



122
201

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE ALGUNOS ANTIGENOS BACTERIANOS
SOBRE LA INMUNOCOMPETENCIA DE
RATONES CD1.

FALLA DE ORIGEN



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
FRANCISCO RAUL RIVERA GUZMAN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION.....	3
CAPITULO 1. ANTECEDENTES.....	10
1.1. EL SINDROME DEL DESGASTE FISICO O RUNT DISEASE.....	11
1.2. EFECTO DE LOS PRODUCTOS BACTERIANOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.....	19
1.2.1. ANTIGENO COMUN DE LAS ENTEROBACTERIAS.....	25
1.3. TRANSLOCALIZACION.....	31
1.4. REACCION LOCAL INJERTO CONTRA HOSPEDERO EN GANGLIO POPLITEO.....	35
1.4.1. FISILOGIA DE LA REACCION LOCAL INJERTO CONTRA HOSPEDERO EN GANGLIO POPLITEO.....	36
1.5. CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS.....	38
OBJETIVO.....	41
CAPITULO 2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	44
2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45

2.2. MATERIAL	
2.2.1. ANIMALES.....	46
2.2.2. CEPAS.....	46
2.3. METODOLOGIA	
2.3.1. PREPARACION DE LA SUSPENSION DE S. aureus INACTIVADO.....	47
2.3.2. EXTRACCION DEL ECA.....	47
2.3.3. INOCULACION DE LOS RATONES CD1.....	49
2.3.4. EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS.....	50
2.3.5. EVALUACION DE LA FUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS T POR MEDIO DE LA REACCION INJERTO CONTRA HOSPEDERO	51
2.3.6. ANALISIS ESTADISTICO.....	53
CAPITULO 3. RESULTADOS.....	54
3.1. CRECIMIENTO DE LOS RATONES CD1.....	55
3.2. RESPUESTA DE ANTICUERPOS.....	59

3.3. FUNCIONALIDAD DE LOS LINFOCITOS T. REACCION LOCAL INJERTO CONTRA HOSPEDERO	63
3.4. PESO DEL TEJIDO ESLENICO.....	70
CAPITULO 4. DISCUSION DE RESULTADOS.....	73
CAPITULO 5. CONCLUSION.....	83
RESUMEN.....	87
BIBLIOGRAFIA.....	91

INTRODUCCION

En los organismos vertebrados, la adecuada absorción de los lipopolisacáridos (LPS) de las enterobacterias o de sus residuos metabólicos y la capacidad que tienen estas sustancias para estimular el sistema inmunológico, son dos eventos que contribuyen a mantener la salud del cuerpo y que además aseguran la continuidad del comensalismo (1). La respuesta del tejido linfoide resulta importante para neutralizar los efectos tóxicos que tienen algunos productos de las bacterias Gram negativas. Por otra parte, los LPS actúan como un mecanismo estimulante de las células inmunocompetentes que así mantienen una modulación continua de sus funciones (2).

Las interacciones entre las endotoxinas y el sistema inmunológico se llevan a cabo normalmente dentro de un estrecho margen de seguridad. Una disminución en la inmunocompetencia facilita las infecciones por bacterias Gram negativas oportunistas (3) y la estimulación endotóxica exagerada puede provocar la atrofia del tejido linfoide (4). Este delicado equilibrio se apoya en la existencia de eficientes mecanismos destoxicantes de los LPS, además de una compleja red de mediadores liberados por

los linfocitos y macrófagos después de recibir el estímulo de la endotoxina (3,6,7,8,9).

Diferentes circunstancias pueden alterar las interacciones endotoxina-sistema inmunitario que influyen tanto en la inmunocompetencia del animal vertebrado, como en la expresión del potencial patogénico de las bacterias Gram negativas comensales. Así por ejemplo, en las últimas décadas, ha ocurrido un aumento significativo de las infecciones "endógenas" por microorganismos oportunistas en personas inmunodeficientes o debilitadas por infecciones crónicas (10). También ha sido demostrado que en algunas situaciones clínicas puede ocurrir una diseminación o translocalización de las enterobacterias, desde el tubo digestivo hacia los ganglios mesentéricos y otros tejidos de la cavidad abdominal.

La translocalización de bacterias puede complicar la convalecencia después de intervenciones quirúrgicas, el desarrollo del cáncer (11,12), el tratamiento con medicamentos inmunosupresores (3,10), diversos grados de desnutrición (10), el envejecimiento (10) y numerosos cuadros clínicos más que tienen como común denominador el

compromiso parcial y/o transitorio de la competencia inmunológica. Por otra parte, también se ha observado, que el uso y el abuso de los antibióticos administrados por vía oral, no sólo reducen la flora normal bacteriana, sino que además, deprimen la producción de anticuerpos específicos provenientes de la lámina propia, disminuyen la concentración sérica de inmunoglobulinas y abaten la actividad de la médula ósea (13). Por otra parte, la ausencia de la flora bacteriana que habitualmente coloniza el intestino provoca una marcada inmadurez del tejido linfoide asociado, como lo demuestran las observaciones histológicas de los animales libres de gérmenes (14). Finalmente, como una prueba más de la relación entre los microorganismos comensales y la patología de las inmunodeficiencias, se ha reportado que algunas de las principales manifestaciones clínicas provocadas experimentalmente cuando se lesionan o se extirpan los órganos linfoides primarios, pueden ser abrogadas si se administran antibióticos, que impiden la diseminación de las enterobacterias intestinales (15,16).

Todas las evidencias mencionadas anteriormente han sido consideradas como indicadoras de la importancia que

tienen las interacciones entre las bacterias y el sistema inmunitario, tanto en el mantenimiento de la salud del organismo, como en la patogenicidad oportunista de diversos microorganismos que pueden complicar algunas enfermedades primarias comunes. El número de niños que actualmente tienen una desnutrición grave, el número de personas que alcanzan una edad avanzada y el número de pacientes que reciben antibióticos por vía oral o medicamentos inmunosupresores por vía sistémica, puede tomarse como una medida de la frecuencia con la cual se pueden presentar las alteraciones en la relación entre las bacterias comensales y el sistema inmunológico (10). Por esta razón, en los últimos años ha ocurrido un aumento considerable en las investigaciones sobre este tema (2,5,12,15).

Dado que los productos bacterianos pueden tener tanto efectos tóxicos como benéficos, existe por consiguiente una dualidad de intereses. Por una parte, se ha tratado de purificar los productos bacterianos que tienen una actividad de adyuvantes o estimulantes de la competencia inmunológica, para utilizarlos en el tratamiento de enfermos con cáncer o de personas inmunocomprometidas por diferentes causas (17), y por la otra, se ha estudiado la

forma de inducir la profilaxis o combatir la toxicidad del material antigénico que contienen las bacterias comensales que pueden actuar como patógenos oportunistas en las personas inmunosuprimidas (18,19,20,21).

El área que cubren los intereses de los diferentes grupos de investigadores resulta sumamente extensa. De las bacterias, por ejemplo, se han obtenido numerosas sustancias y en los laboratorios se han sintetizado diversos análogos de las mismas, que se han probado y se continúan ensayando con propósitos terapéuticos (17,18,21,22). Pero además, otras investigaciones han desarrollado modelos experimentales, en animales de laboratorio, que no solo han permitido conocer los mecanismos por los cuales los productos bacterianos deprimen o estimulan la competencia inmunológica, sino que también han servido para probar la efectividad de numerosas sustancias propuestas para mejorar la función inmunitaria en el curso de varias enfermedades primarias (8,17,21).

Algunos de esos productos bacterianos son los restos celulares del S. aureus, que han servido para inducir inmunodeficiencias secundarias en animales recién nacidos.

En estos casos, los modelos experimentales proporcionaron resultados que revelan la importancia de algunos episodios infecciosos como responsables de inmunodeficiencias adquiridas en las cuales se encontró un perfil heterogéneo de alteraciones inmunológicas (23,24). Otro producto bacteriano, relativamente poco estudiado (25,26,27), es un hapteno localizado en la pared celular de casi todas las bacterias Gram negativas, conocido como antígeno común de las enterobacterias o ECA (28,29), por lo que se decidió investigar si el ECA provocaba las alteraciones inmunológicas clásicas del síndrome del desgaste.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1. EL SINDROME DEL DESGASTE FISICO O RUNT DISEASE

Una de las demostraciones del poder de la respuesta inmunológica, es la reacción de las células de tejido linfoide competente contra los tejidos del receptor del trasplante. Las células inmunocompetentes transferidas a receptores semialogénicos o alogénicos, que por alguna razón son incapaces de rechazar las células transplantadas, producen graves daños en el aparato linfoide del animal receptor, los cuales pueden llegar a una completa destrucción del sistema inmunitario del animal transplantado y llevarlo a la muerte (30).

Entre las formas más conocidas de las reacciones injerto contra hospedero se encuentran los siguientes modelos experimentales:

1) El síndrome del desgaste, es aquel en el cual un animal inmunológicamente inmaduro recibe un trasplante intraperitoneal de células linfoides competentes de un adulto histoincompatible,

2) La enfermedad secundaria, que se origina en animales previamente irradiados pero que han sido

reconstituidos con células germinales hematopoyéticas de donadores alogénicos o xenogénicos,

3) La intoxicación parabiótica, producida al cruzar sangre periférica en repetidas ocasiones entre individuos inmunológicamente competentes pero antigénicamente distintos y,

4) La enfermedad del híbrido F_1 , inducida por la inyección de células linfoides parentales en un animal híbrido F_1 , que ha sido originado de dos cepas que difieren en el locus del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (31).

En 1957, Billingham y Brent (32) inyectaron intraperitonealmente células linfohematopoyéticas alogénicas a ratones y observaron que éstos presentaban después de 20 a 30 días: retardo en el crecimiento, así como diarrea y diversos grados de hipoplasia del sistema linfoides; además de lesiones en la piel y necrosis focal del tejido hepático (32), a este síndrome se le denominó por sus manifestaciones clínicas síndrome del desgaste o Runt disease. Para que se presente este cuadro es necesario que:

1) El injerto contenga células inmunológicamente competentes.

2) El animal receptor del trasplante debe poseer importantes antígenos de histocompatibilidad que no tiene el injerto.

3) El hospedero debe ser incapaz de establecer una reacción inmunológica efectiva contra el injerto, por lo menos el tiempo suficiente para que éste manifieste sus capacidades inmunológicas (32).

En 1962, Gowans (33) sugirió que los linfocitos pequeños eran los responsables de la enfermedad injerto contra hospedero y Medawar (1963), subsecuentemente lo postuló así (32). Pronto se descubrió una jerarquía en la potencia de la enfermedad con respecto a la fuente y contenido de linfocitos T: Las células más efectivas eran los linfocitos de sangre periférica, los linfocitos del conducto torácico, las células de nódulo linfoide y, en menor grado, las células de bazo, mientras que los timocitos y las células de la médula ósea eran relativamente no reactivos (31,32,33).

En ratones neonatos, el desarrollo del síndrome del desgaste se pudo impedir si los animales se inyectaban I.P. o I.V., con células linfoides de donadores adultos singénicos sensibilizados contra los antígenos de las células injertadas, debido a que habilitaban al hospedador con una respuesta inmunitaria competente. Los sueros homólogos antilinfocíticos, eran más efectivos para proteger a los animales y podían revertir totalmente el curso de la enfermedad ya iniciada, por lo cual se propuso que el resultado fatal del síndrome del desgaste no estaba causado por lesiones irreversibles producidas en la primera fase (33).

Por otro lado, se ha demostrado que la mortalidad debida a la administración de células linfoides, se reduce por la extirpación del bazo del hospedero, ya que la mayoría de las células injertadas se establecen en este órgano (33). Además, varios fármacos inmunosupresores (v.g. Ametopterina) son efectivos para prevenir el desarrollo del síndrome del desgaste, lo mismo que el pretratamiento de los donadores con agentes inmunosupresores. El suero antilinfocítico es altamente efectivo a éste respecto (33).

El síndrome del desgaste, se ha utilizado como un ensayo de laboratorio para estudiar las diferencias entre dos poblaciones de células linfoides (33), también como una prueba que permite medir la competencia de los linfocitos T de animales donadores sometidos a diferentes condiciones experimentales (34).

Existen otros medios que pueden inducir un síndrome desgastante, de manifestaciones clínicas similares al cuadro clásico, que se conoce como síndrome similar al desgaste (Runt disease-like). Algunos métodos que lo originan son:

- a) Mediante la inyección de acetato de cortisol, testosterona o estrógenos.
- b) Practicando una timectomía neonatal.
- c) Provocando una infección neonatal con ciertos virus, como el del poliovirus y el de la linfocoriomeningitis (LCM).
- d) Por la administración de suero antilinfocítico heterólogo.
- e) Mediante la inyección intraperitoneal de suspensiones de Staphylococcus o Streptococcus del

grupo A muertos (23,33,35).

En cualquiera de los casos anteriormente mencionados para la inducción del síndrome semejante al desgaste, se han podido mitigar los síntomas, o no presentarse, cuando se realiza en ratones libres de gérmenes o cuando se les administra antibiótico (15,16,36).

Por el contrario, el síndrome clásico del desgaste si se presenta en ratones libres de gérmenes (16).

El síndrome similar al desgaste puede ser producido en las cepas de ratones CF-1 e ICR por bacterias Gram positivas (S. aureus, Streptococcus sp, Bacillus subtilis), Gram negativas (E. coli), Micobacterias (M. tuberculosis), el sistema S. aureus-anti S. aureus, extractos de la pared celular de S. aureus, una fracción de pared celular separada con sulfato de amonio de S. aureus y los polisacáridos de Streptococcus de los grupos A, B, E y F.

Después de la administración de los productos bacterianos, se observa una atrofia de timo y bazo; además,

se ha encontrado una disminución en el número de linfocitos y un aumento de los polimorfonucleares (PMN), pero no hay variación en los monocitos. Cabe mencionar que ocurre un aumento en los niveles de IgM que es algo característico del síndrome del desgaste (31).

La respuesta humoral contra los eritrocitos de carnero (GRC) está muy deprimida, sin embargo la respuesta celular, medida por el tiempo que tarda el rechazo de injerto de piel, no está alterada (23).

Eksted y col. (23) no encontraron diferencias entre la producción del síndrome semejante al desgaste en grupos de animales que habían sido tratados con tetraciclina y los que no lo fueron, mientras que en otros trabajos (36) el uso de antibióticos, disminuye la gravedad de los síntomas del cuadro.

La edad de los ratones en el momento de la primera inoculación de los productos bacterianos, es de gran importancia para la inducción del síndrome semejante al desgaste. La mayoría de los animales inyectados dentro de las primeras dos horas después del nacimiento (no sobrepasa

el 80%), presentan todos los síntomas de la enfermedad experimental (sin discriminación de sexos), pero la incidencia de las manifestaciones decrece cuando la primera inyección se aplica después de varias horas de nacidos (24).

Es posible que los síntomas que se presentan en los animales después de inyectarles las bacterias muertas o los productos bacterianos, tengan el mismo origen de aquellos que se obtienen en el síndrome del desgaste por la reacción injerto contra hospedero o por practicarles una timectomía, ya que se ha observado que en las infecciones endógenas o en la liberación de endotoxinas hacia los tejidos del animal se puede producir un resultado similar (23).

La endotoxina o lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas, también induce el síndrome del desgaste en ratones recién nacidos (16). Se ha propuesto, que los microorganismos comensales actúan sinérgicamente para reafirmar los efectos patológicos de la endotoxina. Cuando ésta se administra, se observa un sobrecrecimiento de la flora intestinal debido, posiblemente, a un efecto

inmunosupresor de la endotoxina a nivel de producción de IgA de secreción en el intestino (16).

Existen muchas similitudes histológicas en animales con el síndrome desgastante producido por bacterias y los que cursan por una reacción injerto contra hospedero. La ausencia de un resultado fatal en ratones libres de gérmenes sometidos a una reacción injerto contra hospedero o que se les ha practicado una timectomía, refuerza la importancia de la endotoxemia en estos síndromes. Según algunos autores, los LPS pueden influenciar la evolución de la senescencia del sistema inmunitario y aumentar la susceptibilidad a enfermedades y cáncer. (15)

1.2. EFECTO DE LOS PRODUCTOS BACTERIANOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO:

La membrana externa de las bacterias Gram negativas, es una bicapa lipídica asimétrica que contiene a los LPS, fosfolípidos y proteínas (37,38). Esta membrana tiene un papel importante en la resistencia de las bacterias cuando interaccionan con los factores defensivos del hospedador y con los antibióticos (39). El LPS está ligado a la parte

superior de la membrana externa bacteriana. Consiste de una región hidrofóbica conocida como lípido A, enlazada al oligosacárido central (core) y a la cadena O específica (40,41) (Figura 1).

El lípido A purificado reproduce los síntomas del choque séptico causado por bacterias Gram negativas en humanos, por lo tanto, es el responsable de la toxicidad de los LPS (22). Estos últimos interactúan con los componentes celulares y humorales del sistema inmunitario e inducen la producción y secreción de las citocinas que son los verdaderos responsables de las manifestaciones tóxicas de las endotoxinas (5,9,42).

Las endotoxinas bacterianas (LPS) tienen efectos biológicos tanto benéficos como tóxicos en los animales susceptibles, ya que se ha demostrado que son potentes inmunógenos T independientes (9,40), estimuladores de ciertas subpoblaciones de células T (43); son potentes activadores policlonales de los linfocitos B (18,22) y pueden actuar como inmunomoduladores de la respuesta inmunológica hacia otros antígenos (9); estimulan la hematopoyesis y la adherencia de PMN (19,44), por lo tanto,

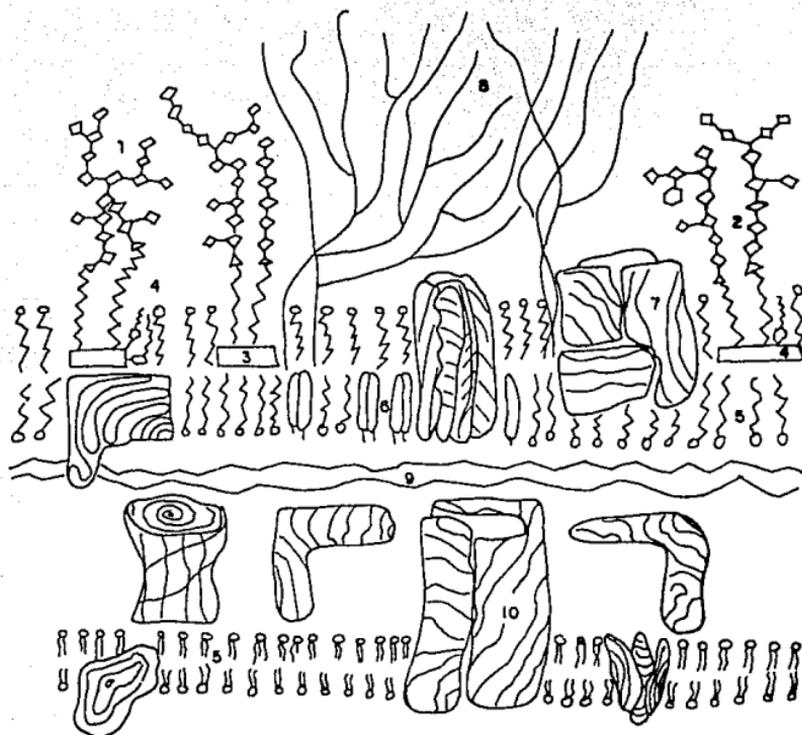


FIGURA 1: MICROESTRUCTURA DE LA PARED Y MEMBRANA CELULAR DE LAS ENTEROBACTERIAS. SE MUESTRA AL ECA EN SU FORMA INMUNOGENICA.

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1) CADENAS O ESPECIFICAS | 2) LIPOPOLISACARIDO (LPS) |
| 3) LIPIDO A | 4) ECA EN SU FORMA INMUNOGENICA. |
| 5) FOSFOLIPIDOS | 6) LIPOPROTEINAS |
| 7) PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA | 8) POLISACARIDO CAPSULAR |
| 9) PEPTIDOGLICANO | 10) PROTEINAS DE MEMBRANA PLASMATICA |

aumentan inespecíficamente la resistencia a infecciones ; estimulan la actividad antitumoral de los fagocitos (8,9) así como la expresión de los productos del MHC sobre la membrana de las células (5,9).

Las endotoxinas son inmunógenos inductores de la síntesis de Igm, con fluctuaciones cíclicas debidas a los mecanismos de retroalimentación mediados por los anticuerpos (41). Son metabolizados lentamente y permanecen en los tejidos y en los macrófagos conservando sus propiedades inmunogénicas (45).

Los efectos nocivos más conocidos de las endotoxinas son el daño celular directo al endotelio, fiebre, activación de la cascada de la coagulación, activación del sistema del complemento, hipotensión, hipoglicemia, granulocitopenia, trombocitopenia, espasmo arterial, anoxia, acidosis láctica, edema, degranulación de células cebadas, activación de la vía hexosa monofosfato, inhibición de la quimiotaxis, generación y liberación de radicales del ión superóxido, liberación de enzimas hidrolíticas, activación de la cascada del ácido araquidónico con producción de prostaglandinas, tromboxanos

y leucotrienos; coagulación intravascular diseminada, agregación de plaquetas, contracción de músculo liso, necrosis de piel, sangrado intestinal, choque y muerte (5,6,7,8,9,19,41,46,47).

Se ha demostrado que la mayoría de los efectos anteriores no son producidos directamente por los LPS, sino más bien se deben a la liberación de citocinas por los macrófagos (5,9).

También se ha visto que algunos componentes de las bacterias Gram positivas tienen efectos similares sobre el sistema inmunitario.

El peptidoglicano o mureína es un componente común de todas las paredes celulares en las eubacterias, principalmente las Gram positivas, que interactúa con el sistema del complemento activándolo e induciendo algunos síntomas de la enfermedad bacteriana (48,49). Es un activador policlinal de linfocitos T y B (50) y un inmunógeno potente. Sus subunidades (mureína dipéptido, pentapéptidos, pentaglicinas) son pirogénicas, producen lesiones inflamatorias en la piel, son inhibidoras de

liberación de cininas y de la quimiotaxis de PMN; tienen actividad de inmunoestimulantes, activan macrófagos y aumentan la resistencia inespecífica a infecciones (48).

La bacteria Gram positiva Staphylococcus aureus presenta, además del peptidoglicano, otras sustancias con propiedades biológicas: los ácidos teicoicos, la proteína A, enzimas extracelulares y toxinas.

Los ácidos teicoicos son moderados activadores policlonales de linfocitos T y B . Además aumentan la quimiotaxis de PMN mediada por complemento (50).

La proteína A es un mitógeno no específico de linfocitos T y B (51), que puede activar el sistema del complemento y aumentar la quimiotaxis de PMN (49), aunque interfiere junto con la cápsula de polisacáridos, con la fagocitosis y opsonización (48).

Existen otros inmunoestimulantes específicos de origen bacteriano como el PPD, lipoproteína de bacterias Gram negativas, proteína asociada al lípido A, mitógeno de la pared celular de Listeria, mitógeno de Nocardia y otros (48).

1.2.1 ANTIGENO COMUN DE LAS ENTEROBACTERIAS (ECA)

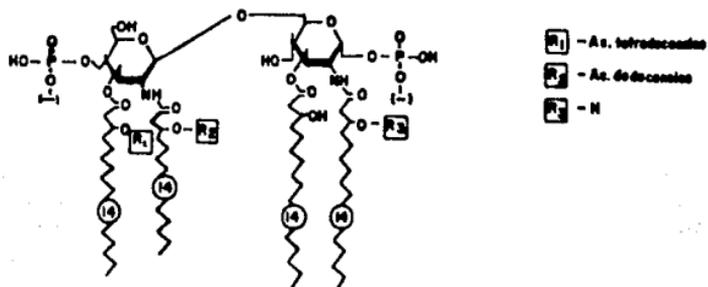
El antígeno común de las enterobacterias (ECA), es uno más de los componentes de la pared celular de las bacterias Gram negativas (29). Es un glicolípido producido por todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Se trata de una molécula anfipática cargada negativamente con una cadena hidrofílica de aminoazúcares y una porción hidrofóbica compuesta por el ácido L-glicerofosfatídico (52,53). La porción carbohidrato es un heteropolisacárido lineal, compuesto de N-acetil-D glucosamina (GlcNAc), ácido N-acetil D-manosaminurónico (ManNAcUA) y 4-acetamido-4,6-didesoxi D-galactosa (Fuc4NAc) (54,55) (Figura 2).

Estos azúcares están unidos para formar unidades trisacáridas repetidas, teniendo la siguiente estructura:

$$\text{--3) D-Fuc4NAc-(1-4)-}\beta\text{-D-ManNAcUA-(1-4)-}\alpha\text{-D-GlcNAc-(1-4)-}$$

La estructura anterior es la responsable de la especificidad serológica del ECA, mientras que la porción lipídica une al ECA a los LPS de la membrana externa (56).

1



2

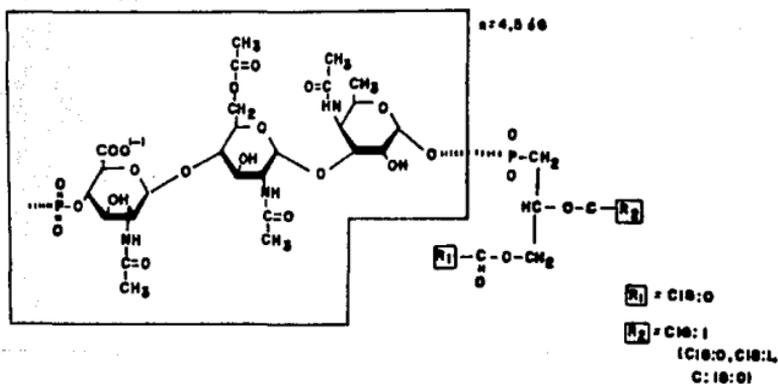


FIGURA 2 ESTRUCTURA QUIMICA PROPUESTA PARA EL LIPIDO A DE *E. coli* (1)

ESTRUCTURA QUIMICA PROPUESTA PARA EL GLICOLIPIDO ECA (2)

El ECA está presente en dos formas: la hapténica y la inmunogénica. La forma inmunogénica se une covalentemente a la región central del LPS (core) de sólo algunas mutantes rugosas, que poseen un core R1 ó R4 completo pero que carecen de la cadena O específica. La forma hapténica o libre no se une covalentemente al LPS, se encuentra presente en cepas rugosas y lisas incluyendo aquellas que poseen la forma inmunogénica. Todas las enterobacterias sintetizan la forma hapténica del ECA, que consiste de la cadena del heteropolisacárido unido por un enlace fosfodiéster al residuo L-glicerofosfatidil de la porción lipídica (54).

El ECA es termoestable, varía su grado de polimerización desde un peso molecular de 10,000 hasta 35,000 D, así como también la formación de agregados (inmunogenicidad), y su solubilidad en agua (56). Es capaz de adherirse a membranas celulares y a macromoléculas, para formar co-micelas con sustancias anfófilicas o lipofílicas, así como a residuos celulares. Esta facultad se inhibe por su interacción con polimixina B, suero normal de conejo, LPS, lipido A, cardiolipina, proteína α -1 ,

lipoides y surfactantes. Su capacidad de sensibilizar eritrocitos se inhibe por hidrólisis alcalina o tratamiento con fosfolipasa A (28).

Estas propiedades del ECA se han aprovechado para ligarlo a células u otros soportes y así inducir una buena respuesta humoral (28).

Debido a que el ECA no se encuentra totalmente expuesto en la superficie bacteriana (26,27), los anticuerpos de clase IgM que se producen contra éste, no son capaces de aglutinar a las bacterias que los contienen.

Se han observado algunos efectos biológicos del ECA en animales y en el hombre. Produce fiebre en conejos a una concentración entre 250 y 500 μg , pero no tiene toxicidad aún a dosis de 1,000 μg . Se cree que la pirogenicidad se debe al LPS contaminante en la muestra (28).

Algunos autores han informado que se puede inducir una tolerancia inmunológica hacia el ECA cuando se inyectan dosis de 1 a 10 μg (25). También se cree que pueda ser un

factor de virulencia porque las cepas patógenas contienen mayor cantidad del hapteno que las no-patógenas (29). Pero en este sentido se han encontrado resultados contradictorios, ya que otros investigadores han informado lo contrario (28).

Por otra parte, el ECA muestra actividad de activador policlonal de linfocitos B ó de células de bazo (25,26,27,28) y también actúa como inmunoestimulante de reacciones de hipersensibilidad tardía provocadas experimentalmente en cobayos (57).

En animales y humanos, los títulos normales de anticuerpos anti-ECA son muy bajos, sin embargo, éstos se elevan considerablemente, junto con los específicos antiserotipo O, en las Shigellosis, peritonitis é infecciones crónicas del tracto urinario causadas por bacterias Gram negativas (28).

No se han obtenido resultados satisfactorios cuando el ECA se ha utilizado como vacuna para provocar la protección contra el reto con bacterias patógenas. Tampoco se ha obtenido una protección completa con suero anti-ECA (28).

Se han encontrado similitudes antigénicas entre el ECA y los componentes de varios tejidos del hospedero, como el hígado, el colon, el bazo y el riñón. Se ha propuesto que ésta es la causa de la baja respuesta inmunológica hacia el ECA. Estas reacciones cruzadas pueden jugar un papel importante en la etiología de algunas enfermedades, tales como las reacciones autoinmunes en la colitis ulcerosa (28).

Existen 3 loci en donde se encuentra codificada la información genética necesaria para la síntesis de las enzimas que participan en la biosíntesis del ECA, dos de ellos, el rfe y rff localizados en Salmonella al minuto 83 y en Escherichia al minuto 85 de sus respectivos cromosomas. El tercero es el rfb que se encuentra sólo en algunos serotipos de Salmonella. En algunas bacterias se requieren los genes rfe para la síntesis de las enzimas que ligan los azúcares del ECA y del polisacárido O (58).

Otros antígenos "comunes" de las bacterias Gram negativas son el glicolípido Re de mutantes rugosas, el

lipido A , algunas proteínas y lipoproteínas de membrana externa, el antígeno C, etc. (28).

La presencia constante del ECA, en la pared celular de todas las bacterias Gram negativas ha estimulado el desarrollo de métodos para el diagnóstico oportuno de enfermedades infecciosas causadas por estos microorganismos. Además, se ha intentado inducir una buena profilaxis contra ellas mediante el uso del ECA como vacuna, pero los resultados no han sido satisfactorios (28,29).

1.3 TRANSLOCALIZACION

La translocalización es el paso de bacterias viables, generalmente Gram negativos, desde el tracto intestinal hacia los ganglios mesentéricos y otros órganos de la cavidad abdominal (3,10). La translocalización puede deberse a una disfunción del tejido linfoide asociado al tubo digestivo (10,59).

Probablemente, un grado moderado de translocalización es un proceso normal y esencial de regulación de la inmunidad, tanto local como sistémica, debido a que las células presentadoras de antígeno y las células inmunitarias presentes en el tejido linfóide asociado al intestino (ganglios principalmente), una vez activadas, migran al conducto torácico, participan en la inmunidad sistémica, y regresan hacia la mucosa intestinal (60).

La translocalización es un evento rápido, que se ve aumentado por factores que deterioran las defensas específicas e inespecíficas del hospedero.

Se ha propuesto, que los fagocitos ingieren a las bacterias y las transportan fuera del intestino, sin llevar a cabo eficientemente la destrucción intracelular; de este modo, se liberan las bacterias viables en diversos sitios extraintestinales (10).

Existen varios factores más que facilitan los fenómenos de la translocalización bacteriana como son:

La administración de antibióticos ya que éstos eliminan ciertos grupos de bacterias sin afectar a otros (10,61). Además, los antibióticos modifican la composición de la película mucosa, la histología de el epitelio intestinal, la concentración de los metabolitos de ácidos grasos y sales biliares, así como el pH (10).

La diseminación de las enterobacterias, también puede estar facilitada en los animales neonatos. Esto puede deberse al desarrollo insuficiente de la barrera intestinal o a la inmadurez del tejido linfoide asociado al tubo digestivo. En los humanos, la meningitis neonatal por Escherichia coli, puede relacionarse, con los mecanismos que participan en la translocalización observada en ratones recién nacidos (10).

En animales sometidos a un ayuno o desnutridos experimentalmente, la translocalización también se asocia a cambios histológicos del intestino delgado.

Otros factores que promueven la translocalización son las quemaduras, traumas, deshidratación, inflamación intestinal, estado diabético y choque hemorrágico (10).

Aparentemente, el sobrecrecimiento de la flora intestinal, es el principal promotor de la translocalización (10) pero no todos están de acuerdo con esto (62).

También las disfunciones inmunológicas son factores que contribuyen a la translocalización (12). El fenómeno se ha estudiado en ratones inmunosuprimidos por diferentes causas (3,10). Las deficiencias inmunitarias asociadas con el crecimiento progresivo de un tumor, también aumentan o facilitan el grado de translocalización (11).

En el síndrome semejante al desgaste la translocalización puede ser un factor determinante que aumente la gravedad de la enfermedad, tanto por la invasión bacteriana de los tejidos normalmente estériles, como por la liberación de sus componentes e interacción con las células inmunitarias ya de por sí deterioradas (63).

1.4 REACCION LOCAL INJERTO CONTRA HOSPEDERO EN GANGLIO POPLITEO

La reacción local injerto contra hospedero en ganglio poplíteo (30), es un fenómeno biológico experimental que tiene la ventaja de presentarse in vivo, en un ambiente fisiológico controlado donde existe poca variación y que se utiliza para estudiar los principales mecanismos celulares involucrados en el control de la respuesta inmune hacia antígenos extraños, aloantígenos y autoantígenos, pudiéndose comparar las actividades de reconocimiento y rechazo de tejidos producidas por diferentes células donadoras.

La reacción local injerto contra hospedero se realiza con células de bazo parentales, que son inyectadas en el cojinete plantar de un animal híbrido F_1 , causando el engrandecimiento del ganglio poplíteo al cual van a drenar las células inyectadas (64).

1.4.1 FISILOGIA DE LA REACCION INJERTO CONTRA HOSPEDERO EN GANGLIO POPLITEO

La reacción local injerto contra hospedero tiene la ventaja de tener gran sensibilidad y de evitar las manifestaciones de la reacción sistémica en tejidos no linfoides (65).

La proliferación de las células del donador no es la responsable del crecimiento del ganglio linfático del hospedero. Después de una pequeña proliferación de las células del donador, la gran mayoría de las células, dentro del ganglio, son del hospedero durante toda la fase del crecimiento (30,33). La situación es curiosa, ya que en teoría, el hospedero es incapaz de montar una respuesta inmunológica contra las células del donador (30).

En experimentos in vitro, se considera que las células T cooperadoras del donador son estimuladas con células B alogénicas del hospedero, para liberar varios factores (IL-2, factores de crecimiento de células B, IFN Gamma y Beta) que favorecen la proliferación de otras células T y B, independientemente de sus antígenos codificados por el

complejo principal de histocompatibilidad (66,67). Se cree que tales factores también puedan operar in vivo lo que causaría el crecimiento del ganglio. Así, en los ganglios poplíteos que cursan por una reacción injerto contra hospedero, las células B son más numerosas que las T (normal 2 T : 1 B), lo que implica una acumulación selectiva de células B del hospedero. Además, las células T cooperadoras y las T citotóxicas-supresoras, se encuentran en una proporción de 1 : 1. (normal 2 cooperadoras : 1 citotóxica-supresora) (30).

La proliferación de células B del animal receptor del injerto, es de tipo policlonal, lo que lleva a la producción de autoanticuerpos contra la membrana basal del glomérulo, DNA é histonas (30,67). La interacción es muy específica entre los antígenos codificados por el MHC en la superficie de las células B del hospedero, y las T cooperadoras del donador. No se excluye la posible interacción T cooperador del donador con T citotóxico-supresor del hospedero (30); además de la presencia de la actividad citotóxica natural (NK) (68) o la citotoxicidad mediada por linfocinas (LAK) (67) del donador.

1.5 CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS (CFA)

Existe una gran variedad de técnicas que han sido desarrolladas para cuantificar las células secretoras de anticuerpo. En la diseñada por Jerne y col. (70) se forman placas de hemólisis localizada en gel, que son visibles en un punto de actividad que representa una célula liberadora de anticuerpos (Célula formadora de placa: PFC o Célula formadora de anticuerpos: CFA).

Para ello, una suspensión de células de bazo, tomada de un ratón inmunizado con eritrocitos de carnero, se mezcla con una suspensión de glóbulos rojos, de la misma fuente, en un medio semisólido de agarosa al 1 %. Durante la incubación a 37°C, los glóbulos rojos que están alrededor de las células de bazo secretoras de anticuerpos específicos, se recubren de éstos.

Posteriormente, al adicionar complemento, los eritrocitos recubiertos de anticuerpos son lisados debido a la activación de ésta cascada multienzimática. Se formará entonces, una zona de lisis alrededor de la célula linfoide

entonces, una zona de lisis alrededor de la célula linfoide secretora de anticuerpos, que aparecerá macroscópicamente como un aclaramiento en la película homogénea de eritrocitos.

Existen 2 modificaciones de la técnica original: la directa y la indirecta. La primera, se utiliza únicamente para la determinación de células formadoras de anticuerpo de clase IgM, mientras que la segunda, usando un anti-anticuerpo específico, es capaz de detectar las otras clases de inmunoglobulinas y otras variantes de las mismas (71).

Según una modificación a la técnica de Jerne, propuesta por Cunningham (72), los eritrocitos y las células de bazo en medio de cultivo, con amortiguador y complemento, son introducidas en una cámara plana muy delgada, a manera de formar una monocapa de células. A diferencia de la técnica original de Jerne, en esta modificación las placas pueden ser detectadas con un máximo de sensibilidad, en la monocapa, sin utilizar un medio de soporte. Esta técnica, muestra un aumento en la sensibilidad de 3 veces con respecto a la de Jerne, debido

en gran parte, a la monocapa de células que se forma; además, puede detectar hemólisis total ó parcial de los eritrocitos blanco (71).

OBJETIVO

En este trabajo se exploraron más extensamente algunas de las actividades biológicas que han sido atribuidas al S. aureus y al ECA (25,26,27). Con este propósito, se diseñó un trabajo experimental que tuvo los siguientes objetivos:

1) Comprobar el grado en que se encuentra comprometida la competencia de los linfocitos T en los animales con el síndrome del desgaste provocada por la inyección de estafilococos inactivados (23,24).

2) Estudiar si el ECA provoca o no el síndrome del desgaste cuando se administra en animales recién nacidos.

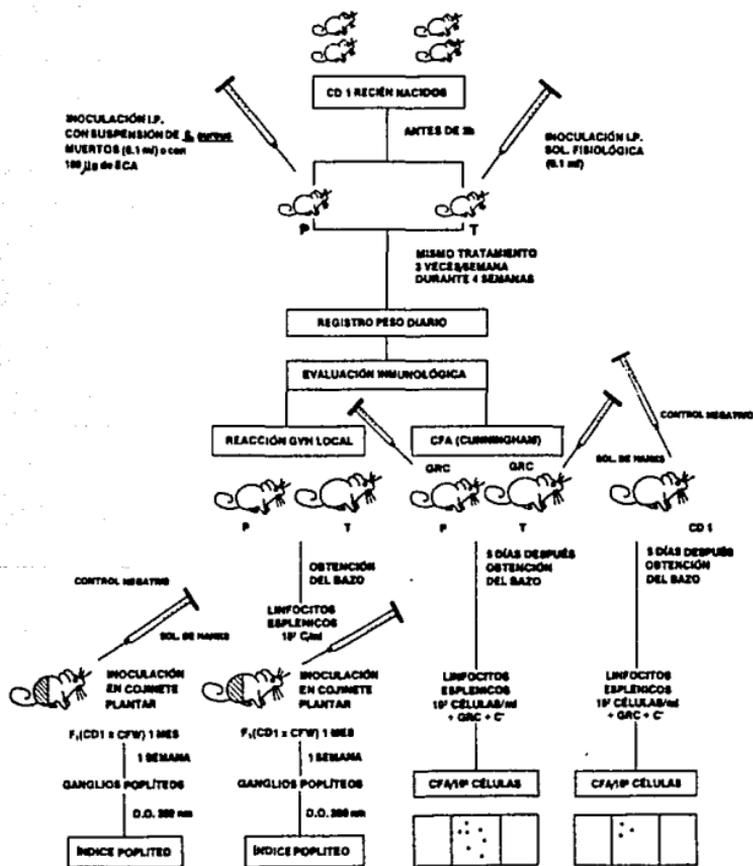
Para alcanzar los objetivos señalados, se trabajó con la cepa de ratones CD1 recién nacidos, en la cual se estudiaron los efectos biológicos que produce la inoculación i.p. del S. aureus inactivado o el ECA sobre los siguientes parámetros:

- 1) Desarrollo físico (Crecimiento ponderal)
- 2) Capacidad para sintetizar anticuerpos contra un antígeno T dependiente

- 3) **Competencia para reconocer células alogénicas en una reacción injerto contra hospedero (GVH).**

CAPITULO 2
METODOLOGIA EXPERIMENTAL

21 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR LA COMPETENCIA INMUNOLÓGICA DE RATONES CD1 INOCULADOS CON *S. aureus* ó con ECA.



2.2 MATERIAL:

2.2.1 ANIMALES.

Se trabajó con un grupo de 160 ratones CD1 recién nacidos y 105 ratones híbridos F₁ (CFW/CD1) de 1 mes de edad. Estos animales fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Química. Los ratones CD1 se colocaron en jaulas individuales por camadas, destetados a los 21 días de edad y posteriormente alimentados con nutricubos de purina y agua ad libitum. Se registró en todos los casos la hora de nacimiento de cada camada para inocularlos en el curso de las dos horas siguientes.

2.2.2 CEPAS:

Staphylococcus aureus ATCC 6538 conservada en BHI y proporcionada por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM, se tipificó bioquímicamente y cultivó a 37°C en medio BHI durante 18 h en agitación continua.

Escherichia coli O 14 conservada en TSA previamente se tipificó bioquímica y serológicamente; se cultivó en TSA a 37°C durante 18 h en matraces para la propagación de la cepa. Las células se suspendieron y cosecharon con SSI estéril. Se lavaron 3 veces por centrifugación a

2,500 rpm/30 min. Posteriormente, se resuspendieron, liofilizaron y conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

2.3 METODOLOGIA:

2.3.1 PREPARACION DE LA SUSPENSION DE Staphylococcus aureus INACTIVADO Y AJUSTADO A 5×10^7 CELULAS/ml.

Las bacterias (Staphylococcus aureus) se cosecharon y lavaron 3 veces por centrifugación a 2,500 rpm/30 min con SSI estéril. La suspensión se esterilizó en autoclave a 121°C durante 60 min. Posteriormente se ajustó la concentración con la ayuda del nefelómetro a 5×10^7 células/ml (23). Esta suspensión se repartió en alicuotas y se conservó a 4°C en tubos estériles y sin preservativos hasta el momento de usarlas. Se realizaron pruebas de esterilidad para las alicuotas mediante cultivos de las mismas en medio tioglicolato y Sabouraud.

2.3.2 EXTRACCION DEL ECA.

Para extraer el ECA, se preparó una suspensión con 10 g de Escherichia coli D 14 liofilizada, en 200 ml de agua destilada, la cual posteriormente se calentó a 100°C durante dos horas. Los cuerpos celulares se retiraron por

centrifugación a 5,000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se separó y mezcló con etanol al 95 % hasta que el alcohol tuviera una concentración final del 85 % (73).

La mezcla se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 18 h. La fracción insoluble en etanol se separó de la soluble por centrifugación a 2,500 rpm durante 30 min. La fracción soluble se pasó a un cristalizador y se deshidrató a 60°C. El material así obtenido, se raspó del cristalizador y se disolvió en agua desionizada a una concentración de 1 mg/ml. Finalmente, se esterilizó la solución por filtración en membrana de nitrocelulosa con poro de 0.22 µm.

Con la solución de ECA así obtenida, se hizo un ensayo cualitativo por inhibición de la inmunohemólisis (74) para comprobar que conservaba su antigenicidad después de la filtración. Esta reacción la realizó el Dr. Fernando García Tamayo, del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología - DIF.

2.3.3 INOCULACION DE LOS RATONES CD1:

Grupo 1: PARA LA INDUCCION DEL SINDROME DESGASTANTE
PROVOCADO POR S. aureus.

31 ratones CD1 recién nacidos recibieron por vía intraperitoneal 0.1 ml de la suspensión de S. aureus muertos por calentamiento y ajustados a 5×10^7 células/ml. La primera inoculación se practicó dentro de las 2 horas siguientes a su nacimiento (24) y, posteriormente, 3 veces a la semana durante 28 días (23).

Grupo 2: PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL ECA.

37 ratones CD1, recién nacidos, recibieron por vía intraperitoneal 100 μ g de la solución de ECA, dentro de las primeras 2 horas inmediatas a su nacimiento y, posteriormente, 3 veces por semana hasta cumplir 1 mes de edad.

CONTROLES:

Grupo 3: RATONES TESTIGO INOCULADOS CON SSI ESTÉRIL.

81 ratones CD1, recién nacidos, recibieron por vía intraperitoneal 0.1 ml de solución salina estéril, dentro

de las 2 h siguientes a su nacimiento y posteriormente, 3 veces por semana durante 28 días.

Grupo 4: ANIMALES QUE NO FUERON TRATADOS

Se incluyó un grupo de 11 animales CDI no tratados, sanos, de un mes de edad, que sirvieron para obtener las cantidades de CFA anti-GRC normales, producidas por esta cepa.

De los primeros tres grupos de animales, se llevó el registro diario de peso corporal promedio por camada y por grupo experimental.

2.3.4 EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS:

Se determinó el número de células formadoras de anticuerpo (CFA) contra un antígeno T-dependiente. Para ello, una semana después de haber recibido el último inóculo de S. aureus, ECA o SSI, los ratones CDI problema (15 del grupo 1, y 16 del grupo 2), los testigos (33 del grupo 3) y los no tratados con inóculo alguno (11 ratones del grupo 4), se inmunizaron por vía intraperitoneal con 0.25 ml de una suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRC) al 8 %. Después de 5 días, los animales se

sacrificaron y se procedió a obtener el bazo y registrar su peso; se disgregó el tejido esplénico y las células se lavaron, contaron y ajustaron a 10^7 células viables/ml.

Según la modificación de Cunningham y col. (72) a la técnica de Jerne (70), se mezclaron 200 μ l de una suspensión de células de bazo ajustadas a 10^7 células/ml., 100 μ l de GRC al 10 % y 200 μ l de suero fresco de cobayo (como fuente de complemento) diluido 1:10. Las cámaras se llenaron con 200 μ l de la mezcla y después se sellaron e incubaron a 37°C durante 30 min.

Finalmente, se contó el número de placas hemolíticas, las cuales se expresaron como CFA/ 10^6 células de bazo.

2.3.5 EVALUACION DE LA FUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS T POR MEDIO DE LA REACCION LOCAL INJERTO CONTRA HOSPEDERO:

Una semana después de haber recibido el último inóculo (de *S. aureus*, ECA o SSI), se extrajeron los bazos en condiciones de esterilidad, tanto de los ratones CDI problema (16 del grupo 1, y 21 del grupo 2), como de los testigos (48 del grupo 3) y se registró el peso de los mismos. El tejido esplénico se disgregó, se lavaron las células, y después se contaron y ajustaron a 10^7 células/ml

en solución salina amortiguada (BSS). Un volumen de 0.1 ml de las suspensiones de linfocitos esplénicos de los grupos de ratones problema y testigo, se inyectó individualmente en el cojinete plantar derecho de 3 grupos (A, B y C) de ratones híbridos F₁ (CD1/CFW) de un mes de edad. Cada animal recibió una cantidad de 1×10^6 células (34).

Los animales se sacrificaron una semana más tarde y se les extrajo el ganglio popliteo de ambas extremidades. El tejido se pesó, y posteriormente se disgregó e hidrolizó en NaOH 2 N durante 18 h a 60°C. Se leyeron las absorbancias a 280 nm. Se calcularon los índices popliteos en base a los pesos de los ganglios (I.P./peso) y al contenido de proteínas (I.P./Abs₂₈₀) de acuerdo a las siguientes relaciones matemáticas:

$$\text{I.P./peso} = \frac{\text{Peso ganglio pata inoculada}}{\text{Peso ganglio pata contralateral}} \quad (65)$$

$$\text{I.P./Abs}_{280} = \frac{\text{Abs}_{280} \text{ ganglio pata inoculada}}{\text{Abs}_{280} \text{ ganglio pata contralateral}} \quad (34)$$

Además, como un control adicional, se inocularon por la misma vía, 10 ratones híbridos F_1 (CD1/CFW) (Grupo D), sólo con solución salina balanceada para obtener un control negativo de la reacción injerto contra hospedero. Un parámetro más que se midió, fué la relación natural que guardan ambos ganglios poplíteos de los ratones híbridos F_1 (CD1/CFW). Para ello, se tomaron 10 ratones híbridos (Grupo E), de un mes de edad, y se les extrajeron ambos ganglios poplíteos comparando después los valores de los índices poplíteos entre éstos.

2.3.6 ANALISIS ESTADISTICO

Como medidas de la tendencia central se utilizaron la media aritmética y la mediana. El grado de significancia de las diferencias entre los grupos estudiados se calculó por la prueba de la varianza (F) (75).

CAPITULO 3

RESULTADOS

2.1 CRECIMIENTO DE LOS RATONES CD1.

Los ratones que se inyectaron intraperitonealmente con la suspensión de S. aureus muerto por calor, presentaron un retraso en el crecimiento. Los ratones no aumentaron de peso en la misma forma que los del grupo testigo que sólo habían recibido SSI. En la figura 3 se presenta gráficamente la secuencia en la cuál fué aumentando el peso promedio diario de estos ratones, desde su nacimiento hasta los 32 días de edad. Al final de este lapso, los ratones inyectados con S. aureus inactivado, pesaban en promedio 22 % menos que los ratones testigo como se puede observar en la tabla 1.

Los animales que presentaron el síndrome del desgaste físico e inmunológico producido por la inoculación de bacterias, no sólo tenían disminuido su tamaño (ver Fotografía 1) y peso, sino que además, mostraban las otras características clásicas de la enfermedad: debilidad generalizada, con postura encorvada y un andar de puntitas; algunos murieron antes de cumplir las 4 semanas.

EDAD (DIAS)	<u>S. aureus</u>		ECA		SSI	
	PESO PROMEDIO RATCHES CDI	DESVIACION ESTANDAR	PESO PROMEDIO RATCHES CDI	DESVIACION ESTANDAR	PESO PROMEDIO RATCHES CDI	DESVIACION ESTANDAR
01	1.7	0.1	1.8	0.1	1.7	0.1
02	2.0	0.2	2.2	0.2	2.0	0.2
03	2.4	0.3	2.4	0.1	2.3	0.3
04	2.8	0.5	3.0	0.2	2.8	0.5
05	3.2	0.7	3.5	0.2	3.1	0.5
06	3.6	0.6	4.1	0.1	3.5	0.6
07	3.8	0.6	4.5	0.2	3.9	0.7
08	4.4	0.7	4.7	0.6	4.4	0.8
09	4.9	0.9	5.0	0.6	4.7	0.8
10	5.4	0.9	5.6	0.4	5.2	0.9
11	6.1	0.9	6.2	0.1	5.7	0.9
12	6.4	0.9	6.5	0.4	6.0	0.9
13	6.8	0.9	7.1	0.1	6.4	0.9
14	7.1	0.8	7.8	0.2	6.8	0.9
15	7.4	0.7	8.1	0.1	7.1	0.9
16	7.4	0.8	8.6	0.1	7.4	0.7
17	7.8	0.8	8.9	0.1	7.8	0.7
18	7.9	0.8	9.2	0.3	8.2	0.8
19	8.1	0.8	9.6	0.3	8.5	0.7
20	8.6	0.9	10.0	0.4	9.1	0.6
21	9.2	0.9	10.8	0.1	10.0	0.8
22	9.8	0.9	11.2	0.5	10.9	0.7
23	10.4	0.9	12.0	0.5	11.7	0.8
24	11.4	0.9	13.1	0.6	12.7	0.8
25	12.4	0.7	13.7	0.4	13.7	0.8
26	12.8	0.7	14.7	0.4	14.8	0.9
27	13.4	0.8	16.0	0.7	15.8	0.8
28	14.2	0.8	16.8	0.7	16.8	0.8
29	10.9	0.9	17.7	0.5	17.8	0.9
30	15.2	0.9	18.8	0.9	18.9	0.8
31	16.0	0.8	19.9	0.9	20.0	0.7
32	16.2	0.8	20.9	0.9	20.9	0.8

TABLA 1. PESO PROMEDIO DIARIO, DESDE EL NACIMIENTO, HASTA LOS 32 DIAS DE EDAD, DE RATCHES CDI INOCULADOS CON UNA SUSPENSION DE S. aureus INACTIVADO, ECA O SSI ESTERIL. SE MUESTRA TAMBIEN LA DESVIACION ESTANDAR DE CADA UNO DE LOS GRUPOS.

Los ratones que se inyectaron intraperitonealmente con 100 μ g de ECA, tuvieron una ganancia ponderal semejante al del grupo de ratones control que sólo se inocularon con SSI estéril. En la figura 3, se presenta gráficamente la secuencia en la cual fué aumentando el peso promedio diario de estos grupos de ratones, desde su nacimiento hasta los

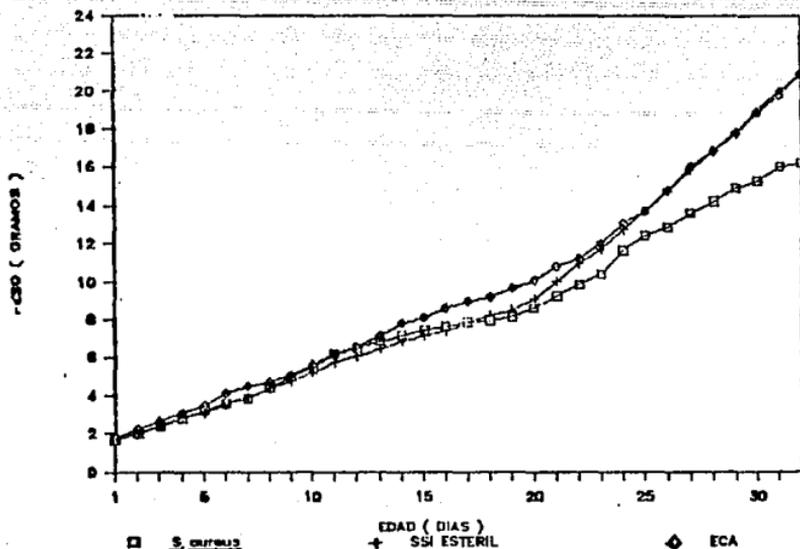


FIGURA 3. CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS RATONES CD1. PROMEDIO DE LOS PESOS. □ RATONES INOCULADOS IP CON UNA SUSPENSIÓN DE *S. aureus* MUERTO, ◊ RATONES INOCULADOS IP CON ECA, + RATONES INOCULADOS IP CON SSI ESTÉRIL.

FOTOGRAFIA 1. EFECTO DE LA INOCULACION DE S. DUBOISII INACTIVADO, SOBRE EL CRECIMIENTO DEL RATON CD1, A LOS 32 DIAS DE NACIDO (ARRIBA), COMPARADO CON EL RATON INYECTADO SOLO CON SSI (ABAJO), DE LA MISMA EDAD.

32 días de edad. Al final de este lapso, los ratones inyectados con ECA pesaban prácticamente lo mismo, que los ratones testigo, ver tabla 1.

En los animales que recibieron las inyecciones intraperitoneales de ECA, no se observaron comportamientos anormales como los de los ratones inoculados con estafilococos muertos.

3.2 RESPUESTA DE ANTICUEROS:

Los ratones CDI inyectados con S. aureus muerto, deprimieron significativamente su capacidad para producir anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero (anti-GRC). La cantidad de linfocitos esplénicos formadores de placas hemolíticas, se determinó por la técnica de Cunningham y col. (72), que reveló una franca depresión de la respuesta humoral hacia los GRC ($p < 0.001$) después del tratamiento experimental con respecto al grupo testigo tratado con SSI. Ver tabla 2.

Los valores de la mediana (Md) fueron: 5.0 CFA/10⁶ linfocitos esplénicos, en los ratones CDI inoculados con S. aureus, mientras que en el grupo testigo inoculado con SSI, la mediana fué 191.2 CFA/10⁶ linfocitos esplénicos. Estos resultados se expresan gráficamente en la figura 4.

CFA/10 ⁶ LINFOCITOS ESPLENICOS DE BATCHES CDI INOCULADOS CON:				
N	S. aureus	ECA	SSI ESTERIL	NO TRATADOS
1	37.50	350.00	330.41	330.41
2	35.00	291.39	273.70	273.79
3	20.63	249.00	273.10	210.62
4	19.17	236.80	270.63	195.00
5	14.39	196.80	267.50	175.90
6	12.70	161.80	233.60	160.00
7	5.50	114.80	222.50	140.00
8	5.00	110.60	219.80	117.15
9	4.80	93.70	210.63	96.90
10	3.75	83.70	210.60	77.90
11	3.75	62.50	204.38	
12	2.50	51.80	196.10	
13	1.71	50.00	195.00	
14	0.00	41.30	179.30	
15	0.00	28.70	178.13	
16		24.30	175.90	
17			160.00	
18			155.60	
19			142.50	
20			141.20	
21			140.00	
22			136.20	
23			134.38	
24			117.15	
25			116.90	
26			108.70	
27			108.50	
28			96.90	
29			95.00	
30			82.50	
31			77.90	
32			77.50	
33			75.60	
MEDIANA	5.00	102.15	160.00	175.90
LIMITE				
CUARTIL SUPERIOR	16.77	196.80	210.63	202.81
LIMITE				
CUARTIL INFERIOR	3.12	51.80	116.80	128.75

TABLA 2. CANTIDADES DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO (CFA) ANTI-GRC DE BATCHES CDI INOCULADOS CON S. aureus MUERTO, ECA, SSI O QUE NO FUERON TRATADOS.

En los ratones CDI inyectados con 100 µg de ECA, las cantidades de células formadoras de anticuerpos, presentaron una disminución comparados con las de los ratones tratados sólo con SSI estéril, pero esta diferencia no resultó estadísticamente significativa

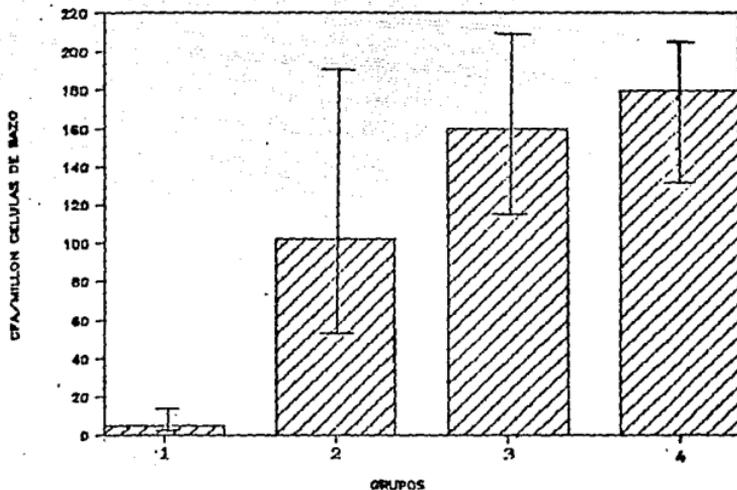


FIGURA 4. CANTIDADES DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO (CFA) ANTI-SRC. GRUPOS DE RATONES INMUNIZADOS CON SRC PREVIO TRATAMIENTO CON: 1) S. aureus INACTIVADO ($p < 0.001$, $p < 0.001$) 2) ECA ($p > 0.05$, $p > 0.05$) 3) SSI 4) NO TRATADOS. LAS p SON REFERIDAS AL GRUPO TRATADO CON SSI Y AL NO TRATADO, RESPECTIVAMENTE. EL LIMITE SUPERIOR DE CADA BARRA INDICA EL VALOR DE LA MEDIANA Y LA LINEA RECTA VERTICAL SEÑALA LOS LIMITES DE LOS CUARTILES.

($p > 0.05$), ver tabla 2.

Los valores de la mediana (Md) fueron: 102.15 CFA/10⁶ linfocitos esplénicos, en los ratones CD1 inoculados con 100 µg. de ECA, mientras que en el grupo testigo inoculado con SSI, la mediana fué de 141.20 CFA/10⁶ linfocitos esplénicos. Estos resultados se expresan gráficamente en la figura 4.

Los valores obtenidos con el grupo de ratones no tratados, sirvieron para conocer los niveles de CFA en ratones sanos CD1. Estos siguieron conservando las mismas diferencias significativas ($p < 0.001$) con respecto al grupo de ratones inoculados con S. aureus muerto y siendo no significativas con respecto a los grupos de ratones inoculados con ECA o SSI : $p > 0.05$ en ambos casos. Estos resultados de CFA, para todos los grupos de ratones, se resumen en la tabla 3.

CONDICION EXPERIMENTAL DE LOS RATONES	N	CFU/10 ⁶ CELULAS	p	p
RATONES CD1 INMUNIZADOS CON GRC AL B I TRATADOS PREVIAMENTE CON:		MEDIANA (M _d)	EN RELACION CON LOS CONTROLES SSI	EN RELACION CON LOS NO TRATADOS
NO TRATADOS, SANOS	11	175.90	p>0.05	---
<u>S. aureus</u>	15	5.00	p<0.001	p<0.001
SSI ESTERIL	33	160.00	---	p>0.05
ECA	16	102.15	p>0.05	p>0.05

TABLA 3. VALORES DE LAS CFA EN LOS 4 GRUPOS DE RATONES QUE ESTUVIERON SUJETOS A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES.

3.3 FUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS T. REACCION LOCAL INJERTO CONTRA HOSPEDERO:

Los linfocitos esplénicos de los ratones con el síndrome del desgaste, inducido por S. aureus inactivado por calor, si fueron capaces de inducir una reacción local injerto contra hospedero cuando se inocularon en el cojinete plantar de otros ratones F₁ (CD1 x CFW) de 1 mes que sirvieron como receptores. Estos resultados se muestran en las tablas 4 y 5, que se expresan gráficamente en la figura 5.

RATONES DE RATCHES HIBRIDOS CON:					
LINFOCITOS DE DONANTE CD1 TRATADOS CON:				ESR	NO INOCULADOS
S. aureus		ECA	SSI		
A	E	C	D	B	E
1) 1.58	1) 1.27	1) 1.94	25) 2.37	1) 0.41	1) 0.30
2) 1.50	2) 1.54	2) 1.37	26) 1.00	2) 0.25	2) 1.00
3) 1.62	3) 1.30	3) 1.93	27) 1.40	3) 0.93	3) 0.50
4) 1.94	4) 1.78	4) 1.40	28) 1.60	4) 0.45	4) 1.79
5) 2.22	5) 1.10	5) 2.45	29) 1.09	5) 0.40	5) 0.55
6) 1.35	6) 1.50	6) 1.84	30) 2.33	6) 0.59	6) 0.32
7) 1.92	7) 1.67	7) 2.20	31) 1.50	7) 0.58	7) 0.57
8) 1.13	8) 1.67	8) 2.12	32) 2.50	8) 0.60	8) 1.00
9) 1.29	9) 2.00	9) 2.39	33) 2.00	9) 0.93	9) 0.39
10) 1.57	10) 1.45	10) 1.92	34) 2.32	10) 0.74	10) 0.37
11) 1.22	11) 1.25	11) 1.24	35) 2.20		
12) 1.47	12) 1.14	12) 1.48	36) 1.25		
13) 2.14	13) 1.50	13) 1.99	37) 1.00		
14) 2.14	14) 4.67	14) 2.45	38) 1.22		
15) 1.93	15) 1.89	15) 1.84	39) 1.00		
16) 1.95	16) 1.07	16) 2.00	40) 2.50		
	17) 3.67	17) 2.55	41) 1.00		
	18) 2.60	18) 1.22	42) 1.33		
	19) 3.00	19) 1.54	43) 1.28		
		20) 1.45	44) 1.40		
		21) 1.25	45) 1.54		
		22) 1.79	46) 1.00		
		23) 1.85	47) 1.60		
		24) 1.71	48) 2.00		
X	1.73	1.81	1.73	0.57	0.91
D.S.	0.54	0.93	0.54	0.19	0.17

TABLA 4. INDICES PGLITEOS EN BASE AL PESO DE LOS GRANULOS (I.P./PESO) EN 5 GRUPOS DE RATONES F₁ (CFW/CD1). LOS GRUPOS A, B Y C SE INOCULARON CON 10⁶ LINFOCITOS ESPLÉNICOS DE RATONES CD1 TRATADOS CON *S. aureus* INACTIVADO (P>0.05), ECA (P>0.05) Y SSI RESPECTIVAMENTE. LA P SE REFIERE AL GRUPO C. LOS GRUPOS D Y E CORRESPONDEN A LOS CENTROS DE RATONES HIBRIDOS INOCULADOS SOLO CON SOLUCION SALINA BALANCEADA O QUE NO RECIBIERON NINGUN TRATAMIENTO.

RATCHES CFN/CD1 INOCULADOS CON:					
LINFOCITOS DE DONADOR CD1 TRATADOS CON:				ESS	NO INOCULADOS
<u>S. aureus</u>		ECA	SSI		
A	B	C		D	E
1) 1.50	1) 1.14	1) 1.33	25) 1.25	1) 0.94	1) 0.39
2) 1.32	2) 1.50	2) 1.44	26) 1.16	2) 0.50	2) 0.52
3) 1.24	3) 1.67	3) 1.37	27) 1.60	3) 0.79	3) 0.91
4) 1.50	4) 1.19	4) 1.23	28) 1.08	4) 0.82	4) 0.88
5) 1.46	5) 1.00	5) 1.09	29) 1.00	5) 0.39	5) 0.59
6) 1.40	6) 1.92	6) 1.33	30) 1.25	6) 0.80	6) 0.55
7) 1.40	7) 1.13	7) 1.34	31) 1.28	7) 0.90	7) 0.62
8) 1.11	8) 1.03	8) 1.25	32) 1.37	8) 0.69	8) 0.80
9) 1.04	9) 2.39	9) 1.65	33) 1.09	9) 0.87	9) 0.67
10) 1.37	10) 1.02	10) 1.19	34) 1.17	10) 0.95	10) 0.90
11) 1.03	11) 1.14	11) 1.24	35) 1.94		
12) 1.87	12) 1.03	12) 1.22	36) 1.23		
13) 1.51	13) 1.49	13) 1.31	37) 1.09		
14) 1.43	14) 1.73	14) 1.49	38) 1.10		
15) 1.70	15) 1.54	15) 1.10	39) 1.89		
16) 1.40	16) 1.52	16) 1.28	40) 1.55		
	17) 1.45	17) 1.18	41) 1.40		
	18) 2.29	18) 1.17	42) 1.82		
	19) 1.63	19) 1.20	43) 1.92		
	20) 2.36	20) 1.09	44) 1.46		
	21) 1.41	21) 1.35	45) 1.09		
		22) 1.96	46) 1.30		
		23) 1.51	47) 1.09		
		24) 1.08	48) 1.27		
X	1.39	1.50	1.30	0.94	0.73
D.S.	0.22	0.43	0.22	0.12	0.15

TABLA 5. INDICES POPLITEOS EN BASE AL CONTENIDO DE PROTEINA DE LOS GANGLIOS (I.P./ABS. 280) EN 5 GRUPOS DE RATCHES F₁ (CFN/CD1). LOS GRUPOS A, B Y C SE INOCULARON CON 10⁶ LINFOCITOS ESPLÉNICOS DE RATCHES CD1 TRATADOS CON S. aureus INACTIVADO (P>0.05), ECA (P>0.05) Y SSI RESPECTIVAMENTE; LA P SE REFIERE AL GRUPO C. LOS GRUPOS D Y E CORRESPONDEN A LOS CONTRÓLES DE RATCHES HÍBRIDOS INOCULADOS SOLO CON SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA O QUE NO RECIBIERON NINGUN TRATAMIENTO.

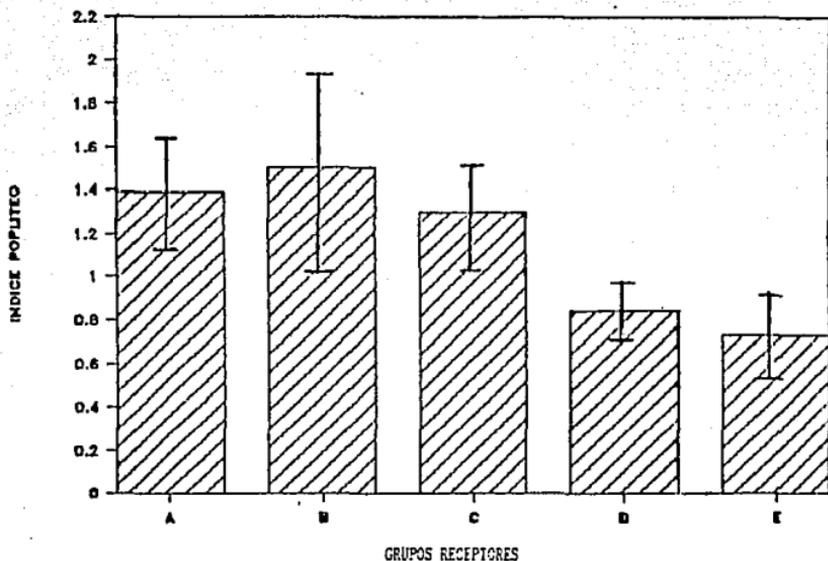


FIGURA 5. INDICES PÓPLITEOS, EN BASE AL CONTENIDO DE PROTEÍNA DE LOS GANGLIOS, PROVOCADOS POR LOS LINFOCITOS ESPLÉNTICOS DE RATONES CD1, EN RECEPTORES CFN/CD1. LOS GRUPOS DE RATONES DONADORES, FUERON PREVIAMENTE INOCULADOS CON: A) *S. aureus* INACTIVADO ($p > 0.05$), B) ECA ($p > 0.05$), C) SSI. COMO CONTROLES ADICIONALES, SE TOMARON LOS GRUPOS D) CFN/CD1 INOCULADOS CON BSS Y E) CFN/CD1 SIN TRATAMIENTO. LAS p SON REFERIDAS AL GRUPO C. LOS GRUPOS A, D Y C TUVIERON UNA $p < 0.01$ EN RELACION CON LOS GRUPOS D Y E. EL LÍMITE SUPERIOR DE CADA BARRA INDICA EL VALOR DE LA MEDIA, Y LA LÍNEA RECTA VERTICAL SEÑALA LOS LÍMITES DE 1 DS.

El índice poplíteo se determinó en dos formas. Primero en base al peso de los ganglios, y luego según las lecturas de la absorbancia a 280 nm. En el primer caso, los valores

fueron semejantes entre los animales tratados con estafilococos, comparados con los ratones inyectados solamente con SSI, como se puede observar en la tabla 4.

Los linfocitos esplénicos de los ratones CD1, bajo tratamiento con 100 µg de ECA, provocaron una reacción local injerto contra hospedero aparentemente superior a la inducida con los linfocitos de los ratones CD1 control inoculados con SSI, sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas : $p > 0.05$.

Cuando los índices popliteos se calcularon de acuerdo al contenido de proteínas de los ganglios (Abs 200), se pudo observar que los linfocitos de los ratones tratados con ECA provocaron una reacción local injerto contra hospedero en apariencia superior al inducido por los linfocitos de los ratones tratados con S. aureus y SSI (Ver figura 5). Nuevamente, estos valores no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos. No obstante, aquellos fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.001$) a los obtenidos en ratones no inyectados con linfocitos (Ver tabla 6).

ANIMAL DONADOR	TREATAMIENTO DONADOR	ANIMAL RECEPTOR CFM/CDI	INDICE POPLITEO DEL RECEPTOR		P EN RELACION A I	P EN RELACION A II
	INOCULADO CON:		INOCULADO CON:	(I.P./Abs 280 nm)		
CDI	<u>S. aureus</u>	LINFOCITOS	1.39	0.22	p>0.05	p<0.01
CDI	ECA	LINFOCITOS	1.50	0.43	p>0.05	p<0.01
CDI	SSI *	LINFOCITOS	1.30	0.22	---	p<0.01
---	---	INYECTADO CON ESS **	0.84	0.12	---	---
---	---	NO INOCULADO	0.73	0.15	---	---

TABLA 6. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS INDICES POPLITEOS EN LOS 5 GRUPOS DE RATONES HIBRIDOS CFM/CDI, TOMANDO SOLAMENTE LOS VALORES OBTENIDOS EN BASE AL CONTENIDO DE PROTEINA DETERMINADA A 280 NM. LAS P SE REFIEREN AL GRUPO DONADOR DE LINFOCITOS TRATADO CON SSI ESTERIL (*), Y AL GRUPO RECEPTOR INYECTADO SOLO CON SOLUCION SALINA BALANCEADA (**). (REACCION INJERTO CONTRA HOSPEDERO NEGATIVA)

El crecimiento ganglionar fué moderado en los diferentes grupos de animales, probablemente porque el experimento se llevó a cabo con 2 cepas "abiertas" de ratones y además, debido al parentesco que guardaban entre sí el donador de linfocitos y el receptor de los mismos. Sin embargo los índices popliteos de los grupos de ratones híbridos, inyectados con linfocitos, resultaron

significativamente superiores a los índices poplíteos de 10 ratones híbridos, que sólo se inyectaron con solución salina amortiguada ($p < 0.001$) y que por lo tanto, no desarrollaron la reacción local injerto contra hospedero. Ver tablas 5,6 y figura 5.

Además, también se llevó a cabo otro ensayo con un grupo de 10 ratones híbridos a los cuales no se les inocularon ni linfocitos, ni solución salina amortiguada en el cojinete plantar. Los índices poplíteos de estos animales, también fueron significativamente inferiores a los índices de los ratones híbridos inoculados con los linfocitos esplénicos de los ratones CD1, que habían recibido cualquiera de los tratamientos (S. aureus inactivado, ECA o SSI) ($p < 0.001$).

En base a los resultados de este último grupo, se encontró una disparidad natural entre el tamaño de los ganglios poplíteos derecho e izquierdo de los ratones híbridos CFW/CD1. Sistemáticamente, el ganglio poplíteo izquierdo era más grande que el contralateral. Todas las inoculaciones se realizaron en el cojinete plantar del miembro posterior derecho.

Como se puede observar en las tablas 4 y 5, existen diferencias aparentes entre los índices popliteos obtenidos, según se calculen tomando en cuenta solamente los pesos o el contenido de proteínas de los ganglios. Por ser éste último un indicador más fiel de la proliferación celular en los ganglios, solamente se tomaron en cuenta las lecturas espectrofotométricas de las absorbancias a 280 nm, en el momento de hacer el análisis estadístico de los índices popliteos que se muestra en la tabla 6.

3.4 PESO DEL TEJIDO ESPLENICO.

Como un parámetro más en la medición de los efectos de la inoculación de S. aureus muerto y el ECA sobre el tejido linfóide, se llevó a cabo un registro del peso del bazo de todos los ratones CDI sujetos a los diversos tratamientos. Después de sacrificarlos, se pesaron los bazos tanto de los ratones destinados al ensayo de CFA, como de aquellos seleccionados para la reacción local injerto contra hospedero.

Se pudo observar que los bazos de los ratones CDI inoculados con S. aureus muerto y también los tratados con

ECA, presentaban un color pálido y una consistencia dura comparados con los bazo de los controles que hizo difícil la disgregación del tejido esplénico. Además, se presentó un aumento en sus tamaños comparados con los bazo de los ratones inoculados únicamente con SSI, siendo mayor en el grupo de ratones inoculados con S. aureus. Ver tabla 7 .

INOCULACION INTRAPERITONEAL	PESO PROMEDIO DE BAZO (graos)	N	p
<u>S. aureus</u>	0.407	10	p<0.001
ECA	0.348	44	p<0.001
SSI ESTERIL	0.195	74	---
SIN TRATAMIENTO	0.176	10	---

TABLA 7. PESO DEL BAZO DE LOS RATONES CDI, CUANDO SE SOMETIERON A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES. LAS p SE REFIEREN A LOS GRUPOS CON SSI EN AMBOS GRUPOS.

Una observación más que se hizo, fué el hallazgo inesperado de evidencia de una infección agregada en los ratones inoculados con S. aureus inactivado. Cuando los ratones se sacrificaron para obtener el bazo, después de haber recibido varias dosis intraperitoneales de la suspensión de estafilococos muertos, se pudo observar que algunos de ellos tenían microabscesos peritoneales en cuyo pus no se identificó a S. aureus sino otros microorganismos diferentes al inóculo.

CAPITULO 4
DISCUSION DE RESULTADOS

El trabajo se diseñó con dos objetivos. El primero fué el estudiar si los productos bacterianos de S. aureus inactivado, podían deprimir las funciones de los linfocitos T responsables de la reacción injerto contra hospedero. Esta hipótesis se propuso porque los animales desgastados tienen el timo hipotrófico y deprimida la respuesta de anticuerpos contra antígenos T-dependientes (23). El segundo objetivo fué investigar si la inyección intraperitoneal en ratones recién nacidos con 100 µg de ECA por dosis, podía provocar la aparición de un síndrome desgastante similar al obtenido con las inoculaciones de estafilococos inactivados.

El interés por estudiar si el ECA puede o no causar el desgaste inmunológico de los ratones tiene como antecedentes varios trabajos sobre la actividad biológica del hapteno: su potencial como inmunógeno común presente en casi todas las bacterias Gram negativas (25,26), el cruce antigénico que presenta con algunos tejidos animales (76,77), su posible participación en el inicio de algunas enfermedades autoinmunes del tubo digestivo (28,29) y la

aparición de este componente en la orina de pacientes que cursan con algunas enfermedades (78)

Con el primer grupo experimental, se pudo reproducir el síndrome del desgaste en los ratones CD1 inoculados con la suspensión bacteriana de S. aureus inactivado (23).

Todos los animales presentaron un enflaquecimiento o deterioro físico, el cual es un signo característico del síndrome del desgaste, y ha sido atribuido al daño del sistema inmunológico del ratón neonato causado por los productos bacterianos inoculados (15,16). El Staphylococcus aureus inactivado es uno de tantos agentes capaces de producir éste síndrome desgastante (16,23,35).

Como la pérdida de peso y los otros síntomas se han podido atenuar mediante la administración de antibióticos y no presentarse en animales libres de gérmenes (15,31,33,36), se ha propuesto que es una consecuencia de las infecciones sobreagregadas después que los productos bacterianos lesionaron el sistema inmunológico (79).

Los resultados obtenidos revelan una depresión de la respuesta de anticuerpos contra un antígeno T dependiente, lo cual sugiere que el ratón desgastado no se encuentra en situación de responder adecuadamente a la llegada de nuevos antígenos. Esta deficiencia para producir anticuerpos puede ser una consecuencia de uno o varios de los siguientes mecanismos: 1.- la existencia de una competencia antigénica entre el estafilococo y los GRC (80), 2.- un agotamiento de las clonas específicas anti-GRC debido a la expansión clonal producida por los productos del S. aureus (50,51,81); 3.- algún mecanismo citotóxico o de saturación de los macrófagos producido por algunos componentes de la bacteria, como se ha reportado con algunos agentes físicos (82), que no permitió el desarrollo de una respuesta humoral hacia los eritrocitos de carnero, 4.- una probable estimulación de células supresoras por algunos productos del estafilococo (83) y, por último, 5.- el haber ocasionado un daño importante en el mecanismo de cooperación entre la célula T y la célula B (80,81).

Los resultados obtenidos confirman que la interacción de un animal recién nacido con algunos productos bacterianos puede deprimir sustancialmente una de las

principales defensas específicas del hospedero contra las infecciones. Es conveniente enfatizar que la incapacidad de los ratones desgastados para responder efectivamente (producción de anticuerpos) al reto antigénico de los glóbulos rojos, no se ha podido contrarrestar cuando se logran atenuar los signos físicos del desgaste utilizando ratones libres de gérmenes (16).

Existe abundante literatura sobre la potente actividad que tienen los productos bacterianos, principalmente la endotoxina, para dañar el timo (4,41). Eksted y col., (23) confirmaron que los estafilococos muertos también alteraban su estructura y reducían la proliferación celular de esta glándula. Basados en lo anterior, se propuso la hipótesis de que los linfocitos de los animales con el timo dañado a causa de el síndrome del desgaste, no deberían llevar a cabo eficientemente una reacción injerto contra hospedero. Sin embargo, el análisis estadístico de los resultados rechazó la hipótesis mencionada, ya que los linfocitos de los animales desgastados con el S. aureus sí fueron capaces de realizar una buena respuesta citotóxica en los ganglios popliteos de los ratones híbridos. Estos resultados negativos podrían ser explicados por alguno de los

siguientes mecanismos: 1.- porque no se produjo el daño del timo tal como lo reporta Ekstedt; 2.- porque, dañado el timo y deprimidas las células T cooperadoras y citotóxicas, las células asesinas (NK) (68) y los linfocitos citotóxicos activados por linfocinas (LAK) (69) del donador pudieron haber iniciado, la reacción injerto contra hospedero (84), y por último, 3.- porque las subpoblaciones de linfocitos T cooperadoras y citotóxicas en el timo no fueron dañadas por los productos del estafilococo.

Los ratones con los que se trabajó se pueden considerar como desnutridos experimentalmente, debido al bajo desarrollo ponderal por lo que, desde un punto de vista teórico, no sólo deberían tener aumentada la permeabilidad intestinal (10), sino también una disminución en la capacidad de controlar la diseminación de bacterias Gram negativas y sus productos (85). La presencia de microabscesos en algunos de los ratones tratados sugieren una posible translocalización de bacterias del tracto intestinal. Probablemente estas infecciones sobreagregadas fueron las responsables de la aparición del síndrome del desgaste físico.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los resultados se contraponen a las investigaciones que han revelado cómo los linfocitos esplénicos de animales desnutridos experimentalmente no pueden provocar una reacción similar a la estudiada (86). En contraste, existen otros trabajos en los cuales se ve incrementada la reacción injerto contra hospedero en animales con una dieta baja en proteínas (87).

Por todas las razones anteriores, el síndrome del desgaste inducido por la inoculación de S. aureus inactivado, tiene una gran importancia para las investigaciones inmunológicas experimentales. En cierto sentido, el síndrome experimental del desgaste reproduce algunas de las condiciones que pueden presentar los niños recién nacidos que sobreviven a las infecciones graves del periodo neonatal. También puede ayudar al estudio de las interacciones entre el hospedero y su flora comensal en otras circunstancias clínicas en donde se ve modificada la inmunocompetencia, como en el caso de los enfermos que reciben un tratamiento inmunosupresor y en quienes se ha confirmado el fenómeno de la translocalización bacteriana (10,12) .

El segundo grupo experimental se utilizó para comprobar el efecto de la inoculación de un componente compartido por todas la enterobacterias, el ECA, en ratones CD1 recién nacidos utilizando el mismo diseño experimental.

La dosis de 100 µg de ECA, siguiendo el mismo esquema de administración utilizado anteriormente en los ratones, no produjo ninguno de los síntomas clínicos observados en los animales inoculados con S. aureus de la misma edad. El tratamiento con ECA tampoco estimuló inespecíficamente la activación de células T, in vivo, ya que el aumento de la reacción local injerto contra hospedero, cuando se utilizaron linfocitos de ratones tratados con ECA, no resultó estadísticamente significativo. Estos resultados, obtenidos en ratones recién nacidos, no concuerdan con los que reportan la capacidad del ECA como inmunoestimulante, en reacciones de hipersensibilidad hacia algunas proteínas, realizadas en cobayos adultos (57). Pero es necesario tener en cuenta que los ratones recibieron un tratamiento con ECA durante 4 semanas, el cual no estuvo dirigido a provocar la inmunoestimulación del animal, sino a estudiar el probable efecto tóxico del hapteno como un inductor del síndrome del desgaste.

Por otro lado, en los ratones tratados con ECA, se encontró una moderada disminución de la respuesta de anticuerpos anti-GRC que no fué estadísticamente significativa. Estos resultados se contraponen a los obtenidos in vitro, donde el ECA se comporta como un moderado activador policlonal de células B (27,28).

Siendo el ECA un hapteno ampliamente distribuido entre las enterobacterias, están justificados los trabajos que tratan de utilizarlo en la prevención de enfermedades infecciosas causadas por éstas, así como también aplicarlo como agente terapéutico en algunas alteraciones inmunológicas o explicar su participación en la patogenia de algunas enfermedades (28,88).

En el presente trabajo, se exploraron algunos de los riesgos que podría tener el uso del ECA en animales vivos utilizando a propósito, dosis superiores a las que podrían servir como terapéuticas y tiempos de administración sumamente prolongados .

Holmgren y col. (76) propusieron que la reacción autoinmune que se observa en la colitis ulcerosa y en la

pielonefritis crónica, se debe a la respuesta del hospedero hacia un antígeno compartido por el animal enfermo y por la flora bacteriana comensal . Se ha propuesto que los individuos sanos escapan de estas enfermedades debido, probablemente, a la tolerancia que se establece para no responder contra antígenos presentes en las enterobacterias o hacia factores que pueden ser extraídos de hígado y riñón humanos. Todas estas proposiciones teóricas han encontrado apoyo en los experimentos que han demostrado, cómo algunos antígenos que llegan al tubo digestivo activan una respuesta inmunológica local y deprimen la respuesta sistémica contra sus determinantes.

CAPITULO 5
CONCLUSION

El presente trabajo, se realizó como un intento de estudiar algunos aspectos de las interacciones de las bacterias comensales de la flora normal intestinal y de sus productos con el sistema inmunitario del hospedero. En este contexto, ya se ha presentado abundante evidencia sobre la importancia que tienen las enterobacterias en la conservación de la salud del individuo. Actualmente se les intenta utilizar para la profilaxis de varias enfermedades infecciosas. Además, se ha probado su uso como inmunoestimulantes en el caso de pacientes que tienen comprometidas sus funciones inmunológicas a causa de un tratamiento inmunosupresor o de enfermedades primarias graves.

Los resultados mostraron que el síndrome del desgaste se pudo reproducir en ratones inoculados con S. aureus inactivado, pero no en animales de la misma cepa que fueron inoculados con ECA.

Uno de los propósitos del trabajo, fué el de comprobar la aparente normalidad del sistema inmunitario celular (células citotóxicas) de los ratones CD1, inoculados con S. aureus inactivado, utilizando una técnica sensible como es

la reacción local injerto contra hospedero. Los resultados aquí obtenidos, refuerzan la idea de que estos animales no tienen alterada su capacidad para reconocer y rechazar células alogénicas.

También se examinó el impacto biológico de la inoculación del S. aureus inactivado, sobre la producción y secreción de anticuerpos fijadores de complemento. El efecto observado fué el de una tremenda depresión en la producción de Igl₁ específica anti-GRC.

En la segunda parte del trabajo, se demostró experimentalmente que la inoculación de 100 µg /dosis de un antígeno común de la pared celular de las enterobacterias (ECA), no producía ninguna de las alteraciones del síndrome del desgaste físico e inmunológico. Al parecer, el ECA no tuvo ningún efecto tóxico observable. Sus propiedades biológicas sólo se vieron reflejadas en el ligero aumento no significativo de la respuesta local injerto contra hospedero provocada por los linfocitos T de los animales tratados .

Tampoco se modificó significativamente la respuesta de anticuerpos contra el reto con GRC, una vez que se terminó

el esquema de administración intraperitoneal del ECA. En la dosis que se trabajó (100 µg cada 3 días), el ECA no provocó un aumento en las cuentas de CFA, lo cual difiere de los resultados reportados en ensayos in vitro.

El experimento realizado y los resultados obtenidos permitieron abordar las reacciones de los animales vertebrados con los productos de sus bacterias comensales. Estas interacciones representan un capítulo sumamente importante de la Inmunobiología.

Los resultados del presente trabajo son el informe preliminar de un estudio cuyo objetivo es conocer la influencia que pueden tener los cambios entre estas interacciones sobre la evolución de ciertas enfermedades que se caracterizan por un desgaste en la condición física e inmunológica de los pacientes.

RESUMEN

Se presenta un trabajo experimental sobre las consecuencias inmunológicas que se desarrollan en un grupo de ratones recién nacidos; inoculados con una suspensión de S. aureus inactivado por calor o con 100 µg de ECA.

Los objetivos inmediatos fueron comprobar si la administración de de S. aureus inactivado o ECA, podrían producir el síndrome del desgaste y modificar la inmunocompetencia de los linfocitos T y B de los animales.

Un grupo de ratones CD1 recién nacidos fué inyectado intraperitonealmente con una suspensión de estafilococos inactivados, cada 3 días durante 4 semanas; otros ratones de la misma edad, recibieron 100 µg de ECA con el mismo esquema. Un tercer grupo de animales, recibió por la misma vía, un volumen similar de solución salina isotónica estéril (SSI).

Una vez terminados los distintos tratamientos correspondientes a los 3 grupos, se evaluó la capacidad de sus linfocitos esplénicos para:

- a) Formar anticuerpos anti-eritrocito de carnero después del reto con glóbulos rojos de carnero (GRC) y,
- b) provocar una reacción local injerto contra hospedero (GvH) en animales híbridos F₁.

Los resultados revelaron que los ratones que recibieron los estafilococos inactivados retrasaron su crecimiento y deprimieron significativamente su capacidad para formar anticuerpos anti-GRC, sin modificar la competencia de sus linfocitos esplénicos para provocar una reacción local injerto contra hospedero en ganglio poplíteo.

En cambio, en el grupo de ratones inoculados con 100 µg de ECA, no se presentó el cuadro clínico del síndrome del desgaste ya que sólo se observó una disminución no significativa en la producción de anticuerpos anti-GRC después de la inmunización con eritrocitos de carnero y un aumento que tampoco fue significativo en los índices poplíteos provocados por sus linfocitos esplénicos.

Este modelo experimental puede ser utilizado para estudiar las situaciones inmunológicas de los niños recién nacidos que sobreviven a infecciones graves o recurrentes durante el primer mes de vida, o la de los pacientes que cursan con algunas enfermedades debilitantes en las que se puede expresar el potencial patogénico de los elementos de la flora bacteriana comensal o de sus productos. El estudio de las causas y las consecuencias de los fenómenos de translocalización bacteriana continúa siendo un capítulo sumamente importante de la infectología clínica .

BIBLIOGRAFIA

1) PORTER P., PARRY S. H., ALLEN W. D. 1977
Significance of immune mechanisms in relation to enteric
infection of the gastrointestinal tract in animals *In:*
Immunology of the gut . Ciba Foundation Symposium 46.
Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam. pag. 55

2) McCUSKEY R. G., McCUSKEY P. A., URBASCHEK R.
URBASCHEK R. 1987. Kupffer cell function in host defense.
Rev. Infect. Dis. 7, Suppl. 5 S 316.

3) BERG P.D. 1983. Bacterial translocation from the
gastrointestinal tracts of mice receiving
immunosuppressive chemotherapeutic agents. *Current*
Microbiology 8, 285.

4) KIND P., CAMPBELL P., ROWLANDS D. T. 1967 .
Endotoxin-induced wasting disease in mice: A temporary
condition explained by endotoxin tolerance .*Proc. Soc. Exp.*
Biol. Med. 125, 495.

5) MORRISON D. C., RYAN J. L., 1987 Endotoxins and
disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.* 38, 417.

6) MANNEL D.H., NORTHOFF H., BAUSS F., FALK W. 1987
TNF: A cytokine involved in toxic effects of endotoxin.
Rev. Infect. Dis. 9 Suppl. 5: s602.

7) FOLHE L., GIERTZ H. 1987 Endotoxins, arachidonic
acid and superoxide formation. Rev. Infect. Dis. 9 Suppl
5: s553.

8) URBASCHEK R., URBASCHEK R. 1987 TNF and IL-1 as
mediators of endotoxin-induced beneficial effects. Rev.
Infect. Dis. 9 Suppl 5: s607.

9) MORRISON D.C., URBASCHEK R. 1978 The effects of
bacterial endotoxins on the host mediation systems. Am J.
Pathol. 93, 527.

10) WELLS C. L., MADDAUS M. A., SIMMONS R. L. 1988.
Proposed mechanisms for the translocation of intestinal
bacteria. Rev. Infect. Dis. 10, 958.

11) PENN R. L., MACA R. D., BERG R. D. 1985.
Increased translocation of bacteria from the
Gastrointestinal tracts of tumor-bearing mice. Infect.
Immun. 47, 793.

12) TANCREDE C. H., ANDREMONTE A. D. 1985. Bacterial Translocation and Gram-negative bacteremia in patients with hematological malignancies. J. Infect. Dis. 152, 99.

13) LEE A., FOD M. C. 1978 Natural antibodies and the intestinal flora in rodents, In Antigen absorption by the gut. Hemmings W. A. University Park Press Baltimore. Chapter 13. Pag. 135.

14) CRABBE P. A., NASH D. R., BAZIN H., EYSSEN H., HEREMANS J. F. 1970 Immunohistological observations on lymphoid tissues from conventional and germ free mice. Lab. Invest. 22, 448.

15) KEAST D. 1973. Role of bacterial endotoxin in the Graft -vs.- Host syndrome. J. Infect. Dis. 128, Suppl 1., s104.

16) JUTILA J. W. 1973. Etiology of the wasting diseases. J. Infect. Dis. 128, Suppl 1, S 99.

17) RIBI E., CANTRELL J. L., TAKAYAMA K. 1984. Lipid A and immunotherapy. Rev. Infect. Dis. 6, 567.

18) MADONNA G.S., PETERSON J.E., RIBI E.E., VOGEL S.N.
1986 Early phase endotoxin tolerance: Induction by a
detoxified Lipid A derivative, monophosphoryl Lipid A .
Infect. Immun. 52, 6.

19) DAHINDEN C., GALANOS C., FEHR J. 1983
Granulocyte activation by endotoxin. Correlation between
adherence and other granulocyte functions and role of
endotoxin. Structure on biologic activity J. Immunol. 130
857.

20) SHAW WARREN H., CHEDID L. A. 1987 Strategies for
the treatment of endotoxemia: Significance of the acute-
phase response. Rev. Infect. Dis. 9 Suppl 5 s630.

21) NOWOTNY A. 1987 Review of the molecular
requirements of endotoxic actions. Rev. Infect. Dis. 9
Suppl 5 s503.

22) RIETSCHEL E. T., BRADE L., BRANDENBURG K. 1987
Chemical structure and biologic activity of bacterial and
synthetic Lipid A. Rev. Infect. Dis. 9 Suppl 5 s527.

23) EKSTEDT R. D., HAYES L. L. 1967. Runt diseases induced by non-living bacterial antigens. J. Immunol. 98, 1, 110.

24) EKSTEDT R. D., NISHIMURA E. T. 1964 Runt disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines. J. Exp. Med. 120, 795.

25) MANNEL D., MAYER H. 1978. Serological and immunological properties of isolated enterobacterial common antigen. Eur. J. Biochem. 85, 371.

26) GANNON P. J., JACOBS D. M., MARX A. 1982. Immunological activities of purified preparations of enterobacterial common antigen. Infect. Immun. 35, 193.

27) KESSEL R. W. I., NETER E., BRAUN W. 1966 Biological activities of the common antigen of Enterobacteriaceae J. Bacteriol. 71, 465.

28) MAYER H., SCHMIDT G. 1979. Chemistry and biology of the enterobacterial common antigen (ECA). Curr. Top. Microbiol. Immunol. 85, 99.

29) MAKELA H., MAYER H. 1976. Enterobacterial common antigen. Bacteriol. Rev. 40, 591.

30) ROLSTAD B. 1985 The popliteal lymph node GvH reaction in the rat: A useful model for studying cell interactions in the immune response. Immunol. Rev. 88, 153.

31) GREFF S. C., STREILEIN J. W. 1976. Graft vs Host reactions. Adv. Immunol. Dixon F. J.-Kunkel H. G., 22, 119. Academic Press.

32) SANTOS G. W., HESS A. D., VOGELSANG G. B. 1985. Graft versus Host reactions and disease. Immunol. Rev. 88, 169.

33) BILLINGHAM R., SILVERS W. 1976. Graft vs Host reactions, In The Immunobiology of Transplantation. Prentice Hall Inc. 149.

34) GOZES Y., UMIEL T., MESHORER A., TRAININ N. 1978. Syngenic GvH induced in popliteal lymph nodes by spleen cells of old C57BL/6 mice. J. Immunol. 121, 2199.

35) PIERPAOLI N, SORKIN E. 1972 Hormones, thymus and lymphocyte functions. *Experientia* 15, 11, 1385.

36) AZAR H.A. 1964 Bacterial infection and wasting in neonatally thymectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114, 817.

37) JANN K., JANN R. 1987. Polysaccharide antigens of Escherichia coli. *Rev. Infect. Dis.* 9 Suppl 5 s317.

38) BENTLEY A. T., KLEBBA P. E. 1988 Effect of LPS structure on reactivity of antiporin monoclonal antibodies with the bacterial cell surface. *J. Bacteriol.* 170, 1063

39) BRAUN V. 1973. Molecular organization of the rigid layer and the cell wall of Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* 128 Suppl s9.

40) LUDERITZ O., TANAMOTO., GALANDS. 1984. Lipopolysaccharides: Structural principles and biologic activities. Symposium I. *Rev. Infect. Dis.* 6, 428.

41) MORRISON D. C., RYAN J. L. 1979 Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv. Immunol.* **28**, 293.

42) TESH V. L., MORRISON D. C. 1980 The physical chemical characterization and biologic activity of serum released LPS. *J. Immunol.* **141**, 3523.

43) MEI-RUEY L., MORRISON D. C. 1980 Specific endotoxic LPS-binding proteins on murine splenocytes. *J. Immunol.* **141**, 3, 796.

44) GORIS H., DE FOER F., VAN DER WAAIJ D. 1985 Myelopoiesis in experimentally contaminated specific-pathogen-free and germfree mice during oral administration of polymyxin. *Infect. Immun.* **50**, 2, 427.

45) BONA C. A. 1973. Fate of endotoxin in macrophages: Biological and ultrastructural aspects. *J. Infect. Dis.* **178** suppl a74.

46) KOIVURANTA-VAARA P., RANDA D., GOLDSTEIN I. M. 1987 Bacterial Lipopolysaccharide-induced release of Lactoferrin from human polymorphonuclear leukocytes: Role of monocyte-derived TNF α . Infect. Immun. 55, 2956.

47) VUKAJLOVICH S. W., HOFFMAN J., MORRISON D.C. 1987 Activation of human serum complement by bacterial LPS: Structural requirements for antibody independent activation of the classical and alternative pathways. Molec. Immunol. 24, 319.

48) VERRHOEF J., VERRUGH H.A. 1981. Host determinants in Staphylococcal disease. Ann. Rev. Med. 32, 107.

49) KAPLAN M. H., TENENBAUM M. J. 1982. Staphylococcus aureus: Cellular biology and clinical application. Am. J. Med. 72, 248.

50) RASANEN L., MUSTIKAMAKI U. P., ARVILONMI H. 1982 Polyclonal response of human lymphocytes to bacterial cell walls, peptidoglycans and teichoic acids. Immunology 46, 481.

51) SHIRASAKI M., NEMOTO H., SUZUKI S. KUROUME T.
1978. Induction of lymphocyte colony formation in vitro by
Protein A. J. Immunol. 121, 2278.

52) DELL A., DATES J., LUGOWSKI C., ROMANOWSKA E. 1984
The enterobacterial common antigen, a cyclic
polysaccharide. Carbohydr. Res. 133, 75.

53) LUGOWSKI C. ROMANOWSKA E. 1983 Identification
of a trisaccharide repeating-unit in the enterobacterial
common antigen. Carbohydr. Res. 118, 173.

54) BARR K., RICK F. D. 1987 Biosynthesis of
enterobacterial common antigen in Escherichia coli. In
vitro synthesis of lipid-linked intermediates. J. Biol.
Chem. 262, 7142.

55) RICK P. D., MAYER H., NEUMEYER R.A. 1985
Biosynthesis of enterobacterial common antigen. J.
Bacteriol. 162, 494.

56) MANNEL D., MAYER H. 1978. Isolation and chemical characterization of the enterobacterial common antigen. Eur. J. Biochem. 86, 361.

57) KUWAJIMA S., KOBAYASHI K., OKA S., MURAI M., TANAKA Y., YAMAGUCHI K., KITANO A., YAMAMOTO S., MASUI M. 1980 Adjuvant activity of lipopolysaccharide and enterobacterial common antigen to induce delayed type hypersensitivity against protein antigen in guinea pig. In: Bacterial endotoxins and host response. M. K. Agarwal Editor. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p. 105.

58) HEIER U., MAYER H. 1985. Genetic location of genes encoding enterobacterial common antigen. J. Bacteriol. 163, 754.

59) OWENS W.E., BERG R.D. 1980 Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice. Infect. Immun. 27, 2, 461.

60) BRANDTZAEG P., KVALE D., SOLLID L.M. 1988 The poly-Ig receptor functional aspects of secretory component expression. In: Histophysiology of the immune system Adv. Exp. Med Biol. 237, 9.

61) RILEY L.W., COHEN M.L. 1984 Importance of host factors in human Salmonellosis caused by multiresistant strains of Salmonella. J. Infect. Dis. 149, 878.

62) BROOK I., MACVITTIE T.J., WALKER R.I. 1984 Recovery of aerobic and anaerobic bacteria from irradiated mice. Infect. Immun. 46, 270.

63) DEITCH E.A., BERG R. 1987 Endotoxin promote the translocation of bacteria from the gut. Arch. Surg. 122, 185.

64) FORD W. L., BURR W., SIMONSEN M. 1970. A lymph node weight assay for the GvH activity of rat lymphoid cells. Transplantation. 10, 258.

65) FORD W. L. 1979. Measurement of GvH activity. In: Handbook of Experimental Immunology. V. 2 Cellular Immunology. Edited by W. M. Weir. 3rd. Edition Blackwell Scientific Publications. Chapter 30.

66) CLEVELAND M.G., ANNABLE C. R., KLIMPEL G. R. 1988. In vivo and in vitro production of IFN Gamma and IFN Beta during GvH disease. J. Immunol. 141, 3349.

67) PORTANOVA J. P., EBLING F. N., HAMMOND W. S. 1988. Allogeneic MHC antigen requirements for Lupus-like autoantibody production and nephritis in murine GvH disease. J. Immunol. 141, 3370.

68) ROLTON E.M., GRACIE J.A. 1988 The cellular basis of the GvH reaction in rat kidney. Immunology 65, 285

69) KIRBY J.A., FORSYTHE J.L. 1989 Renal allograft rejection: possible involvement of lymphokine-activated killer cells. Immunology 67, 62.

70) JERNE N. K., NORDIN A. A. 1963 Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science 140, 405.

71) FORD W. L. 1979. Cellular secretory immunoglobulin. In: Handbook of Experimental Immunology. V. 2 Cellular Immunology. Edited by W. M. Weir. 3rd. Edition Blackwell Scientific Publications. Chapter 28.

72) CUNNINGHAM A. J., SZENBERG A. 1968. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. Immunology 14, 599.

73) SUZUKI T., GORZYNSKI E. A., NETER E. 1964 Separation by ethanol of common and somatic antigens of Enterobacteriaceae. J. Bacteriol. 88, 1240.

74) CARRILLO J., DRAGO E., GARCIA-TAMAYO F. 1983 Inhibición de la inmunohemólisis con antígeno común de las enterobacterias. Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 40, 243-250.

75) HOEL P.G. 1971 Estadística elemental. México: Compañía Editorial Continental S.A.

76) HOLMGREN J., HANMARSTRÖM S., HOLM S. E., AHLMAN J., ATTMAN P.O., JODAL U. 1972 An antigenic relationship between human kidney, colon and the common antigen of Enterobacteriaceae Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 43, 89.

77) ROWLEY D., JENKIN C.R. 1962 Antigenic cross-reaction between host and parasite as a possible cause of pathogenicity Nature (London) 193, 151.

78) GARCIA TAMAYO F., CARRILLO ., SILVA-SOSA M. 1989 Enterobacterial common antigen in the urine from children with cancer . Arch. Investig. Med. (Mex) 20, 137.

79) KEAST D., WALTERS M. N. 1968 Pathology of the murine runtling and its modification by neomycin sulphate gavages. Immunology 15, 267.

80) BACH J. F. 1984 Fisiología de la producción de anticuerpos capítulo 10 En: Inmunología . Edit. Limusa

81) ROITT I., BROSTOFF J., MALE D. 1985 The antibody response In: Immunology C.V. Mosby Company: Gower Medical Publishing.

82) ZIMMERMAN B.T., CANDINO B.P., CAMPBELL P.A. 1986 Silica decreases phagocytosis and bactericidal activity of both macrophages and neutrophils in vitro. Immunology 59, 521.

83) HOLLY M., LIN Y.S., ROGERS T.J. 1988 Induction of suppressor cells by staphylococcal enterotoxin B. Identification of a suppressor cell circuit in the generation of suppressor-effector cells. Immunology 64, 643.

84) BACH J. F. 1984 Inmunidad de injerto y fenómenos de citotoxicidad capítulo 13 En: Inmunología. Edit. Limusa

85) MCGEE D.W., McMURRAY D.N. 1988 Protein malnutrition reduces the IgA immune response to oral antigen by altering B-cell and suppressor T-cell functions Immunology 64, 697.

86) LASTRA DE PARLO D., RAMIREZ A., KUMATE J. 1972 Graft versus host reactions in severe malnutrition of mice and chickens. En: Nutrition Chávez A., Bourges H., Basta H., eds: Basel:Karger Vol. 2, 155-159.

87) BELL R. G., HAZELL L. A., 1975 Influence of dietary protein restriction on immune competence. Effect on the capacity of cells from various lymphoid organs to induce GVH reactions. J. Exp. Med. 141, 127.

88) TAYLOR K. B., THOMAS H. C. 1988 Enfermedades inflamatorias del intestino, En: Inmunología básica y clínica Stites D. P., Stobo J. D., Vivian Wells J. Edit. Manual moderno, 6a edición Capítulo 25 pag 466.