

61
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL ANTIGENO
COMUN DE LAS ENTEROBACTERIAS
EN RATONES RECIEN NACIDOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

RAUL GRACIA NUÑEZ

México, D. F.



1991

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



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	5
CAPITULO 1. ANTECEDENTES	8
1.1. EL ANTIGENO COMUN DE LAS ENTEROBACTERIAS (ECA)	9
1.2. ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL ECA.	12
1.2.1. INMUNOGENICIDAD	12
1.2.2. TOXICIDAD	14
1.2.3. PAPEL COMO FACTOR DE VIRULENCIA	14
1.2.4. ANTICUERPOS ANTI-ECA Y ENFERMEDAD	15
1.2.5. RELACION ANTIGENICA ENTRE EL ECA Y LOS TEJIDOS DE MAMIFEROS	17
1.3. ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE ALGUNOS PRODUCTOS BACTERIANOS	18
1.3.1. INMUNODEFICIENCIAS HUMANAS	20
1.3.2. MODELOS MURINOS DE INMUNODEFICIENCIAS	23
1.3.2.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE ID ADQUIRIDAS	29
OBJETIVO E HIPOTESIS	34
CAPITULO 2. MATERIAL Y METODOS	36
2.1. MATERIAL BIOLOGICO	37
2.2. METODOS	38
2.2.1. INDUCCION DEL SINDROME DEL DESGASTE	38
2.2.2. REGISTRO CORPORAL	40
2.2.3. RESPUESTA DE ANTICUERPOS	40
2.2.4. ANALISIS ESTADISTICO	44
CAPITULO 3. RESULTADOS	45
3.1. ESTUDIO DEL DESGASTE CORPORAL	46
3.2. ESTUDIO DEL DESGASTE INMUNOLOGICO	47
CAPITULO 4. DISCUSION DE RESULTADOS	56
CAPITULO 5. CONCLUSIONES	65
RESUMEN.	67
APENDICE A.	71
APENDICE B.	77
BIBLIOGRAFIA.	79

INTRODUCCION.

La inmunocompetencia de los animales vertebrados puede ser modificada por numerosas sustancias obtenidas de microorganismos. Una parte de estas moléculas han sido calificadas como inmunomoduladores porque tienen una actividad inmunosupresora y, sin embargo, otras dosis pueden estimular el desarrollo y la competencia del sistema inmunológico. El hapteno conocido como antígeno común de las enterobacterias (ECA) ha sido poco estudiado en este sentido. A pesar de su amplia distribución (compartido por las enterobacterias y los tejidos de los mamíferos), su presencia constante en la membrana externa de la pared celular de los gramnegativos no tiene aún un significado biológico definido.

En el presente trabajo se evalúa el potencial inmunotóxico del ECA sobre ratones recién nacidos. Con esta finalidad se estudia la capacidad que tiene este hapteno para inducir una enfermedad de desgaste caracterizada por una deficiencia transitoria en la producción de anticuerpos y un retraso significativo en el desarrollo pondo-estatural de los animales.

Cuando se utilizan productos bacterianos como inductores de un desgaste físico e inmunológico, los ratones recién nacidos presentan un síndrome experimental que ha sido comparado con el

cuadro clínico de las personas que se recuperan de infecciones graves o que tienen enfermedades crónicas y debilitantes. Los animales "desgastados" presentan atrofia del timo, de los ganglios linfáticos y de la médula ósea, y tienen infecciones por microorganismos oportunistas, que les provocan diarreas frecuentes.

Actualmente las inmunodeficiencias experimentales que se pueden inducir en diferentes animales de laboratorio, son utilizadas para estudiar situaciones similares que se observan en ciertas personas que, en alguna etapa de su vida y por diferentes circunstancias, pueden presentar un compromiso selectivo de sus funciones inmunológicas en una forma transitoria o definitiva. Los modelos animales han ayudado a conocer el estado de la inmunocompetencia en el curso de la edad avanzada o del embarazo, en los enfermos que reciben quimioterapia o que padecen infecciones virales, en las personas desnutridas o con cáncer, etc..

Cada modelo animal tiene características inmunológicas particulares que permiten compararlos con diferentes situaciones clínicas y conocer mejor la fisiopatología de cada enfermedad, para proponer el uso de los recursos terapéuticos más adecuados en cada caso.

Ya que el ECA ha sido propuesto como un inmunoestimulante relativamente inocuo, se considera pertinente estudiar si su administración en ratones puede o no provocar algunas de las alteraciones inmunológicas que caracterizan el desgaste inmunológico.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES.

1.1. EL ANTIGENO COMUN DE LAS ENTEROBACTERIAS (ECA).

El antígeno común de las enterobacterias (ECA), fue descubierto por Kunin et al, en 1962 (35, 54); es un componente de la membrana externa de la pared celular de todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (13, 36, 40, 41, 54). Es una molécula anfipática con una cadena hidrofílica de aminoazúcares y una porción hidrofóbica debida al ácido L-glicerofosfatídico. La cadena de aminoazúcares está formada por unidades de repetición heteropoliméricas. Cada unidad está formada de tres aminoazúcares, la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), el ácido N-acetil-D-manosaminourónico (ManNAc) y 4-acetamido-4,6-didesoxi-D-galactosa (4-FucNAc). Esta porción de carbohidratos es la responsable de la especificidad serológica de la molécula, mientras la porción lipídica une la molécula de ECA a la membrana. (3, 4, 23, 41, 49).

Estudios genéticos sobre el ECA han mostrado tres loci involucrados en su biosíntesis: *rfe*, *rff* y *rfb*, este último presente solamente en algunos serotipos de *Salmonella*. Los genes *rfe* y *rff* están localizados a 85 minutos sobre el cromosoma de *E. coli* muy cerca de los genes *flu*. El operón *rfb* se localiza a 44 minutos sobre el cromosoma de *S. typhimurium* (40, 41, 48, 49, 52, 54, 64).

El ECA existe en dos formas: la hapténica y la inmunogénica. La forma hapténica o libre se encuentra en todas las enterobacterias, mientras que la forma inmunogénica solo está presente en algunas mutantes R que contienen un core R1 ó R4 y que carecen de cadena O. En estos microorganismos el ECA está químicamente unido al "core" del lipopolisárido (LPS) y de esta manera adquiere la magnitud molecular necesaria para actuar como un inmunógeno (24, 35, 48, 50). Esta propiedad de ligarse al LPS probablemente se debe a la acción de las enzimas codificadas de los genes *rfa* (54). Las moléculas de ECA hapténico existen como polímeros homólogos dentro de un rango de peso molecular entre 10 000 y 35 000 (3, 4). Estudios realizados por Dell et al. han identificado además una estructura cíclica del ECA hapténico en extractos de *Shigella sonnei*. sin embargo, ésta estructura no ha sido demostrada en otros microorganismos. (3, 8, 17, 23, 31).

Dentro de los métodos serológicos empleados en su determinación se encuentran hemaglutinación, la inhibición de la inmuno-hemólisis, inhibición de la hemaglutinación y la inmunoprecipitación (31, 36, 49, 54, 67).

El ECA es una molécula altamente negativa, termoestable y con gran capacidad para unirse a la superficie de eritrocitos, linfocitos y partículas de látex (40, 41, 54, 54, 62, 67).

1.2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL ECA.

r.a.r. INMUNOGENICIDAD.

Los anticuerpos anti-ECA se obtuvieron inicialmente en conejos que fueron inmunizados con los serotipos 014, 056, 0124, 0144 de *E. coli* (35, 54).

Aunque la unión del ECA al LPS es una condición para su inmunogenicidad, varios estudios han demostrado un efecto inmunosupresor del LPS hacia el ECA, cuando se administran coagregados. Inicialmente se propuso que, el lípido A era el responsable de la inmunosupresión (58, 76). Otros compuestos lipídicos, como la cardiolipina pueden producir el mismo efecto sobre el ECA (54, 73). En tanto la administración de colesterol puede prevenir el efecto inmunosupresor del LPS (73).

Otras características necesarias para la inmunogenicidad del ECA, son el tamaño de sus partículas, la conformación (75), y el acarreador. Los estudios hechos por Kuhn et al (32, 33) con extractos de membranas de enterobacterias que contenían ECA no-inmunogénico, lograron estimular la producción de títulos de anticuerpos anti-ECA. Lo mismo se ha obtenido uniéndolo a proteínas hidrofóbicas que le confieren la inmunogenicidad necesaria para estimular la síntesis de anticuerpos que pueden ser titulados por una HA pasiva.

La posibilidad de que coagregados de ECA-LPS sean inductores de tolerancia también se ha citado para explicar la falta de respuesta hacia el ECA (34, 75).

Estudios realizados en suero de conejos inmunizados con ECA han mostrado que los anticuerpos son principalmente Igm (74). Algunas cepas de ratones responden deficientemente al ECA. Pero se han encontrado otras cepas murinas respondedoras, como la C57B1/6HA, CBA/St y CH1 (19, 54).

Al investigar la producción de anticuerpos y la respuesta de hipersensibilidad tardía en cobayos inmunizados con ECA se ha encontrado que los animales con títulos bajos de anticuerpos anti-ECA dan reacciones cutáneas positivas. Sin embargo, estos resultados pudieron ser provocados por LPS contaminante, ya que un extracto de *Pseudomonas* (ECA negativo) utilizado como control también causó eritema e induración (47).

En humanos inmunizados con ECA proveniente de *E. coli* 0111 se encontraron títulos de anticuerpos séricos entre 1:160 a 1:1280 junto con aumento de la actividad opsonizante (20, 71).

1.2.2. TOXICIDAD.

Kunin (36) encontró que al inyectar en conejos dosis de 300 µg de ECA, los animales presentaron fiebre, pero no otro efecto dañino, mientras el LPS utilizado como control fue letal en dosis de 25 µg. El mismo efecto fue observado por Johns et al. (61) utilizando una dosis de ECA 250 µg. En este caso, el LPS fue 100 veces más activo como pirógeno. Kessel et al (41, 54), evaluaron la toxicidad del ECA en ratones adultos HaICR. El ECA no provocó la muerte de los animales en dosis de 1000 µg.

En las pruebas realizadas, las dosis de ECA requeridas para producir un efecto pirogénico u otro efecto tóxico fueron tan elevadas que, probablemente la actividad biológica observada estuvo causada por la contaminación del ECA con LPS (34).

1.2.3. PAPEL COMO FACTOR DE VIRULENCIA

La participación del ECA en las propiedades patogénicas de las enterobacterias ha sido demostrada por Valtonen et al. Ellos encontraron que al inyectar ratones con cepas de *S. typhi* ECA (+) y ECA (-), el valor de LD₅₀ fue mucho mayor (10 veces) en las cepas ECA (-). Estos resultados parecen indicar que el ECA es necesario para la expresión del potencial patogénico de las enterobacterias.

Se ha estudiado el mecanismo de acción del ECA como factor de virulencia, pero los resultados no han sido satisfactorios (54). En México se han obtenido resultados contradictorios ya que, en niños menores de 6 meses de edad, las cepas de E. coli aisladas en el curso de episodios diarréicos presentan un contenido de ECA inferior al de los mismos serotipos de E. coli aislados durante la convalecencia (16).

1.2.4. ANTICUERPOS ANTI-ECA Y ENFERMEDAD.

En humanos han sido encontrados bajos niveles de anticuerpos anti-ECA en cordón umbilical, mientras que en calostro los niveles de anticuerpos anti-ECA se presentan más elevados (37, 54, 74).

La presencia de los anticuerpos anti-ECA ha sido demostrada en varias muestras de sueros humanos de donadores sanos (34, 74). También en los sueros de caballo, gatos, perros y puercos se han encontrado cantidades apreciables de anticuerpos anti-ECA. A diferencia, en los sueros de conejos no se ha observado una actividad anti-ECA (37). La presencia de los anticuerpos en el suero de los animales ha sido relacionada con el predominio de bacterias gramnegativas en el intestino (54).

Algunas de las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* pueden ser importantes microorganismos patógenos para el hombre, ya que provocan infecciones de los tractos urinario y gastrointestinal, así como de la cavidad peritoneal. Los anticuerpos elevados contra un componente común a todas las enterobacterias pueden ser utilizados como elementos de juicio para el diagnóstico de estas enfermedades (54).

Varios autores han estudiado la relación de los anticuerpos anti-ECA y el curso de algunas enfermedades. Han podido demostrarse títulos elevados de anticuerpos anti-ECA en shigellosis, peritonitis e infecciones crónicas del tracto urinario (9, 57). En el estudio realizado por Neter et al. (57), al 60% de los pacientes con peritonitis mostraron un incremento de 4 veces los niveles de anticuerpos anti-ECA comparados con los encontrados en personas sanas. Lo mismo ha sido observado en personas con pancreatitis. Mientras, en enteritis (*Salmonella* o *E. coli*), bacteremia e infecciones agudas del tracto urinario se han encontrado niveles bajos de estos anticuerpos (50).

También, dentro de un marco etiológico de alcoholismo, pacientes con diferentes grados de pancreatitis y cirrosis hepática presentan títulos de anticuerpos anti-ECA altos. Manifestándose en algunos pacientes septicemia y en otros no, durante el curso de la enfermedad y grado de pancreatitis.

Al mismo tiempo se han llevado a cabo investigaciones sobre la capacidad protectora del ECA o de la respuesta que induce en modelos experimentales. Se ha evaluado la interferencia de anticuerpos anti-ECA sobre el progreso de estados de bacteremia causados por gramnegativos en ratones y de pielonefritis en conejos. Los resultados fueron poco satisfactorios (32).

1.2.5. RELACION ANTIGENICA ENTRE EL ECA Y LOS TEJIDOS DE MANIFEROS.

El cruce antigénico que ha sido demostrado entre los microorganismos y los tejidos del hospedero, ha sido propuesto como un mecanismo involucrado en la patogénesis de ciertas enfermedades autoinmunes.

En el suero de pacientes con colitis ulcerativa, (una enfermedad crónica con posible etiología autoinmune), se han encontrado anticuerpos que reaccionan con antígenos intestinales de colon. Los anticuerpos presentes en estos sueros, así como los que aparecen en los sueros de ratas inyectadas con tejido de colon proveniente de conejo, pueden dar reacciones cruzadas con ECA (31, 46).

Gorzynski encontró en ratones antígenos de reacción cruzada con ECA en hígado, bazo y riñones (21). Holmgren demostró

en humanos, antígenos de reacción cruzada entre tejidos de riñón y *E. coli*. Estos hallazgos sugieren la posible participación del ECA en el desarrollo de una reacción autoinmune (54).

En extractos de linfocitos humanos y de ratones, también se demostraron determinantes comunes a las bacterias gramnegativas (14, 15).

Para explicar la amplia distribución del ECA se ha propuesto la ubicuidad de las enzimas que participan en su síntesis (3, 48). También se ha sugerido que la presencia del ECA en los tejidos de los mamíferos es una consecuencia de la absorción intestinal de los residuos lipopolisacáridicos de las enterobacterias comensales o de la traslocalización de las mismas, cuando la inmunidad del huésped está comprometida (15). Como una prueba de lo anterior, los determinantes antigénicos del ECA han sido encontrados en la orina de niños con cáncer (16).

1.3. ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE ALGUNOS PRODUCTOS BACTERIANOS.

La interacción de los animales vertebrados con algunos virus y bacterias puede causar alteraciones en la modulación del sistema inmunitario. Estos microorganismos pueden eliminar algunas subpoblaciones de linfocitos o suprimir transitoriamente sus funciones. En este sentido, los virus han sido los más estudiados por su potencial como agentes inductores de supresión.

La actividad inmunomoduladora de las bacterias ha sido ampliamente estudiada. La mayoría de los trabajos se han enfocado a la molécula del LPS, la cual puede actuar tanto como un adyuvante o como un agente inmunosupresor.

No obstante, se han llevado a cabo pocos estudios sobre la actividad inmunomoduladora del antígeno común de las enterobacterias (ECA).

La contribución de los productos de los gramnegativos en la síntesis de anticuerpos, ha podido ser considerada después de conocer el escaso desarrollo del sistema inmunológico y la baja producción de anticuerpos en los animales libres de gérmenes.

Los LPS estimulan inespecíficamente la proliferación policlonal de los linfocitos B, potencializan las funciones de los linfocitos T y activan los macrófagos provocando la liberación de sus mediadores y la regulación del tejido linfoide. La principal fuente de LPS son las bacterias gramnegativas comensales en la orofaringe, el tubo digestivo y el tracto urogenital, las cuales han sido propuestas como "moduladoras" de la respuesta inmunológica de los animales con los cuales conviven.

El ECA ha sido descrito como mitógeno y activador policlonal de linfocitos B (17). A pesar de que estas actividades lo relacionan con el sistema inmunológico, todavía continúa sin aclararse el significado de su localización en diferentes tejidos de mamíferos.

A pesar de su aparente inocuidad en relación con los LPS, el ECA parece intervenir en los mecanismos que regulan la invasividad de ciertos patógenos del intestino y está relacionado con algunas enfermedades autoinmunes del tubo digestivo.

Como se citó anteriormente, no se han logrado los resultados que se esperaban al investigar la resistencia conferida por el ECA contra las infecciones por bacterias gramnegativas. En cuanto a la mayoría de las investigaciones clínicas del ECA en relación a su presencia o a la elevación de anticuerpos anti-ECA, sólo han servido como pruebas que permiten revelar o confirmar las infecciones por las enterobacterias (16).

r.3.r. INMUNODEFICIENCIAS HUMANAS.

Las alteraciones que ocurren sobre el sistema inmunológico se pueden manifestar en el organismo como inmunodeficiencias (ID). Estos trastornos se deben a la ausencia de alguno de los componentes inmunológicos o a su falta de funcionalidad (53, 69).

Las manifestaciones generales asociadas con las ID están relacionadas con la susceptibilidad a las infecciones recurrentes, las cuales pueden manifestarse por irritabilidad, distensión

abdominal, hepatoesplenomegalia y anomalías respiratorias, intestinales, endócrinas y neurológicas (69).

Las ID se clasifican en primarias o secundarias. Las ID primarias comprenden enfermedades genéticamente determinadas, graves y poco frecuentes, dentro de las cuales se pueden citar como ejemplos clásicos el síndrome de DiGeorge y la hipogammaglobulinemia ligada al sexo.

Las ID secundarias comprenden desórdenes inmunológicos consecutivos a una gama de padecimientos, siendo éstas ID transitorias o progresivas y mucho más frecuentes que las primarias. Las situaciones clínicas que cursan con alteraciones inmunológicas pueden ser las infecciones como rubéola, sarampión, lepra, tuberculosis, coccidioidomicosis; las enfermedades neoplásicas malignas, las enfermedades autoinmunitarias, las enfermedades por pérdida de proteínas como síndrome nefrótico y enteropatías y en otros padecimientos como diabetes, desnutrición y quemaduras (65, 69).

Una de las causas más frecuentes de ID secundarias, es la producida por medicamentos como: 6-mercaptopurina, metotrexato, aminopterina, ametofterina, ciclofosfamida, glucocorticoides, antibióticos, etc., que como consecuencia de su administración

Breve o prolongada, causan alteraciones en el sistema inmunitario, ya que estos medicamentos actúan como inmunosupresores en el organismo administrado.

Se ha observado que las dosis altas de ciclofosfamida potencian la hipersensibilidad tardía y deprimen la respuesta de anticuerpos a un antígeno timo dependiente como GRC. Así como las pequeñas dosis de metotrexato son efectivos terapéuticos en pacientes con artritis reumatoide severa. El metotrexato inhibe directamente la proliferación de células $LyT-2^+$ supresor/citotóxico en el bazo de los ratones F1 con reacción de GvH.

Otro de los compuestos que suprime la respuesta inmunitaria es la dimetilnitrosamina (DMN), ya que los animales expuestos a este medicamento exhiben reducción de la respuesta humoral, mitogénesis de células T y actividad bactericida de macrófagos alveolares (AM). Pero se incrementa la mitogénesis de células B, la actividad de células NK y la hipersensibilidad tardía (1, 15, 56).

Tales medicamentos tienen una manera muy peculiar de alterar el sistema inmunológico, así como en células no especializadas de los diferentes tejidos, teniendo como consecuencia las alteraciones mencionadas anteriormente.

En humanos las inmunodeficiencias primarias se clasifican en cinco grupos, de acuerdo al componente afectado:

1) *Enfermedades por inmunodeficiencias de anticuerpos*, como ejemplos se citan la hipogammaglobulinemia infantil ligada al sexo, las deficiencias selectivas de IgA, IgM o IgG, la inmunodeficiencia secundaria de células B, asociada a medicamentos y a estado de pérdida de proteínas y la enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X.

2) *Enfermedades por inmunodeficiencia celular*, en las que se encuentran el síndrome de DiGeorge y la candidiasis mucocutánea crónica.

3) *Enfermedades por inmunodeficiencia combinada* que comprenden la inmunodeficiencia combinada severa, el síndrome de Nezelof, la ataxia telangiectasia, el síndrome de Wiscott Aldrich, la inmunodeficiencia con timoma; la inmunodeficiencia con enanismo, la ID con deficiencia de ADA y el SIDA.

4) *Disfunción fagocitaria*, por ejemplo la enfermedad granulomatosa crónica, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la deficiencia de mieloperoxidasa, el síndrome de Chediak-Higashi y el síndrome de Job y,

5) *Anormalidades del sistema complemento*. Han sido reportados defectos en casi todos los componentes del complemento (65, 69).

1.3.2. MODELOS MURINOS DE INMUNODEFICIENCIAS.

Numerosas investigaciones sobre el sistema inmunológico en humanos, tanto en estado normal como patológico, se han aclarado por los estudios de anomalías inmunológicas en animales de experimentación. Los defectos inmunológicos congénitos en ratones han sido estudiados extensamente como modelos de inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes en el hombre (53, 68).

A continuación se describen las principales características inmunológicas de estos modelos murinos:

RATONES "NUDE". CONGENITAMENTE ATÍPICOS.

Mutación recesiva "nu" sobre el cromosoma 11. Los animales presentan timo rudimentario y cístico, disminución de células T, actividad antitumoral elevada de macrófagos y células NK y expresión anormal de antígenos Ia sobre células epiteliales. Esta ID está considerada como un modelo animal del síndrome de DiGeorge en niños (53, 68).

RATONES CON INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA.

Mutación recesiva "scid" sobre el cromosoma 16. Los ratones tienen reducido el número de linfocitos T y B, y consecuentemente alterada la inmunidad celular y humoral. En estos animales se

presentan normales los precursores mieloides y la función APC, así como la actividad NK; pero muestran defectos en el rearreglo genético de los receptores para Ag. Se considera modelo de ID combinada severa en humanos (68).

RATONES CON INMUNODEFICIENCIA LIGADA AL CRONOSOMA X.

Mutación recesiva "xid". Se caracteriza por falta de disminución de la concentración de las inmunoglobulinas séricas IgM e IgG3, así como de la respuesta proliferativa a mitógenos de células B; ausencia de linfocitos B maduros por falla en la expresión de los Ag de diferenciación Lyb3, Lby5, Lby7 y Mls; defectos en la respuesta humoral a polisacáridos. Aunque el síndrome de Wiskott Aldrich se considera similar a la mutación xid, los defectos en la función de linfocitos T y plaquetas de la enfermedad humana no son característicos de los ratones (25, 66, 68).

RATONES CON MUTACIONES QUE DARAN LA RESPUESTA A LPS.

Mutación codominante "Lps" sobre el cromosoma 4. Cuando son estimulados con LPS, las células B presentan una proliferación policlonal disminuida y los macrófagos tienen alteradas sus capacidades tumoricida y de producción de IFN. El defecto en la respuesta a LPS por las células B probablemente se deba a un daño

en la traducción de señales membranales que siguen luego de la unión del LPS. Este modelo pueda ser útil en el estudio de los mecanismos de respuesta biológica a LPS (53, 68).

RATONES CON DEFICIENCIAS EN EL SISTEMA COMPLEMENTO.

Las deficiencias del complemento (C') han sido descritas en animales de experimentación y en el hombre. En modelos murinos, la deficiencia de C5 se debe a una mutación recesiva "Hc" sobre el cromosoma 2, es la más grave y se caracteriza por ausencia del componente C5 y por tanto carencia de actividad hemolítica en suero. La alteración se localiza en el macrófago, ya que la célula produce pro-C5 pero no la secreta. Los ratones muestran un incremento de la susceptibilidad a microorganismos patógenos y enfermedades autoinmunes (síndrome parecido a SLE), y tienen dañada la respuesta quimiotáctica de neutrófilos y disminuida su habilidad de rechazo de trasplantes de células tumorales.

La deficiencia del componente C4 se debe a alteraciones recesivas sobre la región S del complejo H-2 en el cromosoma 17 y se encuentran en los haplotipos H-2K, H-2W7, H-2W16 y H-2 19. La reducida eficiencia hemolítica de C4 probablemente se deba a la ausencia de carbohidratos en la cadena alfa de la molécula. El defecto en C4 causa un síndrome parecido a SLE, pero no está asociado con susceptibilidad a infecciones (68).

RATONES INHUNODEFICIENTES CON AUTOINMUNIDAD SISTEMICA.

Existen varias mutaciones que generan inmunodeficiencias íntimamente relacionadas con la aparición de la autoinmunidad. La mutación recesiva "lpr" o linfoproliferación presenta dentro de sus características linfadenopatía, incremento del protooncogene myb y múltiples autoanticuerpos. Es un modelo de artritis reumatoide.

La mutación "gaa" o acelerador autoinmune unido al cromosoma Y presenta un síndrome parecido al lupus con linfoproliferación de células B. Los ratones NZB y NZB/NZW son modelos poligénicos de autoinmunidad incluyendo nefritis por complejos inmunes. Posible modelo de SLE (53).

RATONES CON MUTACIONES QUE AFECTAN LA PIGMENTACION.

Los ratones beige con la mutación "bg" en el cromosoma 13 muestran baja actividad NK, quimiotaxis de neutrófilos alterada, defecto en la respuesta de linfocitos T citotóxicos y gránulos lisosomales anormales (53). Posible modelo de la enfermedad de Chediak-Higashi.

RATONES CON MUTACIONES QUE AFECTAN GLANDULAS ENDOCRINAS.

En los cromosomas 16, 1 y 6 se encuentran las mutaciones recesivas enano "dw", "df" y "lt", con deficiencia en la

producción de la hormona del crecimiento, debido a defectos primarios en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria.

Los ratones *dw* y *df* muestran defectos en la función mediada por células asociadas con involución temprana del timo. La reconstitución hormonal con GH y tiroxina corrige algunas deficiencias dependientes del timo.

Otras alteraciones hormonales, son las mutaciones que se encuentran sobre los cromosomas 4 y 6 conocidas como obesidad diabética "*db*" y "*ob*". Incluyen características como hiperinsulinemia, hiperfagia, obesidad y necrosis de las células beta del páncreas. En estos ratones prevalece el incremento de infecciones, así como disfunción de linfocitos T y autoinmunidad asociadas con anomalías tónicas. (68).

RATONES MUTANTES CON ALTERACIONES NEURO-MUSCULARES.

En 1972 fueron descritos los ratones "*wasted*" o desgastados con la mutación espontánea recesiva "*wst*" sobre el cromosoma 2. Son reconocidos a los 20 días de edad por incoordinación en los movimientos corporales y tembor, desarrollan parálisis progresiva y mueren a los 30 días de edad con degeneración de neuronas en el cerebro y la médula espinal.

Las anomalías inmunológicas en estos animales comprenden marcada hipoplasia linfoide, afectando tanto las áreas timo dependientes como las timo independientes de los órganos linfoides, disminuyendo así la respuesta DTH.

En estudios realizados por Kaiserlian et al se mostró que los animales desgastados presentaron una marcada deficiencia de células plasmáticas productoras de IgA a nivel de la lámina propia y la submucosa del intestino. Se comprobó que esta deficiencia de células plasmáticas de IgA no se debió a una deficiencia nutricional, ya que los bastigos desnutridos no presentaron ésta alteración a pesar de existir desgaste en el peso corporal.

Se propone que la mutación "wst", es una alteración del gene estructural para ADA y comparte características con la enfermedad humana Ataxia Telangiectasia. Estos ratones muestran dañados los mecanismos de reparación del DNA, que son alteraciones ya establecidas en los pacientes con AT. Resultan un modelo útil para el estudio de las relaciones entre neuropatología, inmunodeficiencias, aberraciones cromosómicas y reparación del DNA (24, 29, 30, 68, 70).

1.3.2.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE INMUNODEFICIENCIAS ADQUIRIDAS.

Además de las enfermedades congénitas mencionadas anteriormente que pueden ser consideradas como modelos animales de las inmunodeficiencias primarias que se observan en algunos

niños, existe una gama de trastornos inmunológicos que pueden ser provocados experimentalmente en varias especies de animales de laboratorio y que representan modelos de inmunodeficiencias adquiridas o secundarias. En este capítulo se pueden considerar los animales desnutridos por la ingesta de diferentes dietas hipocalóricas o hipoproteicas, los animales inmunosuprimidos por la administración de fármacos o radiaciones, los animales sometidos a quemaduras o mantenidos vivos hasta su envejecimiento, etc.. Todos estos y muchos otros modelos experimentales han sido útiles para el estudio de los mecanismos por los cuales se produce la inmunodeficiencia y para el desarrollo de medidas preventivas o terapéuticas que luego se han tratado de aplicar a las personas. Son muy numerosos los estudios sobre los animales inmunodeficientes a causa del cáncer o una desnutrición grave que reciben como tratamiento diferentes sustancias inmunoadyuvantes con el fin de probar la utilidad y toxicidad de las mismas.

Entre todos estos modelos de inmunodeficiencias animales provocadas experimentalmente, vamos a inferir solamente la enfermedad de desgaste, ya que su inducción, cuadro clínico y alteraciones inmunológicas se relacionan directamente con los objetivos del presente trabajo.

La enfermedad de desgaste es un modelo experimental que puede ser inducido por diferentes procedimientos entre los cuales podemos citar: timectomía neonatal, radiaciones, tratamiento con hormonas o con bacterias y productos bacterianos (12). Según la técnica utilizada para su inducción puede ser de carácter transitorio o definitivo (28, 42).

Las principales alteraciones que han sido descritas se presentan a nivel corporal, a nivel glandular y sobre el tejido linfoide (61). La frecuencia con la cual se presentan todas estas alteraciones varían, según el procedimiento para inducir el síndrome, la edad del animal, el sexo, etc.. De este modo se pueden obtener, dentro de un mismo modelo, varias herramientas experimentales que, junto con las condiciones de mantenimiento menos estrictas, ofrecen algunas ventajas sobre los modelos genéticos (12, 61).

Las manifestaciones características de la enfermedad provocada por productos bacterianos son:

- 1) Retraso del desarrollo corporal.
- 2) Depresión de la respuesta de anticuerpos.
- 3) Susceptibilidad a infecciones por microorganismos oportunistas.

4) Atrofia temporal de órganos linfoides.

5) Hiperactividad, postura encorvada, pelo ralo, diarrea. (12).

Este modelo de inmunodeficiencia secundaria permitió demostrar las propiedades inmunosupresoras de los productos bacterianos y, por tanto las consecuencias inmunológicas de infecciones graves (28, 43).

Con base en los resultados de varios experimentos, como los realizados con animales en condiciones axénicas o que estudian la translocalización bacteriana (12, 28), se ha propuesto que, para el desarrollo de la enfermedad, los productos bacterianos estimulan las células fagocíticas locales con la consiguiente liberación de sus mediadores. Posteriormente ocurre una depresión en la síntesis de anticuerpos y, como consecuencia las bacterias comensales se diseminan hacia otros tejidos, estimulando las células fagocíticas que liberarán gran cantidad de citocinas entre ellas el TNF. Una producción exagerada de todos estos mediadores puede ser la causa del desgaste físico e inmunológico.

En los últimos años, el aumento de las personas que tienen comprometida su inmunidad y presentan infecciones recurrentes, ha estimulado numerosos estudios sobre las relaciones entre la inmunocompetencia del hospedero y las diversas actividades biológicas que dependen de los microorganismos. Por esta razón el modelo de la enfermedad de desgaste tiene

actualmente gran importancia como herramienta de estudio. Se puede citar el caso del desgaste físico e inmunológico de los enfermos con SIDA y los estudios que se realizan sobre sus infecciones por oportunistas ya que se considera que, en una buena medida, ellos son responsables del deterioro físico e inmunológico de los pacientes.

OBJETIVO E HIPOTESIS.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar la toxicidad del ECA sobre la inmunocompetencia y el desarrollo físico de ratones recién nacidos.

Como ya se han publicado los resultados de experimentos anteriores, que han estudiado la DL50 y que han revelado la inocuidad del ECA, en este trabajo se propone continuar estos estudios probando si una serie repetida de inyecciones IP de ECA durante un mes podría alterar la tasa de crecimiento y desarrollo de los animales, así como el estado de su competencia inmunológica para formar anticuerpos anti-eritrocitos. Con esta finalidad se escogió el modelo de inyecciones intraperitoneales propuesto por Esktedt para inducir un síndrome de desgaste.

La hipótesis de trabajo, propone que la inyección repetida de ECA en ratones recién nacidos puede inducir la aparición de un síndrome de desgaste.

CAPITULO 2.

MATERIAL Y METODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

s.r.s. ECA proveniente de *E. coli* 014 en concentraciones de 1, 5 y 10 mg/ml.

La cepa de *E. coli* 014 proporcionada por el cepario de la Facultad de Química, fue cultivada en TSA a 37 C durante 18h. Las bacterias fueron lavadas, liofilizadas y conservadas a temperatura ambiente. Para la extracción del ECA se preparó una suspensión de 10g de bacterias liofilizadas en 200 ml de agua destilada, la cual se calentó en baño de María a 100 C por 2h. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 5000 rpm/min para separar el sobrenadante.

Al sobrenadante se le agregó etanol al 95% hasta obtener una concentración final del 85% de alcohol. La mezcla se mantuvo en reposo a temperatura ambiente por 18h, hasta que se formaron dos fracciones: la insoluble y la soluble en etanol.

La fracción soluble que contiene el ECA fue separada por centrifugación a 2500 rpm durante 30 minutos y se deshidrató por calentamiento a 60 C. El material así obtenido se almacenó en frascos ampolla y se conservó en refrigeración hasta su uso.

Para preparar las diferentes soluciones de ECA, se pesaron las cantidades necesarias y se disolvieron en agua desionizada. Su esterilización se llevó a cabo por filtración en

membrana de nitrocelulosa (diámetro de poro 22 micras), y su almacenamiento fue en frascos ampula, los cuales se conservaron a 4 C hasta el momento de utilizar el producto.

2.1.2. SOLUCION FISIOLOGICA libre de pirógenos (Abbott Laboratorios de México, S.A de C.V.).

2.1.3. ANIMALES Ratones CDI recién nacidos.

Estos animales recibieron alimento nutricubos Purina y agua "ad libitum". Al nacer las crías se inició su tratamiento dentro de las 2h posteriores a su nacimiento, los animales fueron alimentados naturalmente por sus progenitores hasta transcurridos 21 días. Posteriormente fueron separados de ellos y recibieron alimento comercial y agua "ad libitum" hasta los 40 días de vida (Apéndice A).

2.2. METODOS.

2.2.1. INDUCCION DEL SINDROME DEL DESGASTE.

Los animales recibieron el producto bacteriano de acuerdo al esquema de inoculaciones IP ya propuesto. Las dosis fueron seleccionadas según criterios personales.

Los animales fueron agrupados de acuerdo a su tratamiento como problemas y testigos. Los ratones problemas a su vez se dividieron en tres grupos, cada uno de los cuales fue inoculado IP, cada tercer día y durante un mes con diferentes dosis de ECA: 100, 500 y 1000 µg/ratón.

RATONES CD1 DE LOS GRUPO PROBLEMA.

Se utilizaron 43 ratones CD1 con menos de 2h de edad, los cuales fueron separados en los 3 grupos experimentales. Los 18 ratones del grupo I recibieron intraperitonealmente una inyección de 0.1 ml de ECA en dosis de 100 µg de ECA/ratón. El grupo II compuesto por 10 ratones recibieron inyecciones IP de 0.1 ml de ECA en dosis de 500 µg de ECA/ratón. Y los ratones del grupo III compuesto de 15 animales, recibieron IP una inyección de 0.1 ml de ECA en dosis de 1000 µg de ECA/ratón durante un mes, cada tercer día en cada uno de los grupos mencionados.

RATONES CD1 DEL GRUPO TESTIGO

31 ratones CD1 con menos de 2h de edad, recibieron intraperitonealmente una inyección de 0.1ml de solución fisiológica libre de pirógenos y posteriormente cada tercer día durante 4 semanas.

2.2.2. REGISTRO CORPORAL.

Como índice del desgaste corporal, se llevó a cabo el registro diario del peso corporal promedio/camada; tanto de los animales problema como de los testigos.

2.2.3. RESPUESTA DE ANTICUERPOS.

La respuesta de anticuerpos fue medida como la capacidad de los animales para formar células productoras de anticuerpos anti-eritrocitos después de una inmunización practicada cinco días antes.

Una vez terminado el tratamiento de los ratones problemas y testigos con ECA o sol. fisiológica se dejaron trascurrir 5 días para administrarles, por vía intraperitoneal, una sola dosis de 0.25ml de una suspensión de GRC al 15%. Cinco días después de la inmunización, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se obtuvieron los bazo y se disgregaron en solución salina balanceada (BSS, Apendice A) a fin de separar las células linfoides y poder evaluar mediante la técnica de Cunningham el número de CFA/10 cél. de bazo.

A continuación se describe el fundamento y los pasos de la técnica que se empleó en el estudio.

FUNDAMENTO

La capacidad de un linfocito para producir anticuerpos *in vitro*, puede valorarse mediante la técnica de hemólisis localizada en gel desarrollada por Jerne (62) y modificada por Cunningham (63). En la técnica de Jerne células linfoides estimuladas recientemente con GRC se ponen en contacto nuevamente con eritrocitos dentro de un soporte de agarosa. Los anticuerpos producidos por los linfocitos (CFA) se difunden en el medio y se unen a los eritrocitos cercanos.

Esta reacción se hace visible por la participación del complemento (C'), el cual se activa por los complejos Ag-Ac que se forman sobre la membrana de las células sensibilizadas. La reacción se manifiesta macroscópicamente como placas de hemólisis. En la modificación de Cunningham la mezcla de células y C' se lleva a cabo en medio líquido y la suspensión resultante se introduce dentro de una cámara que permite la formación de una monocapa celular. De este modo se favorece la visualización y la cuenta de los halos de hemólisis.

TECNICA

1. El bazo de cada ratón se disgregó en 4 ml de BSS. El tejido disgregado se colocó en un tubo de ensayo y se dejó reposar en el hielo durante 5 minutos lo que favoreció el depósito de fragmentos de tejido.

2. Para obtener las células esplénicas se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos.

3. Las células se lavaron dos veces con BSS, por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Al final se resuspendieron en 4 ml de BSS.

4. Se tomó una alícuota de la suspensión para preparar una dilución 1:20 en una solución de azul tripano al 10% . (con la dilución se llenó la cámara de Neubauer y se contó al microscopio con aumento 40X el número de células viables por ml). Para conocer la viabilidad de los linfocitos, fue realizado con cada suspensión que se preparaba, fijandose como criterio de eliminación, una viabilidad inferior al 95%

5. El número de células fue ajustado en BSS a 5×10^6 cél/ml.

6. La suspensión de células de cada bazo, ajustada a 5×10^6 cél/ml, se mezcló con GRC al 8% y suero de criceto 1:10 (Apéndice A), en las siguientes proporciones:

200 ul de una suspensión cél bazo 5×10^6 cél/ml

100 ul de una suspensión GRC 8%

200 ul de suero de criceto 1:10 (Apéndice A)

7. Con la mezcla anterior se llenaron por duplicado las cámaras de Cunningham (Apéndice A). Se utilizaron aproximadamente 200 ul de la mezcla por cámara, lo cual se puede considerar aproximadamente

como una repartición de más de 0.4×10^6 cél esplénicas por cámara.

8. Las cámaras fueron selladas con parafina y posteriormente se incubaron durante 60 minutos a 37 C.

9. Se contó el número de placas líticas por cada cámara. Posteriormente se obtuvo el promedio por animal y finalmente se calculó el número de CFA/ 10^6 cél bazo.

2.2.4. ANALISIS ESTADISTICOS.

Como medida de la tendencia central se utilizó la media aritmética. El grado de significancia de las diferencias entre los grupos se calculó mediante una prueba de varianza (Método de Fisher) (78, 79), (Apéndice B).

CAPITULO 3

RESULTADOS.

3.1 ESTUDIO DEL DESGASTE CORPORAL

Las figuras 1, 2 y 3 muestran las curvas de crecimiento de los ratones CDI tratados intraperitonealmente con 100, 500 y 1000 μ g de ECA/ratón, junto con las de crecimiento de sus respectivos testigos tratados con solución fisiológica.

Dentro de las dosis evaluadas en el estudio, no se observaron diferencias significativas entre los pesos promedio/camada del grupo de animales tratados con ECA y los del grupo testigo inyectados con sol. fisiológica. (% Δ <22)

3.2. ESTUDIO DEL DESGASTE INMUNOLOGICO.

La tabla 4 y la figura 4 muestran los valores promedio de CFA/ 10^6 células esplénicas obtenidas en los animales tratados con las diferentes dosis de ECA y en los testigos tratados con solución fisiológica.

En los animales tratados con ECA se observó una disminución en la producción de anticuerpos anti-GRC, la cual fue dependiente de la dosis de ECA administrada IP.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones testigos y los problemas cuando éstos recibieron las dosis de 500 y 1000 μ g ECA/ratón ($P < 0.01$), pero no con la dosis de 100 μ g ECA/ratón ($P > 0.05$).

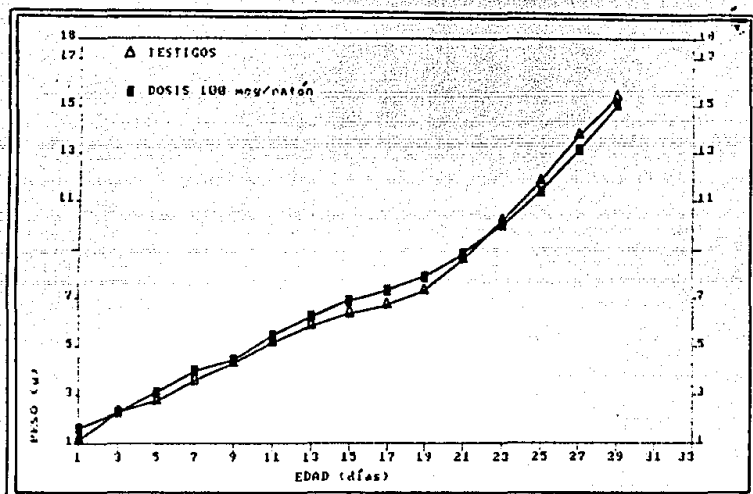
TABLA # 1

Edad (Días)	Peso promedio (gramos) de los ratones CD1.		
	Tratamiento intraperitoneal con: Solución ECA 100 µg/ratón % Δ * Fisiológica		
1	1.75	1.61	8.0
3	2.30	2.32	0.8
5	2.76	3.12	13.0
7	3.64	4.01	10.1
9	4.32	4.48	3.7
11	5.17	5.47	5.8
13	3.86	6.25	6.6
15	6.37	6.90	8.3
17	6.71	7.36	9.6
19	7.30	7.89	8.0
21	8.59	8.87	3.2
23	10.16	10.02	1.3
25	11.78	11.41	3.1
27	13.77	13.17	4.3
29	15.41	15.04	2.4

* % de diferencia en relación al peso de los testigos.

FIGURA # 1

Curva de crecimiento de ratones CDI
tratados con 100 μ y de ECA/ratón



■ Problemas. Peso promedio/camada, en gramos, de los ratones CDI tratados IP con 100 μ y de ECA/ratón

Δ Testigos. Peso promedio/camada, en gramos, de los ratones CDI tratados IP con solución fisiológica.

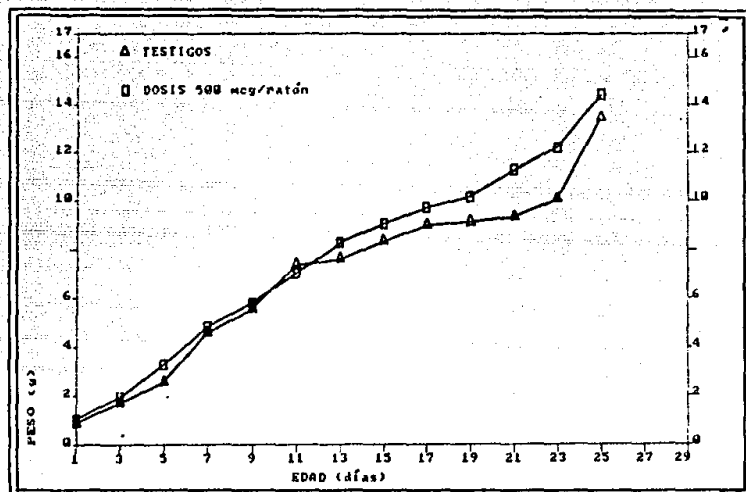
TABLA # 2

Edad (Días)	Peso promedio (gramos) de los ratones CDI.		
	Tratamiento intraperitoneal con:		
	Solución	ECA 500 µg/ratón	% Δ *
	Fisiológica		
1	0.88	1.05	19.3
3	1.71	1.93	12.8
5	2.57	3.29	28.0
7	4.62	4.87	5.4
9	5.56	5.78	3.9
11	7.35	7.04	4.2
13	7.60	8.23	1.0
15	8.32	9.05	8.7
17	8.96	9.72	8.4
19	9.12	10.17	11.5
21	9.28	11.29	21.6
23	10.06	12.21	21.3
25	13.43	14.47	7.7

* % de diferencia en relación al peso de los testigos.

FIGURA # 2

Curva de crecimiento de Ratones CDI
tratados con 500 μ g de ECA/ratón



□ Problemas. Peso promedio/camada, en gramos, de los ratones CDI tratados IP con 500 μ g de ECA/ratón

△ Testigos. Peso promedio/camada, en gramos, de los ratones CDI tratados IP con solución fisiológica.

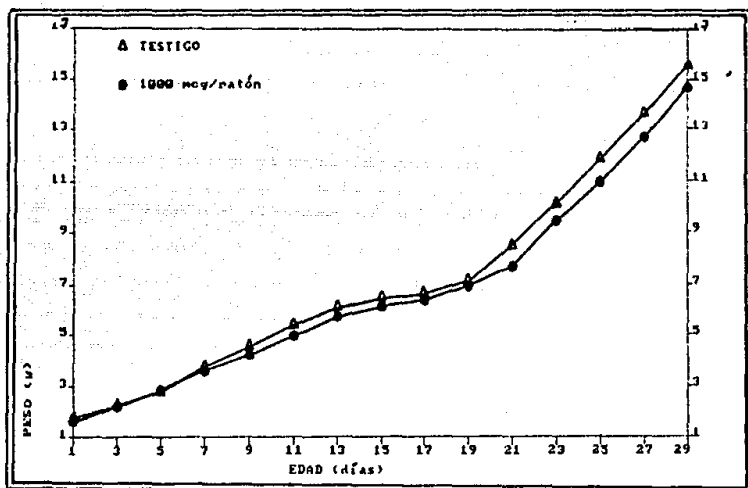
TABLA # 3

Edad (Días)	Peso promedio (gramos) de los ratones CD1.		
	Tratamiento intraperitoneal con:		
	Solución Fisiológica	ECA 1000 µg/ratón	% Δ *
1	1.76	1.62	7.9
3	2.23	2.16	3.1
5	2.73	2.82	3.2
7	3.73	3.58	4.0
9	4.51	4.21	6.6
11	5.38	4.97	8.5
13	6.06	5.70	5.9
15	6.47	6.14	5.1
17	6.59	6.37	3.3
19	7.10	6.92	2.5
21	8.50	7.68	9.6
23	10.08	9.44	6.3
25	11.81	10.93	7.4
27	13.60	12.68	6.7
29	15.54	14.67	5.6

* % de diferencia en relación al peso de los testigos.

FIGURA # 3

Curva de crecimiento de ratones CD1
Tratados con 1000 µg de ECA/ratón



● Problemas. Peso promedio/camada, en gramos, de los ratones CD1 tratados IP con 1000 µg de ECA/ratón

△ Testigos. Peso promedio/camada, en gramos, de los ratones CD1 tratados IP con solución fisiológica.

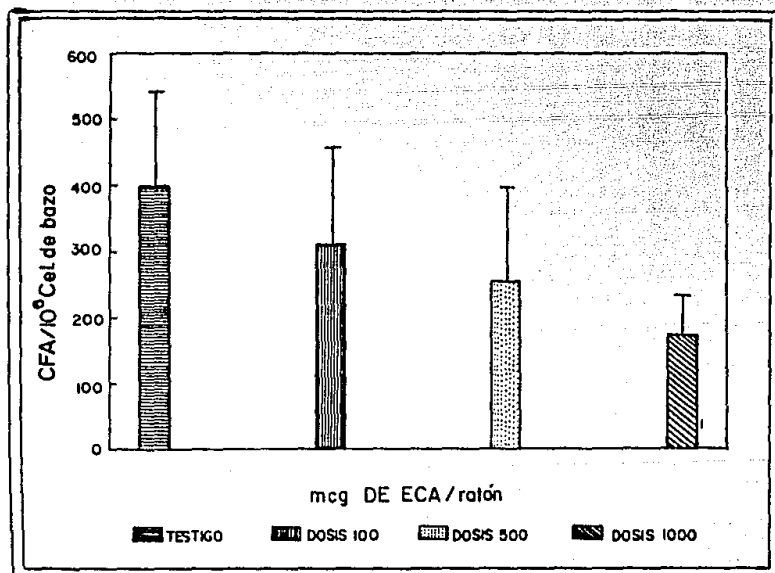
TABLA # 4

Respuesta de Anticuerpos, anti-GRC (CFA/10⁶ Cél. de Bazo) de Ratones CDI tratados con 100, 500, y 1000 µg de ECA/ratón

Tratamiento cons	CFA/10 ⁶ \bar{x}	S	Análisis de Varianza
Sol. Fisiol. n = 31	368.69	143.31	
100 µg/ratón n = 18	310.88	151.96	F = 3.91 P > 0.05
500 µg/ratón n = 10	255.95	135.37	F = 7.32 P < 0.01
1000 µg/ratón n = 15	173.6	59.9	F = 32.59 P < 0.01

FIGURA # 4

Respuesta de Anticuerpos, anti-GRC (CFA/ 10^6 C&I. de bazo) de tres grupos problema de ratones CDI tratados intraperitonealmente con 100, 500 y 1000 μ g de ECA/ratón, y de un grupo control de ratones CDI que solo recibieron SSI por vía IP. Los animales fueron inmunizados a los 35 días de edad y sacrificados 5 días después.



CAPITULO 4
DISCUSION DE RESULTADOS

Este estudio fue utilizado con el objetivo de conocer si la administración intraperitoneal del ECA modificaba o no el desarrollo físico y la competencia inmunológica de un grupo de ratones recién nacidos. Los animales fueron divididos en tres grupos de acuerdo a las cantidades de ECA que les fueron inyectadas.

Al analizar las curvas de crecimiento de los animales tratados con ECA y las curvas de los grupos testigos se encontraron algunas diferencias, aunque ninguna de estas fue significativa.

De acuerdo con las curvas de crecimiento de las figuras 1 y 2, no se puede decir que el ECA no afectó el desarrollo corporal de los ratones, ya que, al contrario de lo esperado, el crecimiento de los animales problema presentó pesos promedio mayores que los testigos. Los pesos promedio solo reflejan una tendencia la cual no fue general. Esto quiere decir que, en cada grupo, hubo tanto ratones que aumentaron de peso como ratones que crecieron a una tasa menor, aún en los animales testigos. Esto hace pensar en dos posibilidades. La primera es que pudo ocurrir una competencia por el alimento materno dentro de las camadas, lo cual no parece probable porque por lo general no se trabajó con

camadas que estuvieran formadas por más de 8 ratones. La segunda estaría dada por la presentación de un fenómeno similar al observado por Eskedt al inocular ratones recién nacidos con estafilococos. Es decir que hubo una susceptibilidad individual al desgaste, de tal modo que unos animales perdieron peso y otros no lo hicieron. Probablemente, con las dosis de ECA que se utilizaron, se pudo presentar un fenómeno similar.

En cambio, con la dosis más alta de ECA, 1000 ug/ratón, sí se observó que la mayoría de los animales tratados presentaron síntomas y signos de la enfermedad de desgaste. Además, los animales de este tercer grupo tuvieron un peso corporal promedio menor al de los testigos. Sin embargo, las diferencias de peso no fueron estadísticamente significativas.

Los resultados del estudio inmunológico revelaron que las dosis de ECA utilizadas tenían un efecto inmunosupresor. Todos los ratones inyectados con ECA mostraron una respuesta de anticuerpos anti-GRC menor, en comparación a la obtenida en los testigos inyectados con solución fisiológica, como puede observarse en la figura 4. Este efecto resultó moderado si se compara con la inmunosupresión que ha sido obtenida por otros autores cuando han utilizado una suspensión de *S. aureus* en la misma cepa CD1 de ratones recién nacidos. Ellos han informado que

la cuenta de CFA/10⁶ ha sido \bar{X} -22.1, que resulta un valor radicalmente menor a los obtenidos en el presente trabajo. (12)

La disminución en la capacidad para formar anticuerpos fue dependiente de la dosis. La cantidad de ECA más baja administrada a los animales (100 µg/ratón), tan solo disminuyó ligeramente el valor promedio de CFA en relación a los testigos; pero al administrar las cantidades de 500 y 1000 µg de ECA/ratón, entonces si se pudo observar un descenso importante de las cantidades de CFA por animal y las diferencias si fueron significativas.

La gran variabilidad genética de la cepa CDI de ratones que fue utilizada no permitió obtener resultados más homogéneos. Por otra parte, no se trabajó con una muestra de ECA completamente purificada, así que probablemente los animales recibieron pequeñas cantidades de endotoxina, las cuales han debido actuar estimulando macrófagos y provocando la liberación de citocinas. El estudio que fue utilizado con la prueba del Limulus (Apéndice A) reveló que, 1 mg de ECA preparado en nuestro laboratorio contenía 4 ng de endotoxina; de modo que se puede calcular fácilmente que los ratones inyectados con 100, 500 y 1000 µg de ECA recibieron simultáneamente cantidades de 0.4 ng, 2.0 ng y 4.0 ng de

endotoxina. Como el rango de la dosis inmunestimulante del LPS se encuentra entre 1 y 5 ó 10 µg/dosis se puede concluir que las inoculaciones de los ratones del presente trabajo no llegaron a introducir estas cantidades a los organismos de los animales. Y que, por consiguiente, los síntomas observados si se pueden atribuir a la acción directa del ECA sobre la inmunocompetencia de los animales.

Otro punto a considerar es la etiología del síndrome del desgaste. Las teorías que han sido propuestas indican que, probablemente, la enfermedad del desgaste es una consecuencia de la translocalización de bacterias comensales gramnegativas desde el intestino hacia otros tejidos de la cavidad abdominal en donde sus residuos lipopolisacáridicos pueden estimular macrófagos. Ahora bien, como los animales del experimento que se presenta, no tienen abolida su capacidad de formar anticuerpos, es probable que las inyecciones de ECA hayan estimulado la producción de anticuerpos anti-ECA y que estos hayan inhibido, total o parcialmente, cualquier fenómeno de translocalización secundario al supuesto efecto tóxico que puedan haber tenido las dosis tan elevadas con las cuales se trabajó. Esta probabilidad plantea una línea de futuros estudios muy interesantes en las cuales se podría intentar el bloqueo de la translocalización o del desgaste.

inmunológico utilizando sueros inmunes, administrados pasivamente a los animales o las personas que se encuentran con la inmunidad deprimida por diferentes causas. De hecho existen trabajos publicados en donde la actividad biológica de la caquectina (TNF) liberada en el curso de una estimulación con LPS puede ser neutralizada administrando suero anti-E. coli.

En el protocolo de investigación presentado para realizar este trabajo, no se contempló la posibilidad anterior y por consiguiente, en los animales sacrificados no se obtuvieron las muestras de suero necesarias para evaluar la respuesta de anticuerpos anti-ECA. La literatura consultada solamente informa que, como una consecuencia de las infecciones por bacterias gramnegativas, se eleva secundariamente los títulos de anticuerpos anti-ECA. Nosotros no probamos la inmunogenicidad del ECA utilizado en el presente experimento, pero, razonando en forma de explicar los resultados, podemos suponer que existe la probabilidad de haber estimulado una respuesta de IgM anti-ECA y que esta pudo muy bien ser una de las causas de que, la mayor parte de los animales no presentaran un fenómeno franco de translocalización bacteriana con la consiguiente aparición de la enfermedad de desgaste. De todos modos, la posibilidad de utilizar los anticuerpos anti-ECA o las inmunizaciones con este

antígeno común de las enterobacterias para detener o disminuir las manifestaciones de una enfermedad desgastante, quedan como una interrogación que solo podrá ser contestada con futuras investigaciones.

Existió sin embargo, una notable divergencia entre el aspecto desgastante (pérdida de peso) que fue mínimo aún a dosis sumamente altas y el efecto inmunosupresor que sí reveló una disminución en la producción de anticuerpos anti-eritrocitos, la cual resultó estadísticamente significativa. No podemos valorar con los resultados del presente trabajo, si esta disminución de las cantidades de células formadoras de anticuerpos anti-GRC refleja o no una depresión global en la síntesis de inmunoglobulinas o es únicamente el resultado de un compromiso de los linfocitos Th. Conviene tener presente que los animales desgastados son linfopénicos y tienen el timo atrófico. Pero también conviene tener presente que el ECA es un antígeno timo-independiente y que, cualquier mínima manifestación de un desgaste inmunológico, probablemente no modificó la capacidad del ECA para ligarse a los receptores de los linfocitos B.

De todos modos conviene destacar que hasta ahora, la literatura consultada solo se había referido al ECA como un

activador policlonal de los linfocitos B. Sin embargo, estos trabajos fueron realizados con dosis muy bajas de este producto bacteriano, el cual para poder inducir este efecto *in vivo* tendría que ser inyectado 12 ó 24 horas después de la administración del inmunógeno. Los resultados del presente trabajo revelan que, a grandes dosis inoculadas intraperitonealmente antes de la administración de los GRC, el ECA deprime significativamente la síntesis de anticuerpos anti-eritrocitos. Este resultado es importante porque confirma que el ECA puede tener la actividad biológica de una sustancia inmunomoduladora. Como el ECA se encuentra presente en la pared celular de casi todas las gramnegativas, se puede considerar que tal actividad biológica sobre el tejido linfoide puede ser importante en el curso de infecciones graves por enterobacterias.

No obstante que el diseño del presente trabajo, de acuerdo a sus objetivos, implicó la utilización de cantidades sumamente elevadas de este producto, es probable que durante la producción de una enfermedad infecciosa grave, el ECA bacteriano no resulte el responsable directo de cualquier depresión de la respuesta del sistema inmunitario que, en todo caso, sería atribuible más fácilmente a las endotoxinas. Aunque son moléculas más fácilmente degradables, éstas últimas se encuentran en mayor

cantidad sobre la pared celular de los microorganismos y no se pueda discutir su participación prioritaria como responsables de las alteraciones inmunológicas que resultan una consecuencia de las infecciones por las enterobacterias.

Estos comentarios sobre los resultados pueden terminar destacando que si el ECA es una molécula que se ha mantenido presente, a todo lo largo de la evolución de las especies, como un componente constante de la superficie de la membrana externa de todas las enterobacterias comensales que habitan el tubo digestivo de los mamíferos, entonces va a ser muy difícil aceptar que su presencia es superflua y que carece de una actividad biológica que sea útil para conservar la salud y la vida.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

El trabajo fue realizado para conocer si la inyección de diferentes cantidades de ECA en ratones CDI recién nacidos podía modificar el desarrollo y la inmunocompetencia de los animales.

Se encontró que la inyección repetida de grandes dosis de ECA en ratones recién nacidos provoca un efecto inmunosupresor, dependiente de la dosis administrada, pero sin inducir las manifestaciones físicas características de la enfermedad de desgaste.

Los resultados no comprueban completamente la hipótesis del trabajo, pero sí contribuyen a un mayor conocimiento sobre la actividad biológica del ECA. Además, el análisis y la discusión de los resultados permite argüir una serie de posibilidades respecto al valor del ECA como inmunógeno o de los anticuerpos anti-ECA como agentes bloqueadores del fenómeno de la translocalización bacteriana que se encuentra íntimamente relacionado al desgaste físico e inmunológico. Los resultados del presente trabajo señalan perspectivas sumamente interesantes que solo podrán ser aclaradas en futuras investigaciones.

RESUMEN

Las inmunodeficiencias secundarias asociadas a múltiples patologías, constituyen un problema de salud pública. El sistema inmunológico de los vertebrados se encuentra frecuentemente comprometido, se pueden citar como ejemplos los períodos de la infancia y la vejez en los cuales se ha demostrado la funcionalidad limitada de los mecanismos de defensa. Así mismo, durante las infecciones bacterianas graves y en algunas enfermedades virales, es común encontrar etapas que cursan con depresión de las funciones del sistema inmunológico. Aún el someterse a stress o sufrir quemaduras graves compromete la funcionalidad del sistema inmunológico y sin lugar a dudas, las enfermedades desgastantes como la desnutrición y cáncer también provocan diferentes alteraciones de la competencia inmunológica.

Estas situaciones representan riesgos para la salud, porque las inmunodeficiencias aumentan la susceptibilidad a las infecciones, agravan sus complicaciones y retardan la curación de muchas enfermedades. Para comprender los mecanismos por los cuales se generan las inmunodeficiencias secundarias, es necesaria la búsqueda de modelos animales que simulen las patologías humanas. Estos modelos también pueden ser muy útiles para la búsqueda de tratamientos inmunoestimulantes o para valorar la toxicidad o la actividad inmunosupresora de otros productos.

Dentro de los modelos murinos de inmunodeficiencias, existen una gran variedad de desórdenes congénitos y adquiridos mediante diferentes procedimientos. La timectomía neonatal, las radiaciones, el tratamiento con hormonas o con bacterias y productos bacterianos son algunos de los agentes inmunosupresores más conocidos. Estos procedimientos provocan un conjunto de alteraciones que pueden simular las alteraciones que se presentan en enfermedades desgastantes humanas. Existe una gran variedad de modelos de inmunodeficiencias que se conocen como enfermedad de desgaste.

En la búsqueda de un modelo para estudiar algunas actividades biológicas del ECA, en el presente trabajo se investigó si esta sustancia podía provocar o no algunos de las principales manifestaciones del síndrome del desgaste.

El material estuvo formado por ratones CDI recién nacidos, los cuales se dividieron en tres grupos que recibieron diferentes dosis de ECA (100, 500 y 1000 μ /ratón respectivamente). Los animales recibieron el tratamiento vía intraperitoneal, tres veces a la semana durante 30 días. A su vez, los animales testigos recibieron solución fisiológica libre de pirógenos por la misma vía a intervalos de tiempo. Se registraron los pesos promedio diarios por camada de los problemas y testigos para utilizarlos como índice del desgaste corporal. La evaluación

inmunológica se llevó a cabo midiendo la respuesta de anticuerpos (CFA), frente a un antígeno timodependiente. Los resultados mostraron que el ECA no fue capaz de producir el síndrome del desgaste, aunque sí pudo provocar una disminución en la respuesta de anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero (GRC). Estos resultados fueron dependientes de la dosis. La administración de 500 y 1000 μ g de ECA/ratón, causaron una disminución de las cantidades de CFA que fueron significativamente inferiores a las cantidades que formaron los ratones que no fueron inyectados con ECA.

El desgaste corporal no se presentó con ninguna de las dosis evaluadas. Comparando las curvas de crecimiento de los ratones que recibieron ECA con el desarrollo corporal de los animales testigos no se observaron diferencias con significancia estadística.

Este trabajo que evalúa la capacidad del ECA para inducir un estado de inmunodeficiencia transitoria, contribuye a un mayor conocimiento sobre las actividades biológicas de este componente bacteriano, aclara la función inmunomoduladora de este hapteno y presenta perspectivas sumamente interesantes para continuar estudiando su valor como inmunógeno y la importancia de los anticuerpos anti-ECA como un mecanismo que puede controlar los fenómenos de translocalización bacteriana.

APENDICE A.

COMPOSICION DE LOS NUTRICUBOS PURINA

Análisis Garantizado

Proteína, mín. -----	23%
Grasa, mín. -----	2.5%
Fibra, máx. -----	6.0%
ELN, mín. -----	48.5%
Humedad, máx. -----	12.0%
Cenizas, máx. -----	8.0%
Calcio, máx. -----	1.0%
Fósforo, mín. -----	0.6%

Composición Química Aproximada

Proteína % -----	23.0
Arginina % -----	1.5
Cistina % -----	0.32
Glicina % -----	1.2
Histidina % -----	0.55
Isoleucina % -----	0.95
Leucina % -----	1.7
Lisina % -----	1.28
Metionina % -----	0.41
Fenilalanina % -----	1.03
Treonina % -----	0.84
Triptófano % -----	0.35
Valina % -----	1.21
Grasa % -----	2.5
Fibra % -----	5.08
TND % -----	75.0
ELN % -----	48.5

Cónizas %	7.3
Calcio %	1.0
Fósforo %	0.6
Potasio %	1.1
Magnesio %	0.21
Sodio %	0.4
Cloro %	0.5
Fluor ppm	35.0
Hierro ppm	198.0
Zinc ppm	58.0
Manganeso ppm	51.0
Cobre ppm	18.0
Cobalto ppm	0.4
Yodo ppm	1.7
Energía Kcal/g	4.25

Vitaminas:

Tiamina ppm	1.0
Riboflavina ppm	8.0
Niacina ppm	95.0
Ac. pantoténico ppm	23.0
Ac. fólico ppm	5.9
Piridoxina ppm	6.0
Biotina ppm	0.07
Vit. B12 ug/lb	10.0
Vit. A UI/g	12.5
Vit. D UI/g	3.0

SOLUCION SALINA BALANCEADA (BSS)

Solución I (10X)

D-glucosa ----- 10.00 g

KH₂PO₄ anh. monobásico ----- 0.60 g

Na₂HPO₄ anh. dibásico ----- 1.89 g

Rojo de fenol ----- 0.01 g

Disolver en agua desionizada y aforar a 1000 ml

Solución II (10X)

CaCl₂ 2H₂O ----- 1.86 g

KCl ----- 4.0 g

NaCl ----- 80.0 g

MgCl 6H₂O ----- 2.0 g

MgSO₄ 7H₂O ----- 2.0 g

Disolver en agua desionizada y aforar a 1000 ml

Solución de Trabajo.- Mezclar un volumen de solución I con un volumen de solución II y diluir 1:10. Hecha la mezcla y aforada, esta debe tener una coloración cáhala. La solución debe mantenerse en refrigeración durante su uso.

PREPARACION DE GLOBULOS ROJOS DE CARNERO (GRC).

Los GRC fueron obtenidos frescos de la Facultad de Veterinaria con anticoagulante Alsever previamente esterilizado y mantenido en refrigeración.

* Se toma la cantidad de GRC necesaria para preparar concentraciones de 15 y 8 % respectivamente.

* Se centrifuga a 3000 rpm/5 minutos.

* Se lava el paquete celular tres veces con BSS y se ajusta a la concentración requerida con la misma solución.

* Se mantienen las suspensiones en refrigeración.

PREPARACION DEL COMPLEMENTO (C').

El C' fue obtenido de sangre de cuyo sin anticoagulante de animales del Bioterio de la Facultad de Quimica.

- * El suero es separado centrifugando la sangre a 3000rpm/5 minutos.
- * El suero es absorbido con GRC concentrados lavados previamente con BSS.
- * Se incuba a 37 C/15 minutos en Baño María.
- * Se centrifuga a 3000 rpm/5 minutos.
- * Se distribuye en viales con 0.5 ml por vial.
- * Se mantiene en congelación y para su uso se hace una dilución de 1:10.

SOLUCION ALSEVER.

Glucosa -----	2.05 g
Citrato de sodio -----	0.80 g
Acido citrico -----	0.055g
NaCl -----	0.42 g

Aforar con agua destilada a 100 ml.

Esterilización por filtración, guardar en refrigeración hasta su uso.

Emplear 27 ml de sol. Alsever para 23 ml de sangre.

CUANTIFICACION DE LA ENDOTOXINA EN LIMULUS.

Una solución que contenía 50 ug de ECA/ml, se le hizo una serie de diluciones (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512) y se colocó 0.1 ml de cada dilución en tubos que ya contenían el Limulus, se rotaron suavemente y se colocaron en baño de agua a 37 C por 1 hora.

Para control positivo se colocó 0.1 ml de la endotoxina reconstituida de E. coli 055:B5 de "Pirogent" en un tubo con Limulus.

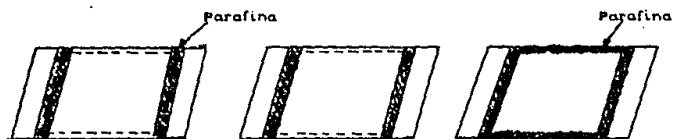
El control negativo fue hecho con 0.1 ml de agua estéril libre de pirógenos añadidos a un tubo con Limulus.

CAMARAS DE CUNNINGHAM

- * Desengrasar con alcohol los portaobjetos (de 26X76 mm) y los cubreobjetos (de 24X40 mm).
- * Marcar los portaobjetos de acuerdo al largo del cubreobjetos.
- * Cortar tiras de cinta adhesiva de doble cara con las siguientes medidas: 2.5X0.15 cm.
- * Poner la tira de cinta adhesiva delante de la línea marcada.
- * Sobre la cinta adhesiva poner el cubreobjetos.
- * Para usar la cámara, primero se sella con parafina donde se encuentra unido el cubreobjeto con la cinta adhesiva y el portaobjetos.
- * Se llena la cámara y se sella con parafina las orillas.



Rayar el portaobj. Poner cinta adhesiva Poner el cubreobj.



Sellar con para-
fina

Llenar con muestra

Sellar las orillas

APENDICE B.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Notación Sumaria $\left(\sum_{j=1}^n X_j\right)$

$\sum_{j=1}^n X_j$ Desde $j = 1$ a $j = n$

$$\sum_{j=1}^n X_j = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$$

Media Aritmética (\bar{X})

n: $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum_{j=1}^n X_j}{n} = \frac{\Sigma X}{n}$$

Desviación Estándar (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n}}$$

ANALISIS DE VARIANZA. (METODO DE FISHER).

Problemas: $X_{r,1}, X_{r,2}, X_{r,3}, \dots, X_{r,n} = N_r$

Testigos: $X_{a,1}, X_{a,2}, X_{a,3}, \dots, X_{a,n} = N_a$

$$N_t = N_r + N_a$$

$$ZZT = \sum_{r=1}^n X_{r1} + \sum_{a=1}^n X_{a1}$$

$$SCT = \left(\sum_{r=1}^n X_{r1} \right)^2 / n_r + \left(\sum_{a=1}^n X_{a1} \right)^2 / n_a - (ZZT)^2 / n_t$$

$$SC(X^2) = \sum_{r=1}^n X_{r1}^2 + \sum_{a=1}^n X_{a1}^2 - (ZZT)^2 / n_t$$

$$SCE = AC(X^2) - SCT$$

F	SC	gl	CM	F	P
Tratamiento	SCT	1	SCT/gl	SCT/gl+SCE/gl	
Error	SCE	N-2	SCE/gl		
Total	SC(X)	N-1			

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andersen H.J.et.al. Studies of Urinary Tract Infections in Infancy an Childhood. J. Pediatrics 69; 542-550 (1966).
- 2.- Barr K. and Rick P.D. Biosynthesis of ECA in E. coli (in vitro synthesis of lipid-linked intermediates). J. Biol. Chem. 262; 7142-7150 (1987).
- 3.- Baker J.P.et.al. Influence of Multiple Genes on the Magnitude of the Antibody Responce to Bacterial Polysaccharide Antigens. Infect. Immun. 45; 56-61 (1984).
- 4.- Basu S.et.al. Chemical Characterization of ECA Isolated from Plesiomonas shigelloides ATCC 14029. Eur. J. Biochem. 162; 75-81 (1987).
- 5.- Cunningham A.J. and Szenberg A. Further Improvements in the Plaque Technique For Detecting Single Antibody-Forming Cells. Immunol. 14; 599
- 6.- Chong K-T. and Huston M. Implications of Endotoxin Contamination in the Evaluation of Antibodies to LPS in a Murine Model of Gram-Negative Sepsis. J.Infect.Dis. 136; 713-719 (1987).
- 7.- Delacroix D.L. et.al. Selective Trasport of Polymeric Immunoglobulin A in Bile. J.Clin.Invest. 70; 234-241 (1982).
- 8.- Dell A. and Oates J. The ECA A Cyclic Polysaccharide. Carbohydr. Res. 133; 95-104 (1984).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 9.- Diaz F., and Neter E. Antibody response to the common enterobacterial antigen of children with shigellosis, salmonellosis or urinary tract infection. *Amer. J. Med. Sci.* 256;18-24 (1968).
- 10.- Domingue G. J. et al. Prevention of experimental hematogenous and retrograde pyelonephritis by antibodies against enterobacterial common antigen. *Infect. Immun.* 2;175-182 (1970).
- 11.- Elkins K.L. et.al. Mechanims of Specific Immunological Unresponsiveness to Bacterial Lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 55; 3093-3102 (1987).
- 12.- Ekstedt R.D. and Hayes L.L. Runt Disease Induced by Non-Living Bacterial Antigens. *J.Immunol.* 98; 110-118 (1967).
- 13.- Freer J.H. Illustrated Guide to the Anatomy of the Bacterial Cell Envelope.
Immunology of the Bacterial Cell Envelope
Edited by D. E. S. Stewart-Tull and M. Davies
1985 John Wiley & Sons Ltd.
- 14.- Faure-Fontanela M. A., Garcia T. F. Un antígeno de enterobacterias en los linfocitos de sangre periférica humana. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 46; 719-724 (1989)
- 15.- Faure-Fontanela M.A., Garcia T.F. Antígenos de enterobacterias y el tejido linfoide de ratas. *Bol. Med. Hosp. Infant.* 45; 532-536 (1988).
- 16.- Garcia T.F., Carrillo J. y Silva S. Enterobacterial common antigen in the urine from children wiht cancer. *Archiv. Invest. Méd. (Méx).* 20; 137-142 (1989).

- 17.- Gannon P.J. et al. Immunological Activities of Purified Preparations of ECA. *Infect. Immun.* 35; 193-201 (1982).
- 18.- Gibbons J.J. and Lucas J. Immunomodulation by Low-Dose Methotrexate. I. Methotrexate Selectively Inhibits Lyt-2 Cell in Murine Acute Graft-vs-Host Reactions. *J. Immunol.* 142; 1867-1873 (1989).
- 19.- Gorzynski E.A. et al. Differences in antibody response of mouse strains to enterobacterial common antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 134; 776-779 (1970).
- 20.- Gorzynski E.A. et al. The hemagglutinin response of human subjects to common enterobacterial antigen. *Infect. Immun.* 5; 625-626 (1972).
- 21.- Gorzynski, E.A.. Cross-reactivity between mouse tissue and enterobacterial common antigen (CA). *Mil. Med.*, in press. (1976).
- 22.- Gorzynski, E. A., J.L. Ambrus, and E. Neter. Effect of common enterobacterial antiserum on experimental *Salmonella typhimurium* infection of mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137; 1209-1212 (1971).
- 23.- Johns M. A.. Common enterobacterial antigen. I. Isolation and purification from *Salmonella typhosa* 0:901. *J Immunol.* 110; 781-790 (1973).
- 24.- Gavisnki S. and Woloschak G.E. Expression of Viral and Virus-Like Element in DNA Repair-Deficient Immunodeficient "Wasted" Mice. *J. Immunol.* 142; 1861-1866 (1989).

- 25.- Hiernaux J.R. et.al. Characterization of the Immunodeficiency of RIII/J Mice. I. Association With the CD5(Ly-1) B Cell Lineage. *J.Immunol.* 142; 1813-1817 (1989).
- 26.- Izui S. et.al. Subclass-Restricted IgG Polyclonal Antibody Production in Mice Injected With Lipid A-Rich LPS. *J.Exp.Med.* 153; 324-338 (1981).
- 27.- Jerne N.K. and Nordin A.A. Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cell. *Scien.* 140; 405 (1963).
- 28.- Jubila J.W. Etiology of the Wasting Disease. *J.Infect.Dis.* 128(sup1); 599 (1973).
- 29.- Kaiserlian D.et.al. The Wasted Mutant Mouse. I. An Animal Model of Secretory IgA Deficiency With Normal Serum IgA. *J.Immunol.* 135; 1126-1131 (1985).
- 30.- Kaiserlian D.et.al. The Wasted Mutant Mouse.II. Immunological Abnormalities in a Mouse Described as a Model of Ataxia-Telangiectasia. *Clin.Exp.Immunol.* 63; 562-569 (1986).
- 31.-Kuhn H.,Basu S., and Mayer H. Comparison of ECA From Different Species by Serological Techniques. *Eur.J.Biochem.* 162; 69-74 (1987).
- 32.- Kuhn H.,Neter E., and Mayer H. Modification of the Lipid Moiety of the ECA by the Pseudomonas Factor. *Infect.Immun.* 40; 696-700 (1983).

- 33.- Kuhn H. et.al. Effect of Proteins on the Immunogenicity of ECA. *Infect.Immun.* 34; 373-377 (1981).
- 34.- Kayhty H. et.al. Serum Antibodies to Capsular Polysaccharide Vaccine of Group A *Neisseria meningitidis* Followed for Three Years in Infants and Children. *J.Infect.Dis.* 142; 861-868 (1980).
- 35.- Kunin C.M.,et.al. Evidence for a Common Hapten Associated With Endotoxin Fraction of *E. coli* and Other Enterobacteriaceae. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 111; 160-166 (1962).
- 36.- Kunin C.M. Separation characterization, and biological significance of a common antigen in enterobacteriaceae. *J. Exp. Med.* 118;565-586 (1963).
- 37.- Kunin C. M., and M. V. Beard. Serological studies of O antigens of *E. coli* by means of the hemagglutination test. *J. Bacteriol.* 85; 541-548 (1963).
- 38.-Kiviloakso E.et.al. Endotoxaemia and Acute Pancriatitis:
Correlation Between the Severity of the Disease and theAnti-ECA Antibody titre. *Gut.* 25; 1065 1070 (1984).
39. Kutteh W.H.,Prince S.J.,and Mesteky J. Tissue Origins of Human Polymeric and Monomeric IgA. *J.Immunol.* 128; 990-995 (1982).
- 40.- Kiss P.,et.al. Structural Studies on the Immunogenic Form of the ECA. *Eur.J.Biochem.* 88; 211-218 (1978).
- 41.- Kessel R., Neter E., and Braun W. Biological Activities of the ECA. *J.Bacteriol.* 91; 465-466 (1966).

- 42.- Kind P., Campbell P., and Rowlands D.T. Endotoxin-Induced Wasting Disease in Mouse: A Temporary Condition Explained by Endotoxin Tolerance. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 125; 495-498 (1973).
- 43.- Keast D. Role of Bacteriol Endotoxin in the Graft-vs-Host Syndrome. *J.Infect.Dis.* 128; 5104-5109 (1973).
- 44.- Logowski C., et.al. Identification of a Trisaccharide Repeating-Unit in the ECA. *Carbohydr.Res.* 118; 173-181 (1983).
- 45.- Männel D. and Meyer H. Serological and Immunological Properties of Isolated ECA. *Eur.J.Biochem.* 86; 371-379 (1978).
- 46.- Morgenstern M.A. and Gurzynski E.A. Immunogenic Cross-Reactivity Between Human Tissues and the ECA. *Infect.Immun.* 17; 36-42 (1977).
- 47.- Morgenstern M. A., and Gurzynski E. A. Immune response of guinea pigs to common enterobacterial antigen. *Immun. Commun.* 2; 495-506 (1973).
- 48.- Malkamaki M., et.al. Antibodies to the ECA: Standardization of the Passive Hemagglutination Test and Levels in Normal Human Sera. *J.Clin.Microbiol.* 13; 1074-1079 (1981).
- 49.- Männel D. and Mayer H. Isolation and Chemical Characterization of the ECA. *Eur.J.Biochem.* 86; 361-370 (1978).
- 50.- McCabe W.R. and Greely A. ECA.II. Effect of Immunization on Challenge With Heterologous Bacilli. *Infect.Immun.* 7; 386-392 (1973).

51.- McCabe W.R., Johns M., and DiGenio I. ECA.111. Initial Titer and Antibody Response in Bacteremia Caused by Gram Negative Bacilli. *Infect.Immun.* 7; 393-397 (1973).

52.- Maier U. and Mayer H. Genetic Location of Genes Encoding ECA. *J.Bacteriol.* 163; 756-762 (1985).

53.- Male D.

Immunology

Gower Medical Publishing London

N.Y. (1986).

54.- Makela P.H and Mayer H. Enterobacterial Common Antigen. *Bacteriol. Rev.* 40; 591-632 (1976).

55.- Margni A.R.

Inmunologia e Imunoquímica

Médico Panamericana

Buenos Aires (1989).

56.- Nowotny A., Behling U.H., and Chong H.L. Relation of Structure to Function in Bacterial Endotoxin. VIII. Biological Activities in a Polysaccharide-Rich Fraction. *J.Immunol.* 115; 199-203 (1975).

57.- Neter, E., E. A. Kennedy, and Th. C. Jawett, Jr. Antibody response to common enterobacterial antigen of children with pyogenic peritonitis. *Infect.* 1; 12-16 (1973).

58.- Neter, E., H. Y. Whang, O. Lüderitz, and O. Westphal. Immunological priming without production of circulating bacterial antibodies conditioned by endotoxin and its lipoid A component. *Nature (London)*. 212; 420-421 (1966).

- 59.- Palva E.f. and Mäkela P.H. Lipopolysaccharide Heterogeneity in *Sal. typhi* Analyzed by Sodium Dodecil Sulfate Poliacrilamide Gel Electrophoresis. *Eur.J.Biochem.* 107; 137-143 (1980).
- 60.- Peter H., et.al. Monoclonal Antibodies to ECA and to *E. coli* Lipopolysaccharide Outer Core: Demonstration of an Antigen Determinant Shared by ECA and *E.coli* K5 Capsular Polysaccharide. *Infect.Immun.* 50; 459-466 (1985).
- 61.- Piarpaoli W. and Sorkin E. Hormones, Thymus and Lymphocyte Functions. *Experientia.* 28; 1385-1389 (1972).
- 62.- Rick P.D., et.al. Biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen. *J.Bacteriol.* 162; 494-503 (1985).
- 63.- Rick P.D., et.al. Accumulation of a Lipid-Linked Intermediate Involved in ECA Synthesis in *Sal. typhi* Mutants Lacking dTDP-Glucose Pyrophosphorilase. *J.Bacteriol.* 170; 4008-4014 (1988).
- 64.- Rino J., Goleski J.R., and Mayer H. Localization of ECA: Immunogenic and Non-Immunogenic ECA Containing *E.coli*. *J.Bacteriol.* 141; 814-821 (1980).
- 65.- Roitt I.M.; Brostoff J.; Male D.
Immunology
Gower Medical Publishing
N.Y. (1989)
- 66.- Slack J., et.al. Subclass Restriction of Murine Antibodies. II. The IgG Plaque-Formin Cell Response to Thymus-Independent Type I and Type II Antigens in Normal Mice and Mice Expressing an X-linked Immunodeficiency. *J.Exp.Med.* 151; 853-862 (1980).

67.- Suzuki I., Gorzynski E.A., and Neter E. Separation by Ethanol of Common and Somatic Antigen of Enterobacteriaceae. J.Bacteriol. 88; 1240-1243 (1964).

68.- Shultz L.D., and Sidman C.L. Genetically Determined Murine Models of Immunodeficiency. Ann.Rev.Immunol. 5; 367-403 (1987).

69.- Stites D.P.; Słobo J.D.; Funderberg H.H.; Wells J.V.
Inmunología Básica y Clínica
EL Manual Moderno
México, D.F. (1987).

70.- Taylor A.M.R., et al. Ataxia-telangiectasia: A Human Mutation With Abnormal Radiation Sensitivity. Nature 258; 427-429 (1975).

71.- Veit B.C. and Michael J.B. The Lack of Thymic Influence in Regulating The Immune Response to E. coli 0127 Endotoxin. J.Immunol. 109; 547-553 (1972).

72.- van Oss, C. J. et al. The opsonin response of human subjects to common enterobacterial antigen. Immun. Commun. 1; 69-75 (1972).

73.- Voltoron, M.V., et al. Effect of common enterobacterial antigen on mouse virulence of Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 13; 1601-1605 (1976).

74.- Whang H.Y. and Neter E. Study of Bacteriogenetic (Kunin) Antibodies in Serum of Urinary Tract Infections J.Pediatrics. 63; 412-419 (1963).

75.- Whang H.Y. and Neter E. Effect of Cholesterol on Immunogenicity of Common Enterobacterial Antigen. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 128; 936-939 (1968).

76.- Whang H. Y. and Neter E. Inhibition by cardiolipin of the antibody response to bacterial antigens. *J. Immunol.* 100; 501-506 (1968).

77.- Whang H. Y. et al. Strain-related differences in immunosuppressive effects of Enterobacteriaceae and their lipopolysaccharides on production in rabbits of antibody to enterobacterial common antigen. *Infect. Immun.* 13; 1074-1079 (1976).

78.- Spiegel, M.R.

Estadística

McGraw-Hill

México 1983.

79.- Irwin Miller, John E. Freund.

Probabilidad y Estadística Para Ingenieros.

Ed. Reverté Mexicana, S.A.

Mexico, D.F. 1973.

MI AMIGO EL LINFOCITO

Son la defensa
de todo lo extraño
se visten de gala
si ven su pasado.
Descubren lo cierto
que hay a su lado
y atacan lo incierto
que amenaza su encanto.
Navegan en mantos
llenos de espacio.
Se cubren de nombres
y reconocen lo falso
que entra a su mundo
queriendo destrozarlo.
Llegan del espacio
de una madre angustiada
que prolifera a sus hijos
en las araz del alba.

Son la defensa
y nunca descansan
su nombre es tierno
linfocito del alba
que llevan guerreros
que atacan sin calma.
Salen del vientre
cuando hay amenaza
y presentan lo extraño
con claves que llevan
en su fiel membrana.
Viven pensando
y en ellos lo guardan
que existe el peligro
de cosas más raras.
Viven corriendo
en ríos del alma
y en guaridas se ocultan
por el tiempo querido
que requiere su calma.

Son linfocitos
que viven luchando
a lo largo del tiempo
secretando lo cierto
sus amigos del viento.
Presentan lo extraño
cual substancia sin tiempo.
Son la defensa
de todo el cuerpo
linfocitos se llaman
y así, yo los llevo.

RAUL GRACIA NUÑES