account for the high susceptibility of the young pig to enteric infections.

At birth, most of the intestinal lymphoid cells were DN (NK7) and CD4+ cells were soon evident, although mainly located at the LP (Figure 3A, B, E). In contrast, CD8+ cells appeared relatively late in life (Figure 3C, F, Vega-Lopez *et al.*, 1995). This sequential development and cell localization in the gut might be related to function, and studies in this respect are required to clarify their role in the intestinal immune regulation.

The origin of the IEL is still obscure, but since these cells were uniformly distributed along the tip, middle and bottom of the villi in adult animals (Table I), they may migrate from the LP to the epithelium, where they are selectively retained in the vicin-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FIGURE 5 Representative transmission electron micrograph of porcine duodenal epithelium: (A). Intraepithelial cells can be distinguished at the apical (B), nuclear (C), and basement membrane (D) zones. Sample taken from a six-month old pig. Identical results were found in five different animals in duodenum and ileum. Lu = intestinal lumen, e = enterocyte. Scale bar A = 2 μ m, B, C and D = 1 μ m

ity of the BM (Figure 3), where the highest proportion of IEL was located (52 and 53% in Du and II, Table I). Most of these cells bear the CD2+CD4-CD8+ phenotype, suggesting a cytotoxic and regulatory role for them. This particular location is similar to that found

in other species and may allow these cells to interact with adjacent LP CD4+ (Figure 3I) and MHC-II+ cells (Vega-López *et al.*, 1993).

However, another important proportion of IEL was located at the enterocyte nuclear level (43 and 42% in

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

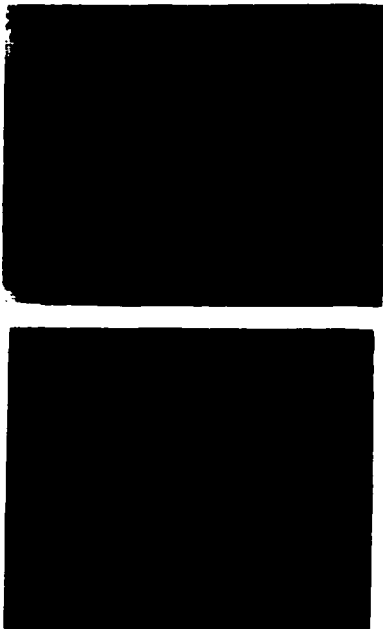


FIGURE 6 Representative transmission electron micrography of porcine duodenal epithelium from a 6-month old animal. These IELs occupy one intrapithelial space (A, arrowheads). The adjacent enterocyte shows a highly vacuolated cytoplasm (A, arrow). An apparently intact IEL is extruded from the epithelium (B), leaving a disrupted enterocyte behind (B, arrow). Similar results were found in five different animals in duodenum and ileum. Scale bar = 2 μ m

Du and II, Table I) and other less numerous (5% in both Du and II, Table I) apically near the gut lumen. These cells were mainly DN in phenotype (Figure 3G), as previously described (Vega-Lopez, *et al.*, 1993). The role of these cells is still unknown but they may be composed by an heterogeneous group of cells, including TCR1 ($\gamma\delta$) T cells and NK cells, related to the innate immune response to foreign material as described in humans (Lefrancois *et al.*, 1997) and rodents (Beagley & Husband, 1998).

Apical IELs were mostly granular with prominent cytoplasmic prolongations interlaced with the enterocyte's plasma membrane that showed loss of microvilli and a highly vacuolated cytoplasm (Figures 5A, B and 6A). Some authors have suggested that the apically located IEL is an apoptotic population of cells in the process of extrusion towards the intestinal lumen (Viney & McDonald, 1990). However, TEM ultrastructural analysis of such cells showed no evidence of cell shrinkage or nuclear chromatin condensation and fragmentation (figure 5B), characteristic features of apoptotic cells. These features were also absent in lymphocytes shed into the intestinal lumen (figure 6B), suggesting possible differences between pigs and mice, and stressing the possibility of these cells being extruded by other causes such enterocyte destruction. Considering the low proportion of cells found at the apical zone, the shedding of cells may not be a frequent event in normal (uninfected) animals, but may be related to the elimination of damaged or infected enterocytes. This situation may be different in infected animals. Immune localisation of apoptotic molecules may further clarify this point.

At the enterocyte's nuclear level, there were also IEL with long cytoplasmic processes, suggesting active motion. In many cases they were found grouped, suggesting a pattern of traveling through the epithelium following each other (Figures 3G, 5A and 6A). If this was the case, these cells never accumulated at the apical zone of the enterocyte, perhaps because the antigenic stimuli are given at the basolateral part of the enterocyte (Christ and Blumberg, 1997). The heterogeneous morphology and phenotype of the IEL showed that they may be in different stages of differentiation/activation or that they may have dif-

ferent origins (mast cell precursors?), further phenotype identification is needed to clarify their nature.

Finally, it is clear that the epithelial compartment of the gut contains a numerous and rather heterogeneous population of immune cells. This heterogeneity may explain some of the different responses the intestinal immune system is able to produce either inducing tolerance/anergy to harmless diet components or eliciting strong immune responses to hazardous material. This heterogeneity must be taken in consideration when isolation protocols and *in vitro* functional studies are performed. These quantitative studies established an experimental model to evaluate, in a more precise manner, the effects of antigen stimuli (diet, normal flora, infection, oral immunization, etc.) on the cells populating the epithelial compartment and may allow the study of the relationships among cell localisation, phenotype and function of IELs.

MATERIAL AND METHODS

Pigs

To determine the number, distribution and ultrastructural studies of cells within the small intestine, five 6 months old healthy pigs, from a minimal disease and enzootic pneumonia-free herd were used. To study the changes in IEL populations with age, at least four unweaned littermates per age group (birth, 1, 3, 5 and 7 weeks old) were used. The animals were maintained on the sow without access to solid food until slaughtered. The animals were housed in the animal facility of the Department of Clinical Veterinary Sciences, University of Bristol, UK.

Processing of Samples for Optical (OM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) Studies

Samples of Du and I1 from each animal were taken immediately after the animals were sacrificed with an intravenous overdose of sodium pentobarbitone (Eutatal, RMB Animal Health, Ltd., Dagenham, UK). The samples from the young pigs, were washed in

cold PBS and fixed in paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) as previously described (Vega-Lopez *et al.*, 1993). For ultrastructural studies, intestinal samples from adult animals, previously immersed in cold PBS, were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Forth Washington, PA) in PBS for 60 minutes at room temperature. After washing in PBS, the tissues were post-fixed with 1% osmium tetroxide in PBS for 60 minutes at 4 C. Following rinsing and dehydration with increasing concentrations of ethanol, the specimens were embedded in Spurr's resin (Embedding kit, Polysciences, Inc.) following the manufacturer's instructions. Sections of 0.5 μ m for OM and 100 nm for TEM were then cut on an ultramicrotome (Ultracut, Reichter-Jung) and finally stained with 2% uranic acetate and 0.4% of lead citrate for observation and micrography with a JEM-2000EX electron microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) on Kodak Electron Image Film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

Analysis of Intestinal Tissue Samples

IHC stained cells were counted in LP and epithelium of at least five randomly chosen microscopic fields (400 X) from each intestinal pig sample. The area of the tissue was measured using a semiautomatic, computer assisted image analyser (VIDS V, Synoptics, Ltd., UK) and positive cells within that area were counted and recorded. The number and localisation of intraepithelial cells were analysed in intestinal samples of adult pigs stained with Harris haematoxylin and the cells with lymphocyte morphology were counted in at least 10 villi from Du and 7 villi from I1 from each one of five animals, avoiding the Peyer's patches villi. The villi were randomly selected on the basis of similar length and angle of cut. Each villus was divided in three proportionally equal parts: tip, middle and bottom (Figure 5A), from the villus tip to the deepest part of the crypts. Intraepithelial cells from each of these parts were counted and recorded. In the cell localisation within the epithelium study, the epithelium was divided in three zones: apical, nuclear and basement membrane (Figure 5B). The cells located in these compartments in the villi of each

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sample were counted and recorded using the image analyser. For ultrastructural cell characteristics and detailed localisation of IEL, Du and II TEM photographs were taken from five adult animals and characteristic morphological and topological features were analysed and recorded.

Immunohistochemistry

Anti-CD2 (MSA-4, Hammerberg and Schurig, 1986), anti-CD4 (74-12-4, Pescovitz *et al.*, 1984) and anti-CD8 (76-2-11, Pescovitz *et al.*, 1984) monoclonal antibodies (MAb) were used in IHC. For the developmental study, MSA-4 positive cells in the epithelium and LP of the Du and II villi, from at least five randomly chosen fields (400 × magnification) were counted and recorded from paraffin embedded samples from at least four young unweaned pigs (0, 1, 3, 5 and 7 weeks old) in each age group. Du and II frozen samples from five 6 months old animals were stained with MSA-4, 74-12-4 and 76-2-11 MAb by IHC, to determine the phenotype and localization of IEL within the epithelium by OM. The cells were counted and recorded using the image analyser. Paired t-Student test was used to compare data between age groups and between intestinal sites (Du vs II).

Acknowledgements

This work was partially funded by CONACYT-México (Projects 4263-M and 26361-B) and the BBSRC of the United Kingdom. GAC received partial support from "Cátedra de investigación (1.24)" from FES-Cuautitlán-UNAM-México. The authors wish to thank BSc Mónica Mondragón for technical assistantship and Professor Derek Wakelin (U. Nottingham, UK) for critically reading the manuscript of this work.

References

- Beagley K.W. and Husband A.J. (1998). Intraepithelial lymphocytes: Origins, distribution and function. *Crit. Rev. Immunol.* 18:237-254.
- Beate C., Sydora B.D., Janison R. A. and Kroenberg M. (1996). Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Respond to Systemic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *Cellular Immunology* 167:161-169.
- Bissnacht J., Ernst P.B. and Underdown B.J. (1987). The gastrointestinal tract as an immunological organ: State of the art. *Annals of Allergy* 59 (part II):17-20.
- Brudzinska P., Halarewicz T.S., Kost K., Kraciak P., Kwiat D., Rogum T.O., Scott H. and Solid L.M. (1989). Immunology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97:1562-1584.
- Brudzinska P. (1995). Mucosal Immunology. A long way to the surface. *The Immunologist* 3(3):75-77.
- Cerf-Bennusson N. and Guy-Grand D. (1991). Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 20:549-576.
- Christ A.D. and Blumberg R.S. (1997). The intestinal epithelial cell: Immunological aspects. Springer Science. *Immunopathology* 18:449-461.
- Ciu R.M., Ciolek R. and Ross D. (1979). Gut associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) of the small intestine. *Am. J. Vet. Res.* 40:1720-1728.
- Ebert R.C. (1989). Proliferative responses of human intraepithelial lymphocytes to various T-cell stimuli. *Gastroenterology* 97:1372-1381.
- Ferguson A. (1978). Lymphocytes and cell mediated immunity in the small intestine. *Adv. Med.* 14:278-293.
- Flexner J.F. (1983). Natural cytotoxicity responsiveness to interference and morphology of intraepithelial lymphocytes from the small intestine of the rat. *Immunology* 48:733-741.
- Fujishashi K., Taguchi T., McGhee J.R., Eldrige J.H., Bruce M.G., Green D.R., Singh B. and Kiyono H. (1990). Regulatory function for murine intraepithelial lymphocyte T cells abrogate oral tolerance. *J. Immunol.* 145(7):2010-2019.
- Fujishashi K., Kawanishi M., Kiyono H., VanCott J.L., van Ginkel P.W., Yamamoto M. and McGhee J.R. (1997). A T cell/IEL cell/epithelial cell contact for mucosal inflammation and immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 18:477-494.
- Guy-Grand D., Cerf-Bennusson N. and Vassalli J.D. (1986). The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell: nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J. Exp. Med.* 168:1661-1677.
- Guy-Grand D., Cerf-Bennusson N., Malissen B., Malassis-Seris M., Briotet C. and Vassalli P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 173:471-481.
- Hamad H. and Klein J.R. (1994). Phenotypic and functional heterogeneity of murine intraepithelial lymphocytes defined by cell density: implications for route of differentiation and responsiveness to proliferation induction. *Immunology* 82:611-616.
- Hammerberg C. and Schurig G. (1986). Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11:107-121.
- Hasty S. (1988). Dietary antigens: Uptake and humoral immunity in man. *Alim. Sci. Suppl.* 13:5-9.
- Jerry A., Cerf-Bennusson N., Brousse N., Selz F. and 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.
- Kiyono H., Bissnacht J., McGhee J.R. and Ernst P.B. (1992). The mucosal immune system: Features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunisation and vaccine development. *Reg. Immunol.* 4:34-62.

- 158
- Lefrançois L. (1991). Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol.* 147:1746-1751.
- Lefrançois L., Fuller S., Hales J.W., Olson S. and Puddington L. (1997). On the front lines: Intraepithelial lymphocytes as primary effectors of intestinal immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 18:463-475.
- Marsh M.N. (1960). Studies of intestinal lymphoid tissue. III. Quantitative analysis of epithelial lymphocytes in the small intestine of human control subjects and of patients with celiac sprue. *Gastroenterology* 39:481-492.
- McClain J.R., Muench J., Derubeau M.T., Eldrige J.H., Hirasawa M. and Kiyono H. (1992). The mucosal immune system: From fundamental concept to vaccine development. *Vaccine* 10:73-88.
- McClain J.R. and Kiyono H. (1993). New perspectives in vaccine development: Mucosal immunity to infection. *Infectious Agents and Disease* 2:55-73.
- Mega J., McClain J.R. and Kiyono H. (1992). Cytokine and Ig producing cells in mucosal effector tissues: analysis of IL-5 and IFN-gamma producing T cells. T cell receptor expression and IgA plasma cells from mouse salivary gland-associated tissue. *J Immunol.* 148:2030-2039.
- McGeal R. and MacDonald A.J. (1990). Immunological and inflammatory responses in the small intestine associated with helminthic infections. In: *Immunity and pathology*. J.M. Bekish, Ed. (Thyler and Francis, UK), pp249-281.
- Olivier M., Berthoin F. and Salzman H. (1994). Immunohistochemical localization in the lamina of swine of the cellular and humoral components of the immune response. *Vir-Res.* 32(1): 57-65.
- Pabel R. (1967). The anatomical basis for the immune function of the gut. *Acta. Otolaryng. Scand.* 75(2):135-144.
- Pabel R. and Rothkötter H.J. (1995). Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72:167-173.
- Parron D.M.V. (1987). The structure and organization of lymphoid tissue in the gut. In: *Food allergy and intolerance*. J. Brostoff and S.J. Challacombe Eds. (Baillière Tindall, W.B. Saunders, UK), pp 3-6.
- Pescovitz M.D., Lammey J.K. and Sachs D.H. (1964). Preparation and characterization of mucosal antibodies reactive with porcine PBL. *J. Immunol.* 133:568-575.
- Sanchez-García F.J., Aller W.W. and McCormack W.T. (1997). Impaired calcium mobilization and differential tyrosine phosphorylation in intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunology* 91:81-87.
- Stokes C.R., Southill J.F. and Turner M.W. (1975). Immune exclusion is a function of IgA. *Nature (London)* 255:745-746.
- Stokes C.R. (1968). Immune systems in the porcine pig. The pig veterinary society proceedings 20:19-30.
- Stokes C.R., Bailey M. and Wilson A.D. (1994). Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43:147-160.
- Tagliamonte A., Laine W., Soldatoschi D. and Boranchi D. (1981). Natural killer activity of pig mucosal lymphoid cells in mice. *Eur. J. Immunol.* 11:919-922.
- Tambleson M.E. (1966). Preface. In: *Swine in biomedical research. Proceedings of a Conference on swine in biomedical research*, June 17-20, 1965, University of Missouri, USA (New York:Plenum Press), pg v.
- Van Kerkhove C., Russell G.J., Donach K., Balch K., Eban A.K., Durbinson H. and Erasmus R.B. (1992). Ontogeny of human intestinal intraepithelial T cells. *J. Exp. Med.* 175:57-63.
- Vega-López M.A., Tolamo E., Bailey M., Stevens K. and Stokes C.R. (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37:49-60.
- Vega-López M.A., Bailey M., Tolamo E. and 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.
- Vianey J. and McDonald T.T. (1990). Selective death of T-cell receptor γ/δ -intraepithelial lymphocytes by apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 20(12):2899-2912.
- Walker W.A. (1967). Pathophysiology of intestinal uptake and absorption of antigens in food allergy. *Annals of allergy* 59:7-16.
- Wherry M.T., Zerkover A., Coates F.L. and Ferguson F.G. (1995). Age-related differences in subset composition and activation responses of intestinal intraepithelial and mesenteric lymph-node lymphocytes from neonatal swine. *Cellular Immunology* 163: 215-221.
- Wilson A.D., Stokes C.R. and Bourne F.J. (1986a). Responses of intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses. *Immunology* 58:621-625.
- Wilson A.D., Stokes C.R. and Bourne F.J. (1986b). Morphology and functional characteristics of isolated porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology* 59:109-113.