

17
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

ESTUDIO DE LINFOCITOS B Y CELULAS
PLASMATICAS DE INTESTINO DELGADO Y
GRUESO EN RATONES INMUNIZADOS CON

Entamoeba histolytica Y TOXINA DE COLERA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

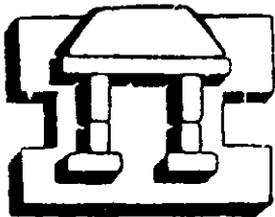
B I O L O G A

P R E S E N T A

MONICA CHAVEZ MALDONADO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LETICIA MORENO FIERROS



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

276873



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LETICIA MORENO FIERROS.

DEDICATORIAS

En primer lugar dedico esta tesis a mi madre: ANA MARIA MALDONADO OLGUIN, porque a lo largo de mi vida me ha enseñado a ser constante y tenaz, y además por lo que en sí misma encierra, la persona más hermosa tanto exteriormente como interiormente y que gracias a ti puedo hoy abrazar uno de mis anhelos, GRACIAS MAMÁ por ser quién y como eres, TE AMO.

A mi padre: JOSÉ CHÁVEZ MORENO, por enseñarme a tener valores reales.

A mis hermanas: CATALINA, ROSARIO, Y LUCIA, por el gran camino andado juntas, por el amor y cariño que me brindan, por su amistad, por su apoyo.

A mis hijos Viridiana y Omar Mauricio, por su amor y cariño que me nutre día a día y que me obliga a mirar hacia el frente y por llegar a mi vida.

A mis sobrinos Alejandra, Allan, Ingrid Itzayana, Lorena y Ariadna por iluminar mi vida con sus risas y su cariño.

A Pablo Cesar por compartir mi vida.

A MIS GRANDES AMIGOS

Juan, Antonio, Selarmo, José Luis (sargento), José Luis, Octavio, Adrián, por incursionar juntos en grandes sueños, por su amistad, por todo lo que convivimos y por enseñarme que el mayor tesoro que puede tener un ser humano es la amistad.

A todos mis compañeros del grupo 2 de Biología.

A mis compañeros del laboratorio de Histología.

A mi amigo Norberto Vazquez por su amistad y apoyo.

Y a todos aquellos que me han brindado su amistad y que de momento escapan de mi memoria.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Moreno Fierros, por permitirme entrar a realizar mi tesis en su laboratorio, por su apoyo y por todos sus comentarios que me ayudaron a enriquecer la presente.

A la Biol. Carmen Alvarez por su gran ayuda en el compendio de la histología del intestino y por sus comentarios tan acertados.

A la M. en C. Silvia Leticia Verdín Terán, por su enseñanza del manejo de las técnicas histológicas y por la gran amistad que me ha brindado.

Al M. en C. Rodolfo Cardenas Reygadas, por despejar mis grandes dudas y por toda la ayuda que me brindó en la elaboración de esta tesis.

Al Biol. Jorge Gersenowies por su ayuda en el manejo e interpretación de los resultados.

A mis revisores: M. en C. Rafael Jiménez Flores, M en C. Martha Salcedo Alvarez, Dr. Efraín Garrido Guerrero, por sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la presente.

A mis compañeros de proyecto por su ayuda, comentarios, etc.

Agradeciendo el apoyo proporcionado durante la realización de esta tesis de los proyectos de CONACyT 0797-13453 PN y PAPIIT DGAPA IN-209198.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
A. ASPECTOS GENERALES	2
1.- GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE ASOCIADO A MUCOSAS	2
2.- ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNE ASOCIADO A MUCOSAS	2
3.- HISTOLOGÍA DEL TUBO DIGESTIVO	4
B. ANTECEDENTES	11
1.- ESTRATEGIAS DE INMUNIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE RESPUESTA INMUNE EN MUCOSAS	11
2.- LA TOXINA DE COLERA	11
3.- INMUNOGLOBULINAS DE LAS MUCOSAS	12
4.- ESTUDIOS DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN CONDICIONES NORMALES, EN CONDICIONES LIBRES DE GERMENES Y EN ANIMALES INMUNIZADOS	13
5.- RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>Entamoeba histolytica</i>	14
C. JUSTIFICACIÓN	15
III. OBJETIVOS	16
1.- OBJETIVO GENERAL	16
2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
IV. METODOLOGÍA	17
1.- OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE LINFÓCITOS B Y CÉLULAS PLASMÁTICAS	17

V. <u>RESULTADOS</u>	20
1.-EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON TROFOZOÍTOS FIJADOS CON GLUTARALDEHÍDO EN INTESTINO DELGADO.....	20
2.-EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON TROFOZOÍTOS FIJADOS CON GLUTARALDEHÍDO EN INTESTINO GRUESO.....	21
3.-EFECTO DE LA TOXINA DE CÓLERA.....	22
4.-INTENSIDAD DE REACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS.....	22
5.-EFECTO DE LA INTENSIDAD DE REACCIÓN EN CÉLULAS PLASMÁTICAS DE RATONES INMUNIZADOS CONTRA CONTROLES.....	22
6.-INTESTINO DELGADO.....	22
7.-EFECTO DE LA TOXINA DE CÓLERA EN LA INTENSIDAD DE REACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS EN INTESTINO DELGADO.....	24
8.-INTESTINO GRUESO.....	25
9.-COMPARACIÓN DE LA INTENSIDAD DE REACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS EN RATONES INMUNIZADOS Y CONTROLES.....	25
10.-EFECTO DE LA TOXINA DE CÓLERA EN LA INTENSIDAD DE REACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS EN INTESTINOGRUESO.....	26
VI. <u>DISCUSIÓN</u>	35
VII. <u>CONCLUSIONES</u>	41
VIII. <u>APENDICES</u>	42
1.-AMORTIGUADOR FORMALDEHÍDO CON PICRATO.....	42
IX. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	43-49

LISTA DE ABREVIATURAS

TFG	Trofozoítos Fijados con glutaraldehído
TFG-TC	Trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IP	Intraperitoneal
IM.....	Intramuscular
TC	Toxina de cólera
CP	Células plasmáticas
IR	Intensidad de reacción
ID	Intestino delgado
IG	Intestino grueso
LP	Lámina propia
Ep	Epitelio
TT	Toxoide tetánico
KLH	Hemocianina.

I.-RESUMEN

Generalmente las respuestas inducidas a nivel intestinal son predominantemente de IgA. En trabajos previos analizando la respuesta de anticuerpos anti *E. histolytica* a nivel intestinal y sistémico, en ratones inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído (TFG), se ha observado que en intestinos delgado y grueso se inducen altas respuestas de IgA, IgG e IgM. En este trabajo se realizó un análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos peroxidados anti Igs de ratón para determinar si la inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído por las vías oral, intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM) con o sin toxina de cólera (TC), modificaba las proporciones y distribución de células plasmáticas (CP) y linfocitos B y la intensidad de reacción (IR) de los tres isotipos analizados en intestinos delgado (ID) y grueso (IG). La distribución de células plasmáticas y linfocitos B, fue variable en general. Sorprendentemente en los controles no se encontró que predominaran los linfocitos B y CP IgA, en ID se observó un ligero predominio de linfocitos B y CP IgM (40%), mientras que en IG se encontraron porcentajes similares de linfocitos B y CP IgA, IgM e IgG (33% de c/u). La inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído con o sin toxina de cólera en ID en general, provocó una disminución de la proporción de linfocitos B y CP IgM (30%), y por la vía IP sin toxina de cólera se incrementaron los linfocitos B y CP IgA (46%); mientras que en IG se incrementó la proporción de linfocitos B y CP IgA (39%), y provocó una disminución en la proporción de linfocitos B y CP IgM (34%). Además en general en ID la inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído con o sin toxina de cólera, en lámina propia (LP) y epitelio (Ep) aumentó la intensidad de reacción de IgG y disminuyó la de IgM, en tanto que en IG en (LP) disminuyó la intensidad de reacción de IgG e IgM, y en Ep en general disminuyó la intensidad de reacción de los tres isotipos.

La inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído modifica las proporciones de linfocitos B y CP IgA e IgM en intestino delgado y grueso, por la vía IP se incrementaron los linfocitos B y CP IgA en intestino delgado, además la coadministración de toxina de cólera con trofozoítos fijados con glutaraldehído no modifica las proporciones de IgA, IgG e IgM en intestino delgado y grueso.

II.-INTRODUCCIÓN

A. Aspectos generales

1.- GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE ASOCIADO A MUCOSAS.

El sistema inmune asociado a mucosas, fué identificado como una entidad inmunológica separada del sistema inmune sistémico a principios de 1960 cuando se descubrió que la IgA era la inmunoglobulina predominante en las secreciones mucosas (Tomasi,1960). En los años siguientes se han identificado otras características adicionales del sistema inmune de las mucosas que lo distinguen del sistema inmune sistémico. Entre otras se incluyen el sistema de tráfico celular orientado hacia las mucosas, que asegura que las células producidas dentro de los folículos linfoides mucosos sean retenidas en una extensión considerable dentro de las áreas mucosas, la presencia de elementos celulares específicos de las mucosas tales como, las células cebadas de las mucosas y la presencia de células reguladoras especializadas específicas de mucosas que permiten que el sistema inmune de las mucosas reaccione en formas características contra antígenos que lleguen al sistema inmune por las superficies mucosas oral o respiratoria. Estas características únicas del sistema inmune de las mucosas han surgido debido a que el ambiente de las mucosas esta expuesto a muchos antígenos y mitógenos, y tiene requerimientos especiales. Así el sistema inmune de las mucosas debe responder vigorosamente contra los patógenos de las mucosas y al mismo tiempo permanecer sin reaccionar contra los antígenos presentes en los comensales intestinales y en los alimentos. Además el sistema inmune de las mucosas debe funcionar para excluir antígenos exógenos del medio interno para minimizar la exposición de los elementos linfoides sistémicos a antígenos triviales. Por otra parte, el sistema inmune de las mucosas debe regular la respuesta sistémica hacia los factores ambientales comunes que de otra manera podrían comprometer al sistema sistémico provocando reacciones autoinmunes (Strober y Brown, 1988, Lamm, 1997).

2.- ORGANIZACION DEL SISTEMA INMUNE ASOCIADO A MUCOSAS.

En cuanto a su organización, el sistema linfoide asociado a mucosas se puede dividir en tres compartimientos: 1) agregados linfoides organizados como son las placas de Peyer y los folículos linfoides aislados, 2) tejido linfoide difuso, lámina propia y 3) Linfocitos intraepiteliales (IEL) (Strober y Brown, 1988; Biewenga *et al*; 1993).

Las placas de Peyer están compuestas de múltiples agregados linfoides y aumentan de tamaño y número con la exposición al antígeno. Tienen una microestructura definida que incluye un folículo central rico en células B y regiones interfoliculares ricas en células T. Los linfocitos de las placas de Peyer son muy heterogéneos ya que incluyen células B y varias células T reguladoras y citotóxicas. Las placas de Peyer en sí, están cubiertas por un epitelio especializado que incluye a las llamadas células M que pinocitan y fagocitan selectivamente partículas y transfieren este material al folículo, la células M se originan en las criptas y migran a la cúpula del agregado. En la lámina propia también se observan células linfoides diseminadas difusamente a lo largo de la misma y entre las células epiteliales de absorción o llamados también compartimientos intraepiteliales; el tamaño de estos compartimientos y la concentración densa de células dentro de ellos hacen de la lámina propia y el epitelio una fuente importante de células linfoides en el intestino. En tanto que la lámina propia sana contiene muchas células diferentes como linfocitos T y B, macrófagos, polimorfonucleares y células cebadas, la distribución puede alterarse de manera notable en estados inflamatorios. En la lámina propia del intestino delgado del hombre en promedio 85% de las células plasmáticas contienen IgA, 5% IgG y 10% IgM (Ernst *et al*; 1985). Una cifra estimada entre 70-80% de todas las células productoras de Igs en humanos están localizadas en la mucosa intestinal y se ha reportado una cifra comparable (>80%) para ratones (Van der *et al*; 1987).

Los tejidos GALT (del inglés gut-associated-lymphoid tissues) llamados también tejidos linfoides asociados al intestino y BALT (del inglés bronchus-associated-lymphoid tissues) tejidos linfoides asociados a bronquios, son áreas linfoides aferentes donde los antígenos penetran al sistema e inducen las respuestas inmunitarias, la lámina propia y los agregados linfoides de la mucosa difieren en su morfología de los ganglios linfáticos. Reciben antígeno a través del epitelio en vez de a través de un vaso de la circulación linfática o sanguínea. De manera más particular; el antígeno entra a través de células especializadas en la captación del antígeno llamadas células M localizadas en el epitelio que recubre a los agregados linfoides. Los linfocitos intraepiteliales es una población de células que yacen por encima de la membrana basal entre las células epiteliales. Aunque esta población numéricamente es menor que la población de la lámina propia, es sin embargo considerable ya que hay de 6 a 40 IEL/100 células epiteliales en condiciones normales en humano y un número mayor en los diversos estados inflamatorios (Lefrancois, 1991). La población IEL es fenotípicamente heterogénea, y consiste en su mayor parte de células T y el fenotipo

predominante es CD8. La población de linfocitos en la lámina propia se distingue del compartimiento intraepitelial porque se divide igualmente entre células B y T. (Strober y Brown, 1988). Sin embargo (McGhee *et al*, 1992) menciona que la lámina propia de el tracto gastrointestinal humano contiene principalmente: células T (40-60%), células B (20-40), células plásmaticas, macrófagos (10%), eosinófilos (5%) y células cebadas (1-3%).

3.- HISTOLOGIA DEL TUBO DIGESTIVO.

Aunque el tubo digestivo esta formado básicamente por cuatro partes u órganos principales (esófago, estómago, intestino delgado, e intestino grueso), separados entre sí por válvulas o esfínteres musculares, todos muestran cuatro capas o tunicas (Fig 1).

- 1) Mucosa
- 2) Submucosa
- 3) Muscular
- 4) Serosa o adventicia.

1) La mucosa esta formada de tres capas:

- a) Una membrana epitelial superficial húmeda, lubricada por moco y que descansa sobre una lámina basal
- b) Una capa subyacente de tejido conectivo areolar laxo de sostén, la lámina propia
- c) Una capa externa delgada de músculo liso, la *muscularis mucosae*, dispuesta por lo general en dos estratos, uno interno circular y otro externo longitudinal.

En la lámina propia se encuentran abundantes capilares sanguíneos y linfáticos hacia los cuales pasan las sustancias alimenticias absorbidas. La mucosa produce anticuerpos, en especial IgA, como respuesta a antígenos y microorganismos que se encuentran en la luz del intestino. Pueden encontrarse grandes masas linfáticas dispersas en la submucosa, el tejido linfático difuso de la lámina propia se encuentra en el estómago y los intestinos con linfocitos, células plásmaticas y macrófagos, y con frecuencia eosinófilos y células cebadas. La IgA y otros anticuerpos producidos en estas células se unen a una proteína secretada por las células epiteliales de la superficie mucosa (Fragmento secretor F.S) y pasan hacia la luz para combinarse con antígenos.

2) Submucosa; consta de tejido conectivo areolar con fibras elásticas muy notables permite la movilidad de la mucosa y contiene plexos de vasos sanguíneos mayores y nervios con algunas células ganglionares todas parasimpáticas amielínicas con algunas fibras preganglionares parasimpáticas del nervio vago. Este conjunto se denomina plexo submucoso ó de Meissner.

3) Muscular, consta por lo menos de dos capas de fibras musculares lisas aunque las hay estriadas en la parte superior de esófago y en el esfínter anal. El musculo se dispone en una capa circular interna y una longitud externa.

4) Serosa o adventicia; es la capa más externa y esta formada por tejido conectivo areolar relativamente denso y elástico. A menudo se mezcla con tejido conectivo y entonces se llama adventicia, en otras regiones esta cubierta por peritonéo y entonces se llama serosa (Ham, 1975; Leeson *et al*, 1987).

INTESTINO DELGADO.

El intestino delgado se extiende desde el orificio pilórico que continúa del estómago, a la unión ileocecal, donde prosigue con intestino grueso, mide unos 720 cm de longitud, y se divide en tres porciones, el duodeno de sólo 20 cm de longitud, está relativamente fijo a la pared abdominal posterior, ya que no posee mesenterio en la mayor parte de su longitud y por lo tanto es retroperitoneal el resto del intestino delgado se divide en yeyuno, que comprende dos quintos de longitud, e ileon, que abarca las tres quintas partes restantes, el yeyuno y el ileon están suspendidos de la pared abdominal posterior por el mesenterio (intraperitoneal), aunque la parte terminal del ileon vuelve a estar fija a la pared abdominal posterior. Las funciones del intestino delgado son transportar el material alimenticio (quimo) del estómago al intestino grueso, completar la digestión por la secreción de enzimas por su pared y por la glándulas accesorias, absorbe los productos finales de la digestión hacia los vasos sanguíneos linfáticos de su pared y secretar algunas hormonas. El intestino delgado presenta ciertas estructuras que aumentan la superficie submucosa. Estas especializaciones aumentan la superficie de absorción e incluyen pliegues circulares, con vellosidades que cubren la superficie de éstas, criptas o glándulas intestinales que se originan por un proceso de invaginación de epitelio superficial y microvellosidades, que son prolongaciones digitiformes de la superficie apical de las células intestinales.

Los pliegues circulares (válvulas de Kerckring), son pliegues circulares o espirales permanentes que abarcan todo el espesor de la mucosa, con un núcleo de submucosa.

Vellosidades y criptas. Las vellosidades son pequeñas prolongaciones digitiformes o en formas de hoja de la membrana de la mucosa, que sólo se encuentran en el intestino delgado. Cada una está cubierta de epitelio y tiene un núcleo de lámina propia celular, muchas de cuyas células pertenecen al sistema inmunitario. Entre las vellosidades, están las pequeñas aberturas de las glándulas tubulares simples llamadas criptas.

Las criptas o glándulas intestinales (de Lieberkuhn) son estructuras tubulares que se abren entre las bases de las vellosidades y se extienden profundamente hasta la *muscularis mucosae*. El epitelio que reviste las criptas se continúa con el que cubre las vellosidades. Las criptas no se encuentran juntas como las glándulas gástricas, y los espacios entre ellas están llenos de tejido conectivo de la lámina propia. También hay criptas en el intestino grueso, aunque no hay vellosidades. Las vellosidades aparecen como contornos circulares u ovals con un núcleo de tejido conectivo (lámina propia) cubierto por epitelio al material alimenticio en la luz del intestino delgado se agregan las secreciones de muchas glándulas. Estas son de tres tipos principales: 1) glándulas intestinales; se encuentran en el intestino delgado y grueso. 2) Glándulas submucosas; se localizan en el duodeno, son de tipo tubular compuesto y se denominan glándulas duodenales (de Brunner). Suelen ser más extensas en la primera porción del duodeno cerca del píloro; 3) Glándulas situadas fuera del tubo digestivo pero que envían sus secreciones hacia la luz de éste por un sistema de conductos. Estas glándulas, son el hígado y el páncreas, y ambas liberan sus secreciones exocrinas hacia el duodeno.

El epitelio de la mucosa intestinal es del tipo cilíndrico simple, pero difiere del epitelio superficial del estómago en que hay más de un tipo celular. Hay células cilíndricas con borde estriado, células de paneth, células caliciformes y células enteroendocrinas. Las células caveoladas no son frecuentes, pero se encuentran en criptas y vellosidades del intestino delgado, intestino grueso, estómago y otros tejidos. En el epitelio intestinal también se observan células migratorias, sobre todo linfocitos, y con menor frecuencia otros leucocitos. Por último, en el epitelio que cubre las placas de Peyer se hayan las células M.

Lámina propia; se extiende entre las glándulas intestinales y en los núcleos de las vellosidades. Su naturaleza es muy distintiva e incluye una red de fibras reticulares y muchas características del tejido linfático laxo. Quizá se describa mejor como tejido conectivo areolar laxo con tendencias

linfáticas. En la malla de fibras reticulares hay células reticulares primitivas con núcleos grandes, ovals y de coloración pálida, así como linfocitos, macrófagos y células plásmaticas. Además de los linfocitos dispersos en la lámina propia, hay muchos folículos solitarios o nódulos linfáticos grandes. Desde el punto de vista inmunológico, la lámina propia es importante por contener células linfáticas que constituyen una barrera entre el cuerpo y los antígenos, los microorganismos y otras sustancias extrañas que siempre se encuentran en la luz intestinal. Muchas de estás células no residen de manera permanente en la mucosa sino que circulan. Las células B maduran y proliferan en los nódulos linfáticos y las placas de Peyer, y muchos se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos y en mucosas sobre todo IgA, es producida por las células plasmáticas que existen como células libres en la lámina propia de las glándulas mencionadas. Las capas *muscularis mucosae*, submucosa, muscular y serosa ya han sido descritas en la generalidad del tubo digestivo, aunque hay que hacer notar que la submucosa suele estar infiltrada con leucocitos en la región de las placas de Peyer (Ham, 1975, Leeson *et al*, 1987).

INTESTINO GRUESO.

Mide alrededor de 180cm de largo en el humano y se le consideran las siguientes regiones ciego, continuación del ileón y en su unión, dispone de la llamada valvula ileocecal; el apéndice, pequeño diverticulo del ciego; el colon propiamente dicho, es la continuación retrorada del ciego y se subdivide en las siguientes porciones: ascendente, transversa, descendente, sigmoides, recto y el esfínter anal. El material alimenticio entra al ciego en estado semifluido y adquiere la consistencia semisólida de las heces en el colon por la propiedad de absorción de líquidos que hay en esta región. Otras funciones son la secreción de moco. El intestino grueso carece de pliegues y vellosidades, y por ello el epitelio superficial es más evidente que en el intestino delgado. Hay glándulas o criptas intestinales, más largas que las del intestino delgado y agrupadas en forma más compacta. Como en el intestino delgado, las células madres dan origen a células cilíndricas caliciformes y enteroendocrinas. Las células cilíndricas y caliciformes son eliminadas de la mucosa de la luz en zonas de expulson situadas a la mitad de la distancia entre las desembocaduras de las glándulas intestinales. En la superficie luminal, las células enteroendocrinas no están en contacto con la luz, sino que permanecen aplicadas a la lámina basal. Estas últimas células, cuando están situadas en las criptas, se conservan juntas mediante uniones estrechas, y como la duración promedio de su vida es

más o menos tres veces la de los otros dos tipos de células, deben emigrar de manera independiente dentro de las criptas. Los tipos de células epiteliales son idénticos a los del intestino delgado, pero las células caliciformes (mucosecretorias) son más abundantes.

Unión ileocecal; en este lugar hay un cambio repentino en la naturaleza de la mucosa, que se proyecta en los pliegues, anterior posterior, para formar dos valvas. Estos pliegues constan de mucosa, submucosa, sostenidos por una masa de músculo liso circular, que es un engrosamiento de la capa interna de la túnica muscular; debido a la posición de estos pliegues, el orificio ileocecal tiene la forma de una hendidura vertical. La unión ileocecal se localiza en el cuadrante inferior derecho del abdomen y está fija a la pared abdominal posterior, o sea que la porción terminal del íleon no tiene mesenterio. El ciego es un pequeño saco cerrado por abajo que cuelga de la unión ileocecal y tiene estructura idéntica a la del colon. El apéndice, es un divertículo cerrado del ciego, pequeño y delgado, que se origina a unos 2.5 cm por abajo de la válvula ileocecal. Está en una buena posición para contener muestras de la flora microbiana de los intestinos delgado y grueso, en particular de este último, en que el contenido de bacterias es mucho mayor que en las porciones del intestino delgado. No hay vellosidades y las glándulas intestinales son pocas y de longitud irregular. El epitelio superficial está formado principalmente por células cilíndricas con borde estriado y sólo unas cuantas células caliciformes. En las criptas hay células de Paneth y muchas células enteroendocrinas. La lámina propia está ocupada por una masa de nódulos linfáticos semejantes a los de las amígdalas. La *muscularis mucosae* suele ser incompleta. La submucosa es gruesa y contiene vasos sanguíneos y nervios, y la muscular es delgada, pero presenta sus dos capas normales sin la presencia de tenias cólicas. La túnica serosa es idéntica a la que cubre el resto del intestino (Ham, 1975, Leeson *et al*, 1987).

CIEGO, COLON Y RECTO.

En el intestino grueso, las glándulas intestinales son más profundas y están más juntas que en el intestino delgado, su profundidad aumenta en el recto y en el colon. Hay muchas células caliciformes. En la profundidad hay algunas células enteroendocrinas, pero por lo general no se observan células de Paneth. La mayor parte de las células en la profundidad de las glándulas son células epiteliales indiferenciadas que sufren mitosis rápida. Estas células contienen algunos gránulos de secreción que son expulsados antes que las células alcancen la superficie de la mucosa.

El material secretado forma parte del glucocálix. La lámina propia entre las glándulas tiene aspecto semejante al del intestino delgado y contiene nódulos linfáticos dispersos que se extienden profundamente hasta la submucosa. La *muscularis mucosae* está bien desarrollada pero puede ser irregular por faltar en los lugares de los nódulos linfáticos. En el ciego y el colon, la capa externa longitudinal de la *muscularis* no es completa y se presenta en tres formas longitudinales, las tenias cólicas. En el recto vuelve a ser una capa completa. La túnica serosa, sobre la superficie que no está unida a la pared abdominal posterior, presenta pequeñas protuberancias colgantes formadas por tejido adiposo, los apéndices epiploicos. En el colón transversal hay un verdadero mesenterio (Ham, 1975; Leeson *et al*,1987; Leeson *et al*,1989).

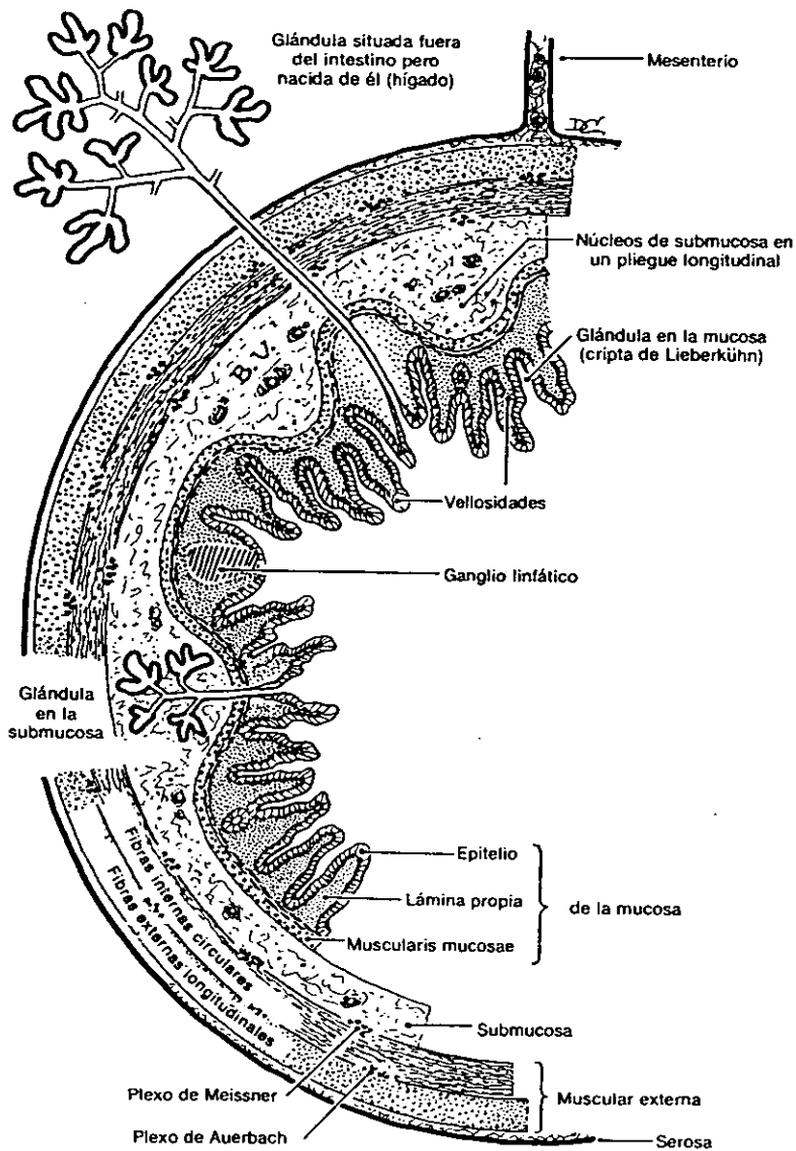


Fig.1. Esquema de la estructura general del tubo gastrointestinal.
 (Tomado de Ham, 1975).

B. ANTECEDENTES.

1.- ESTRATEGIAS DE INMUNIZACION PARA LA OBTENCION DE RESPUESTA INMUNE EN MUCOSAS.

Para lograr la inducción de respuestas inmunes en mucosas la ruta que más se ha empleado es la oral. Se han desarrollado varias estrategias de inmunización oral (Mesteckey *et al*; 1994), entre las que se incluyen la conjugación química (Robbins, 1989), el acoplamiento de antígenos a la subunidad B de toxina de cólera (Elson, 1989), la inmunización con bacterias (Curtiss, 1989), virus (Ogra, 1989) y el uso de adyuvantes (Holmgren, 1989) y la incorporación de antígeno a liposomas (Michalek, 1989). La eficacia de la inducción de la respuesta inmune en mucosas depende de la interrelación entre las propiedades fisicoquímicas del antígeno, el ambiente de la luz intestinal, la presencia de adyuvantes y la forma de administración (Shalaby, 1995).

2.- LA TOXINA DE COLERA.

En cuanto a los adyuvantes para la respuesta inmune en mucosas, uno de los más utilizados es la toxina de cólera que es una enterotoxina producida por *Vibrio cholerae*. La toxina de cólera es una proteína heterohexamérica producida en el lumen intestinal, está compuesta por dos tipos de subunidades: una enzimática A y otra subunidad B. El pentámero B se une al gangliosido GM1 en la membrana de las células epiteliales, y a otras células contenedoras de GM1. La subunidad A se inserta en el citosol activado por la reducción de un puente disulfuro y se asocia con uno o más factores citosólicos. El fragmento A1 se libera por reducción y es captado y catalizado por el NADH. El resultado es un incremento en la producción de AMP cíclico (cAMP). Y las consecuencias son: un incremento en la síntesis de prostaglandinas por la intoxicación celular, la acumulación excesiva de sal y agua en el lumen intestinal y la muerte celular. Los síntomas se manifiestan como inflamación severa y una diarrea intensa característica de la enfermedad. Del pentámero B su actividad no es tóxica (Spangler, 1992). Además la toxina de cólera es un fuerte inmunógeno de la mucosa. TC se ha usado como un adyuvante de la mucosa induciendo respuesta inmune contra antígenos coadministrados con ella e incrementando la inmunogenicidad mucosa y eficacia de las vacunas orales no replicables (Licke y Holmgren, 1986). Además de que la

inmunización con toxina de cólera produce una alta respuesta sistémica por ruta enteral y parental en ratas (Solbreux *et al*; 1990).

Los esfuerzos para estimular la inmunidad por la vía oral, pueden inducir tolerancia (Elson y Ealding, 1984), sin embargo la toxina de cólera es capaz de evitar la tolerancia oral a ciertos antígenos administrados oralmente. Estos efectos sugieren que la toxina de cólera es capaz de alterar la regulación del tejido linfoide asociado al intestino GALT (Elson *et al*; 1995)

En un estudio de el efecto del adyuvante toxina de cólera en la mucosa (Marinero *et al*; 1995) observaron que inmunizando ratones oralmente con toxoide tetánico (TT) y toxina de cólera como adyuvante se indujeron respuestas de IgA secretoria en el tracto gastrointestinal y en el suero IgG incluyendo las subclases IgG1 e IgG2b, el régimen oral indujó respuesta específica de IgE a TT y TC, encontrando también que la toxina de cólera estimulaba la producción de células CD4 en placas de Peyer y bazo. Los resultados presentaron que la toxina de cólera actuó como adyuvante mucoso porque incrementa a Th2 y en particular a la IL-4.

3.- INMUNOGLOBULINAS DE LAS MUCOSAS.

A pesar de que la importancia de la IgA en la protección inmune esta bien establecida, los mecanismos por los cuales se establece y se regula la respuesta inmune en las superficies mucosas son en gran parte especulativos (Mestecky *et al*; 1994) la función central de la IgA en la respuesta inmunitaria de las mucosas, se basa en el hecho de que tiene propiedades que le permite funcionar de manera más eficaz que los otro isotipos de inmunoglobulinas ya que puede neutralizar virus y también inhibir la fijación de bacterias a células epiteliales y es resistente a las proteasas microbianas. La IgA, es en el organismo humano la inmunoglobulina que tiene un índice de síntesis que excede a aquel de todas las inmunoglobulinas juntas. Otras inmunoglobulinas distintas de IgA también desempeñan una tarea importante en el sistema inmunitario de las mucosas. La IgM en las mucosas al igual que la IgA puede transportarse a través de la célula epitelial por un mecanismo también mediado por SC (Componente secretor). Esta capacidad de actuar como inmunoglobulina de las mucosas se muestra por el hecho de que, por lo general, reemplaza adecuadamente la IgA para producir inmunidad en mucosas en individuos con deficiencia selectiva de IgA sin embargo, la síntesis de IgG en mucosas es bastante baja, no se transporta a través del epitelio pero, sí tiene función en esta área (Childers, 1989; Brandtzaeg *et al*; 1989).

4.- ESTUDIOS DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN CONDICIONES NORMALES, EN CONDICIONES LIBRES DE GERMENES Y EN ANIMALES INMUNIZADOS.

En un trabajo realizando observaciones inmunohistoquímicas en tejidos linfoides de ratones libres de germen y convencionales de la cepa C₃H, (Crabbé *et al*; 1970) encontraron que en animales adultos convencionales, el bazo contenía en su mayoría linfocitos B de la clase IgM, en el intestino y menos extendido en el nódulo linfoide mesenterico, los linfocitos B de la clase IgA fueron los predominantes. No fueron encontrados linfocitos B en los tejidos linfoides de ratones recién nacidos, los primeros linfocitos B fueron observados después del quinto día de nacer y fueron de la clase IgM. Los tejidos linfoides extraintestinales de un adulto libre de germen se caracterizaron por una escasez de linfocitos B de clase IgG e IgA, donde los linfocitos contenían IgM en menor número que un ratón convencional y el intestino fue pobre en IgA.

En un trabajo (Weisz-Carrington, *et al* 1979) inmunizaron ratones por vía oral con una dosis de 1mg/ml de ferritina para ver la distribución de células plasmáticas de isotipo IgA, IgG, IgM productoras de anticuerpos antiferritina, tales anticuerpos fueron detectados por inmunofluorescencia, observados en diferentes sitios secretores como intestino delgado, glándulas mamarias, glándulas salivales y tracto respiratorio las observaciones sugirieron que células inmunizadas localmente via el intestino migran a sitios secretores distantes. Encontrando una cantidad predominante de células plasmáticas IgA en el GALT (del ingles gut-associated lymphoid tissue). Y en sitios secretores encontraron en Intestino delgado IgA 80%, IgM 14 %, IgG 6%, en glándulas mamarias IgA 84%, IgM 12%, IgG 4%, en la glándula parotida IgA 71%, IgM 22%, IgG 7%, y en el tracto respiratorio IgA 75%, IgM 17%, IgG 8%. Y se comprobó que las células estimuladas en un sitio exocrino pueden migrar a sitios exocrinos anatomicamente remotos no expuestos a antígenos.

En un estudio con ratas utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa antiIgA, antiIgG, antiIgM y antiIgE en tejidos como intestino delgado y en placas de Peyer (Sminia y Plesh, 1982) encontraron que el domo y la corona de placas de Peyer contenian un porcentaje de células con inmunoglobulinas de superficie en las siguientes proporciones; IgM 40%, IgG 40%, IgA 15% y un 5% para IgE. En la lámina propia de intestino delgado se encontraron células con inmunoglobulinas de superficie pero mucho más con inmunoglobulinas citoplásmicas presentes en

los siguientes porcentajes; 75% IgA, 20% IgG , 5% IgM y <1% IgE. Un año después (Sminia *et al*; 1983). Realizaron observaciones histológicas en la respuesta inmune intestinal a peroxidasa de rabano (HRP) en ratas inmunizadas con HRP por vías intraperitoneal, intravenosa, intraentérica e intraplacas de Peyer, encontrando que una sola inyección intraperitoneal o intraentérica induce la formación de células anti HRP en placas de Peyer y lámina propia y en el periodo inicial fueron localizadas muchas células blásticas en el área interfolicular de placas de Peyer, después más del 90% de las células antiHRP fueron localizadas en la lámina propia de las vellosidades teniendo la morfología de células plasmáticas.

5.- RESPUESTA INMUNE CONTRA *Entamoeba histolytica*

La amibiasis, la infección causada por *Entamoeba histolytica* continua siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo (Walsh,1986). *Entamoeba histolytica*, como la mayoría de los patógenos infecciosos penetra al organismo vía las superficies mucosas. Los trofozoítos de este parásito son los que afectan al intestino grueso del humano causando disentería y de ahí pueden diseminarse a otros organos como el hígado y provocar la amibiasis extraintestinal (Camacho, 1986).

El papel de la respuesta inmune contra la amibiasis es motivo de estudio. La respuesta inmune antiamiba se ha enfocado a la respuesta sistémica. En cuanto a la respuesta inmune en mucosas, de humanos se han detectado anticuerpos antiamiba en heces, leche y saliva. (Kretschmer 1986, 1990). En diferentes trabajos donde se analizan en ratones la respuesta inmune humoral, intestinal y sistémica inducida por la administración local y sistémica de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* fijados con glutaraldehído. Los resultados mostraron que por la administración local (intragástrica y rectal) o sistémica (intraperitoneal) se inducen respuestas de anticuerpos antiamiba de los tres isotipos mayoritarios (IgA, IgG, IgM), a nivel local (placas de Peyer y líquidos intestinales), aunque la magnitud de dichas respuestas varió dependiendo de la ruta de inmunización también se analizó, la cinética de la respuesta antiamiba, después de una sola inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído (Moreno-Fierros *et al*; 1992a, 1992b, 1994, 1995, 1996a, 1996b).

C.JUSTIFICACION.

En resultados previos del laboratorio se ha encontrado que la administración local y sistémica de trofozoítos fijados con glutaraldehído induce respuestas de anticuerpos de los tres isotipos mayoritarios en intestino delgado y grueso, en el intestino grueso la IgA parece no ser el isotipo predominante, por otra parte al analizar el efecto de toxina de cólera en la respuesta inmune local y sistémica anti*amiba* se observó que toxina de cólera no modifica la respuesta sistémica anti*amiba*, pero si tiene efecto sobre la respuesta intestinal. Este efecto es diferente en intestino delgado y dependiente de la ruta de inmunización. El isotipo predominante en la respuesta inmune de mucosas en intestino delgado es IgA, sin embargo la inmunización local o sistémica con trofozoítos fijados con glutaraldehído produce altas respuestas de anticuerpos de los tres isotipos mayoritarios. Este trabajo pretende determinar a nivel histológico si la inmunización local y sistémica con *amibas* fijadas con glutaraldehído modifica los linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA, IgG e IgM. Por otra parte ya que la toxina de cólera modifica las respuestas intestinales anti*amibianas* también se evaluara si la coadministración de toxina de cólera con trofozoítos fijados con glutaraldehído modifica los linfocitos B y células plasmáticas intestinales.

III.- OBJETIVOS.

1.-Generales.

Determinar si los linfocitos B y células plasmáticas de intestino delgado y grueso se modifican por efecto de dos inmunizaciones a: con amibas fijadas con glutaraldehído, b: con amibas fijadas con glutaraldehído y toxina de cólera, por la ruta de inmunización o por el adyuvante toxina de cólera.

2.-Específicos.

Determinar si la inmunización con amibas fijadas con glutaraldehído modifica las proporciones de linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA, IgG e IgM.

Precisar si la ruta de inmunización local o sistémica influye en la cantidad de linfocitos B y células plasmáticas.

Establecer si el empleo del adyuvante toxina de cólera modifica la cantidad de linfocitos B y células plasmáticas.

IV.- METODOLOGIA.

INMUNIZACIÓN

Se inmunizaron ratones Balb/c desparasitados de tres meses de edad, con amibas fijadas con glutaraldehído. Los animales recibieron cuatro inmunizaciones semanales de 500 000 trofozoitos y se sacrificaron siete días despues de la última inmunización. Las vías de inmunización que se utilizaron fueron la oral, la intraperitoneal y la intramuscular. Se inmunizaron 6 grupos de cinco ratones cada uno, 3 grupos con amibas fijadas con glutaraldehído solas y 3 grupos con amibas fijadas con glutaraldehído coadministradas con 10 microgramos de toxina de cólera (Moreno - Fierros *et al*,1995).

Grupo control: cinco ratones no inmunizados.

Amibas fijadas con glutaraldehído: Cultivos axénicos de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS en medio TYI, de 24-48 hrs. (Diamond *et al*, 1978), se cosecharon, se lavaron con PBS y se ajustaron a una concentración de un millón de células por ml., se fijaron por una hora con glutaraldehído al 0.25% y se lavaron cinco veces con PBS (Moreno-Fierros *et al*, 1992).

1.-OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACION DE LINFOCITOS B Y CELULAS PLASMÁTICAS.

a) Se tomó un cm de intestino delgado de la parte del duodeno cerca al estómago y un cm de intestino grueso del colón descendente cerca del recto y se fijaron en dos ml de fijador amortiguado de formaldehído con picrato (Stefanini *et al*, 1967) (Apendice 1).

b) Después de dos horas de fijación se lavaron con PBS 1:3, se incluyeron los tejidos en parafina con la técnica de Martoja (1970) de la siguiente manera:

Agua 30 min, alcohol 70% 30 min, alcohol 80% 30 min, alcohol 96% 30 min, alcohol 100% 45 min, alcohol amílico 24 h, Parafina I 2h, parafina II 2 h, inclusión definitiva en Paraplast en bloques de aluminio. Se orientaron los tejidos y se etiquetaron.

Se cortaron al microtomo de rotación (Marca American Optical) a cinco micras y se fijaron al portaobjetos con solución Ruyter y con calor en una estufa a 60°C.

Se llevo a cabo la técnica inmunohistoquímica para detección de linfocitos B y células plasmáticas. Esta se realizó utilizando anticuerpos comerciales contra inmunoglobulinas de ratón

peroxidado anti IgA (anti cadena alfa), anti IgG (anti cadena Fc gamma), y anti IgM (anti cadena Mu) de la siguiente manera:

- 1) Desparafinación con xilol I, xilol II durante 3 min cada uno.
- 2) Hidratación con alcoholes decrecientes a partir de alcohol al 100%, alcohol al 90%, y alcohol al 70% durante un minuto cada uno.
- 3) Inactivación de la peroxidasa endógena con 0.074% HCL en etanol al 100% (Weir *et. al*,1974). En una camara húmeda
- 4) Bloqueo con suero bovino al 1% en PBS 1x.
- 5) Incubación con los conjugados anti IgA, anti IgG y anti IgM marcados con peroxidasa en una dilución 1:100 en suero bovino al 1% en PBS 1x durante 24 h a 4°C.
- 6) Se lavó con PBS 1:3 dos veces.
- 7) Incubación con el sustrato diaminobencidina (DAB) con 20 mg de DAB en 100 ml de PBS 1:3 con 500 microlitros de peróxido de hidrógeno preparado de la siguiente manera: 33 μ de peróxido de hidrógeno al 30% + 967 ml de agua durante 30 min.
- 8) Se lavó con PBS 1:3 cuatro veces durante un minuto cada una.
- 9) Contratación con hematoxilina de Mayer por un minuto.
- 10) Deshidratación con alcoholes crecientes alcohol 70%,90% y 100%, por un min. cada uno y se monto en resina sintética. (Taylor y Burns,1974; Elson 1995).

Se observaron los cortes al microscopio y se tomaron fotografías con un microscopio (marca Zeiss modelo 473356-9901).

Se contarón las células que dieron reacción positiva en tres campos al azar en 40X, obteniendo los promedios. Debido a que los valores obtenidos con el conteo de linfocitos B y CP de los isotipos A, G y M por si mismos no revelaban diferencias se transformaron a porcentajes.

A los resultados se les aplicó el estadístico de ANOVA y de Tukey realizada con el programa (Statistica-SAS para Windows versión 3.11).

METODOLOGIA

INMUNIZACION RATONES Balb/C
cinco ratones por c/vía cuatro dosis una cada semana

GFT
(5×10^5
trofozoitos
por dosis)

GFT-CT
(5×10^5
trofozoitos
con 10 μ g de
tóxina
de colera)

CONTROL
ANIMALES NO
INMUNIZADOS

VIAS

I.P

I.M

ORAL

SACRIFICIO

Obtención de la muestra
1 cm del duodeno
1 cm del colon descendente

FIJACION
(Paraformaldehído
con picrato)
2 hrs

Técnica histológica
de rutina

ANTICUERPOS
contra Igs de
ratón peroxidados
anti IgA,
anti IgG, anti IgM

REACCION
INMUNOHISTO
QUIMICA

V.- RESULTADOS.

En el presente trabajo se realizó un estudio inmunohistoquímico en cortes de duodeno y de colon de ratones controles y de ratones inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído, utilizando anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados a peroxidasa, para determinar si, en el intestino, se modificaban las poblaciones de células plasmáticas y de linfocitos B de diferentes isotipos, por efecto de la inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído. La inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído, coadministrados con o sin toxina de cólera, por cualesquiera de las rutas ensayadas (oral, intraperitoneal, intramuscular), modificó los linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA e IgM; tanto en intestino delgado como en intestino grueso, ya que los intestinos de los animales inmunizados, presentaron un mayor porcentaje de de linfocitos B y células plasmáticas IgA y un menor porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgM, en relación al presentado por los controles (no inmunizados).

1.-Efecto de la inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído en Intestino Delgado.

Los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA, IgG e IgM observados en duodeno se muestran en la figura 2. En los controles se observó que IgM fue el isotipo predominante de linfocitos B y células plasmáticas; y además que los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas IgM de los controles (40 %) eran mayores a los de los inmunizados. En los diferentes grupos de animales inmunizados los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de los diferentes isotipos en intestino delgado, fueron variables; en los grupos oral e IP sin toxina de cólera predominó el porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgA (fig 4), en el grupo IM con toxina de cólera predominó el porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgG y en el resto de los grupos no se observó que predominara el porcentaje de algún isotipo en particular. En los grupos de animales inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído más tóxina de colera se observó un mayor porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgG (fig 5) en comparación con el observado en los grupos que recibieron trofozoítos fijados con glutaraldehído sin toxina de cólera.

Al comparar los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de diferentes isotipos en los intestinos delgados de los animales inmunizados por las diferentes vías con los de los controles, observamos que únicamente los animales inmunizados por la vía IP con trofozoítos fijados con glutaraldehído presentaron un porcentaje significativamente mayor ($p < 0.05$) de linfocitos B y células plasmáticas IgA (46 %), y un porcentaje significativamente menor ($p < 0.05$) de linfocitos B y células plasmáticas IgM, al presentado por los controles. Aún cuando solo el grupo IP presentó diferencias significativas, en general en los grupos de animales inmunizados se observó que el porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgM era menor y el de linfocitos B y células plasmáticas IgA era mayor al presentado por los animales controles (exceptuando el porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgA observado en el grupo de ratones inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído por la vía IM), (Figura 2).

2.-Efecto de la inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído en intestino grueso

Los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA, IgG e IgM, observados en colon descendente de los animales inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído en presencia o en ausencia de toxina de cólera, se muestran en la tabla 2 y figura 3. A diferencia de lo observado en intestino delgado, en intestino grueso no se observó que en los animales controles IgM fuera el isotipo predominante de linfocitos B y células plasmáticas, ya que los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de los tres isotipos se encontraron en proporciones similares. Sin embargo en los grupos de animales inmunizados se observó que IgA fue el isotipo que presentó un porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas predominante (fig. 6). En intestino grueso, todos los grupos de animales inmunizados presentaron porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas IgM significativamente menores ($p < 0.05$), y de linfocitos B y células plasmáticas IgA significativamente mayores ($p < 0.05$) a los observados en los controles. Estos resultados indican, que la inmunización local o sistémica con trofozoítos fijados con glutaraldehído en presencia o en ausencia de toxina de cólera modifica las proporciones de linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA e IgM (fig. 7), en colon descendente, pero no las proporciones de linfocitos B y células plasmáticas IgG.

3.-Efecto de la toxina de cólera.

Al comparar los grupos de animales inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera con los inmunizados únicamente con trofozoítos fijados con glutaraldehído, observamos que la toxina de cólera no modifica significativamente los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de los diferentes isotipos en intestino delgado y en intestino grueso. Aunque se observó una tendencia no significativa de los animales inmunizados con toxina de cólera a presentar un mayor porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgG.

4.-Intensidad de reacción de los anticuerpos

Además de cuantificar los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA, IgG e IgM se evaluó cualitativamente la intensidad de reacción (producción de anticuerpos por célula plasmática) de los diferentes isotipos en lámina propia y epitelio para determinar si existían diferencias regionales en la intensidad de reacción por efecto de la inmunización con trofozoítos fijados con glutaraldehído. La escala arbitraria utilizada para evaluar la intensidad de reacción fue la siguiente: 0=ausencia de reacción, 1=reacción baja, 2=reacción moderada, 3=reacción intensa, 4=reacción muy intensa. En la tabla 1 se muestra la intensidad de reacción presentada por los linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgG, IgM e IgA en los intestinos delgado y grueso de los animales inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído y trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera.

5.-Efecto de la intensidad de reacción en células plasmáticas de ratones inmunizados contra controles

6.- Intestino delgado.

En intestino delgado, en la lámina propia, en todos los grupos de animales inmunizados la intensidad de reacción de IgM fue menor a la observada en los controles que presentaron muy alta intensidad de reacción (a excepción de los inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído por la vía IM que tuvieron una intensidad de reacción fuerte igual a la de los controles). En lámina propia todos los grupos inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera, así como en el grupo inmunizado por la vía oral solo con trofozoítos fijados con glutaraldehído, presentaron una intensidad de reacción de IgM baja. En

tanto que el grupo IP-con trofozoítos fijados con glutaraldehído presentó una intensidad de reacción de IgM moderada.

En el epitelio, la intensidad de reacción de IgM en los controles fue fuerte, igual a la observada en los grupos IP-con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera y oral-con trofozoítos fijados con glutaraldehído. En el grupo IM-con trofozoítos fijados con glutaraldehído la intensidad de reacción fue mayor a la de los controles. En los grupos oral-con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera e IM-con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera la intensidad de reacción de IgM fue baja.

La intensidad de reacción de IgG en la lámina propia de la mayoría de los grupos de animales inmunizados fue mayor a la observada en los controles (fig. 5) (exceptuando al grupo de ratones inmunizados por la vía IM con toxina de cólera que presentaron una intensidad de reacción fuerte igual a la de los controles).

En el epitelio la intensidad de reacción de IgG fue variable en los grupos de animales inmunizados. Los controles presentaron una intensidad de reacción moderada al igual que los inmunizados por la vía IM con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera. Los grupos IP y oral con toxina de cólera y el grupo IM sin toxina de cólera presentaron una intensidad de reacción fuerte, mayor a la presentada por el control. El grupo oral presentó una intensidad de reacción muy fuerte mayor a la del control. Finalmente el grupo IP-con trofozoítos fijados con glutaraldehído no presentó reacción de IgG en el epitelio.

La intensidad de reacción de IgA en la lámina propia de los controles fue fuerte. Los grupos inmunizados por la vía IM con o sin toxina de cólera presentaron una igual intensidad de reacción que los controles. Los grupos inmunizados por la ruta oral con o sin toxina de cólera y el grupo inmunizado intraperitonealmente con trofozoítos fijados con glutaraldehído presentaron una intensidad de reacción muy fuerte, mayor a la de los controles (fig. 4). El grupo IP con toxina de cólera presentó una intensidad de reacción de IgA baja.

En el epitelio la intensidad de reacción de IgA en los controles fue fuerte igual a la presentada por el grupo inmunizado con trofozoítos fijados con glutaraldehído por la vía IM. Los grupos inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído por la vía oral con o sin toxina de cólera, presentaron una intensidad de reacción de IgA muy fuerte, es decir mayor a la observada en los

controles. Los grupos inmunizados por la vía IP con o sin toxina de cólera y por la vía IM con toxina de cólera presentaron una intensidad de reacción menor a la de los controles.

7.-Efecto de la toxina de cólera en la intensidad de reacción de los anticuerpos en intestino delgado.

El efecto de la toxina de cólera en la intensidad de reacción de los anticuerpos varió dependiendo de la ruta de inmunización, del isotipo de anticuerpo analizado y de la región (lámina propia o epitelio) evaluada, aunque de manera general observamos que por efecto de toxina de cólera la intensidad de reacción disminuyó o no se modificó (solo en el caso de la vía IP, la toxina de cólera incrementó la intensidad de reacción de IgM en lámina propia y la de IgG en el epitelio). El efecto de toxina de cólera en la intensidad de reacción de IgM fue variable, ya que por las vías IM y oral, la toxina de cólera provocó una disminución en la intensidad de reacción de IgM en el epitelio. Sin embargo por la vía IP se observó un efecto contrario pues los inmunizados por la vía IP sin toxina de cólera no presentaron reacción de IgM en el epitelio, mientras que los coadministrados intraperitonealmente con toxina de cólera presentaron una reacción fuerte. En la lámina propia por la vía oral toxina de cólera no modificó la intensidad de reacción mientras que por las vías IP e IM se observó que la intensidad de reacción de IgM fue menor en los coadministrados con toxina de cólera que en los inmunizados únicamente con trofozoítos fijados con glutaraldehído.

En la lámina propia por las vías IP y oral, la toxina de cólera no modificó la intensidad de reacción de IgG mientras que por la vía IM la toxina de cólera disminuyó la intensidad de reacción de IgG. En el epitelio por las vías oral e IM, la toxina de cólera disminuyó ligeramente la intensidad de reacción de IgG, mientras que por la vía IP la toxina de cólera provocó un incremento significativo.

En la lámina propia por las vías IP y oral, la toxina de cólera no modificó la intensidad de reacción de IgG mientras que por la vía IM la toxina de cólera disminuyó la intensidad de reacción de IgG. En el epitelio por las vías oral e IM, la toxina de cólera disminuyó ligeramente la intensidad de reacción de IgG, mientras que por la vía IP la toxina de cólera provocó un incremento significativo.

Al analizar el efecto de la toxina de cólera en la intensidad de reacción de IgA observamos que en la lámina propia la intensidad de reacción no se modifica por las vías oral e IM, sin embargo por la vía IP la intensidad de reacción de IgA disminuye notablemente en los coadministrados con toxina de cólera. En el epitelio se observó que por la vía oral-con toxina de cólera no modificó la intensidad de reacción de IgA mientras que por las vías IP e IM la toxina de cólera disminuyó la intensidad de reacción de IgA.

8.-Intestino grueso.

9.-Comparación de la intensidad de reacción de los anticuerpos en ratones inmunizados y controles

La intensidad de reacción de IgA en la lámina propia de los controles fue muy fuerte y en los inmunizados por las vías IM y Oral con o sin toxina de cólera fue igual de intensa. Por la vía IP con o sin toxina de cólera la intensidad de reacción de IgA fue fuerte, pero de menor intensidad a la de los controles. En el epitelio la intensidad de reacción de los inmunizados en general fue menor (baja o moderada) a la de los controles que mostraron una intensidad de reacción de IgA fuerte, exceptuando al grupo de animales inmunizados por la vía IM con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera que mostró una intensidad de reacción muy fuerte, mayor a la de los controles.

La intensidad de reacción de IgG en el epitelio de los animales inmunizados en general fue menor (moderada, baja o nula) a la presentada por los controles que mostraron una intensidad de reacción fuerte, exceptuando el grupo inmunizado oralmente con trofozoítos fijados con glutaraldehído que presentó una intensidad de reacción muy fuerte.

En la lámina propia la intensidad de reacción de IgG de los grupos inmunizados por las vías oral con trofozoítos fijados con glutaraldehído e IP-con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera fue muy fuerte igual a la de los controles, mientras que en el resto de los grupos inmunizados fue menor (por las vías IP-con trofozoítos fijados con glutaraldehído e IM-con trofozoítos fijados con glutaraldehído fue moderada y por las vías IM y oral con toxina de cólera fue fuerte).

La intensidad de reacción de IgM en el epitelio de los inmunizados fue menor (moderada, baja o nula) a la de los controles que presentaron una intensidad de reacción fuerte. En la lámina propia

la intensidad de reacción de IgM de los inmunizados fue menor a la de los controles que presentaron una intensidad de reacción muy fuerte. En los grupos IP-con trofozoítos fijados con glutaraldehído, IM-con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera y Oral-con trofozoítos fijados con glutaraldehído la intensidad de reacción de IgM fue baja en los grupos oral e IP con toxina de cólera fue moderada y en el grupo IM-con trofozoítos fijados con glutaraldehído la intensidad de reacción fue fuerte.

10.- Efecto de la toxina de cólera en la intensidad de reacción de los anticuerpos en Intestino Grueso

La toxina de cólera no modificó la intensidad de reacción de IgA en lámina propia en los inmunizados por las vías IP, IM y oral. Sin embargo en el epitelio el efecto de la toxina de cólera fue variable, ya que disminuyó la intensidad de reacción de IgA por las vías IP y oral e incrementó la intensidad de reacción por la vía IM.

La intensidad de reacción de IgG en la lámina propia se incrementó por efecto de la toxina de cólera en los inmunizados por las vías IP e IM, mientras que por la vía oral, la toxina de cólera disminuyó la intensidad de reacción de IgG. En el epitelio, por efecto de la toxina de cólera la intensidad de reacción de IgG disminuyó por las vías IP y oral, mientras que por la vía IM no modificó la intensidad de reacción. En la lámina propia, la intensidad de reacción de IgM se incrementó por efecto de la toxina de cólera por las vías IP y oral y disminuyó por la vía IM.

Mientras que en el epitelio el efecto de la toxina de cólera en la intensidad de reacción de IgM fue muy variable, disminuyó la intensidad de reacción por la vía IP, la incrementó por la vía oral y no se modificó por la IM.

Es importante mencionar que en el epitelio de los inmunizados por la vía IP con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera solo se observó una intensidad de reacción de IgA baja y que no se detectó reacción de IgG ni de IgM en el epitelio. El grupo inmunizado oralmente con trofozoítos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera también presentó una baja reacción de IgA e IgG.

PORCENTAJES DE LINFOCITOS B Y CELULAS PLASMATICAS IgA ,IgG , IgM EN DUODENO

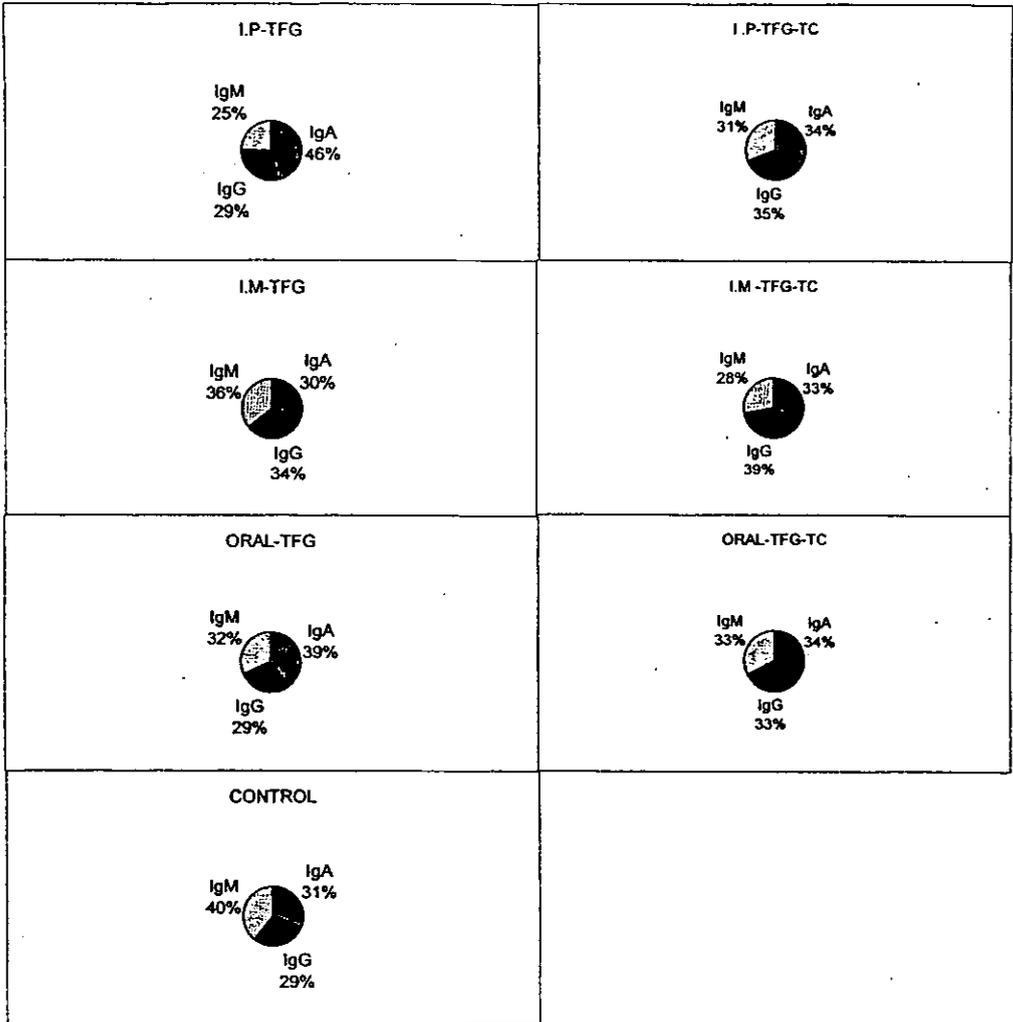


FIGURA 2. Porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas IgA, IgG, IgM en intestino delgado de ratones inmunizados por las vías IP, IM, y Oral con trofozoítos fijados con glutaraldehído con o sin tóxina de colera.

PORCENTAJES DE LINFOCITOS B Y CELULAS PLASMATICAS IgA ,IgG ,IgM EN COLON DESCENDENTE

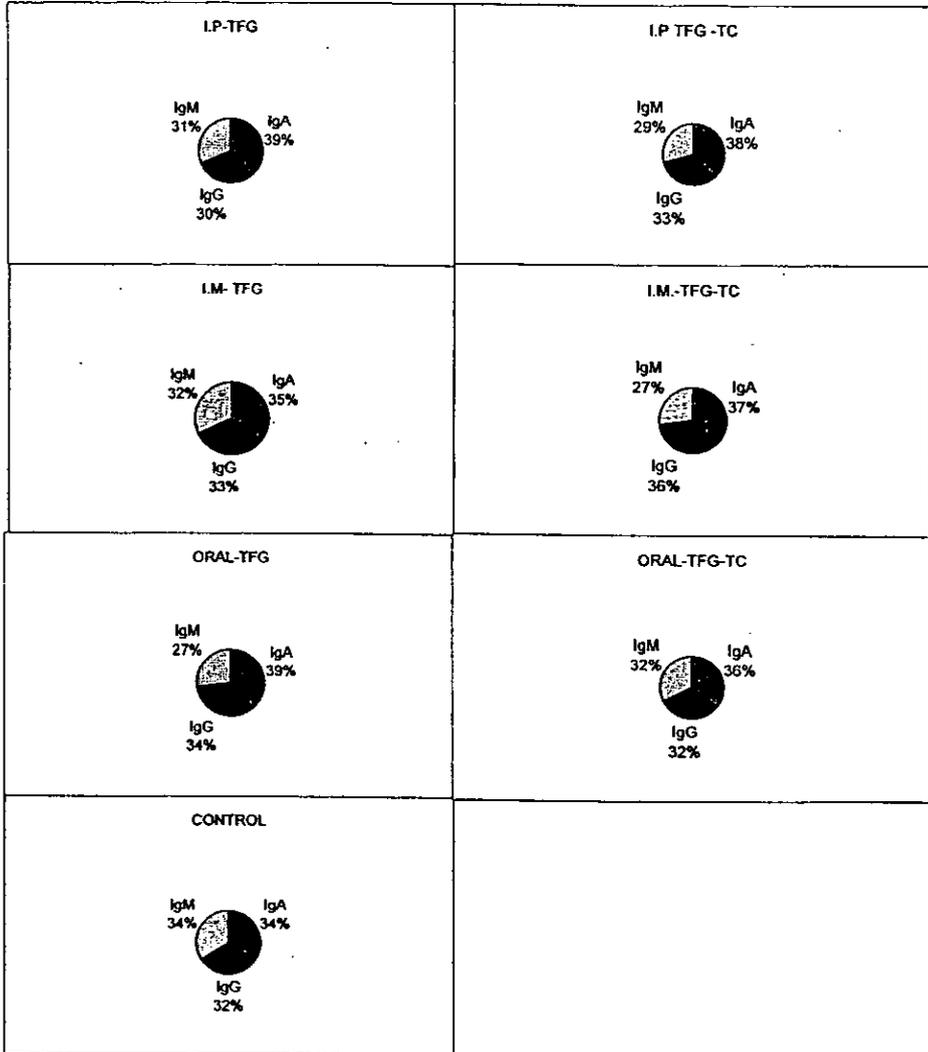


FIGURA 3 . Porcentajes de células plasmáticas IgA,IgG,IgM en intestino grueso de ratones inmunizados por las vías IP , IM y Oral con trofozoítos fijados con glutaraldehído con o sin tóxima de colera.

TABLA 1. Desviaciones estandar y medias de los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas en intestinos delgado y grueso.

CONTROL INTESTINO DELGADO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	CONTROL INTESTINO GRUESO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
IgA	31.20	7.43	IgA	34.10	6.88
IgG	29.49	8.02	IgG	32.10	5.73
IgM	39.29	4.50	IgM	33.76	2.68
IP TFG			IP TFG		
IgA	46.41	10.28	IgA	38.79	6.97
IgG	29.05	5.42	IgG	29.74	10.70
IgM	24.50	8.41	IgM	31.45	10.91
IP TFG-TC			IP TFG-TC		
IgA	33.62	5.77	IgA	38.06	14.42
IgG	35.65	5.82	IgG	32.84	9.02
IgM	30.70	8.96	IgM	29.07	9.98
IM TFG			IM TFG		
IgA	30.09	6.18	IgA	35.08	11.31
IgG	34.45	11.10	IgG	32.99	6.29
IgM	35.43	12.07	IgM	31.90	7.56
IM TFG-TC			IM TFG-TC		
IgA	33.46	6.90	IgA	37.32	9.48
IgG	38.62	6.10	IgG	35.54	9.54
IgM	27.84	6.59	IgM	27.11	7.14
ORAL TFG			ORAL TFG		
IgA	39.10	7.70	IgA	38.73	7.84
IgG	29.08	6.98	IgG	34.22	7.27
IgM	31.8	2.01	IgM	27.03	8.14
ORAL TFG-TC			ORAL TFG-TC		
IgA	34.02	12.20	IgA	35.36	11.18
IgG	33.38	10.65	IgG	32.49	11.68
IgM	32.58	10.95	IgM	32.12	8.10

Tabla 2. Intensidad de reacción de los anticuerpos IgA, IgG, IgM, en las células de la mucosa intestinal.

VIA	CLASE DE	INTESTINO DELGADO		INTESTINO GRUESO	
		LAMINA PROPIA	EPITELIO	LAMINA PROPIA	EPITELIO
	Igs				
	IgA	3	3	4	3
CONTROL	IgG	3	2	4	3
	IgM	4	3	4	3
	IgA	4	2	3	2
IP TFG	IgG	4	0	2	2
	IgM	2	0	1	2
	IgA	1	1	3	1
IP TFG-TC	IgG	4	3	4	0
	IgM	1	3	2	0
	IgA	3	3	4	2
IM TFG	IgG	4	3	2	2
	IgM	4	4	3	2
	IgA	3	1	4	4
IM TFG-TC	IgG	3	2	3	2
	IgM	1	1	1	2
	IgA	4	4	4	2
ORAL TFG	IgG	4	4	4	4
	IgM	1	3	1	1
	IgA	4	4	4	1
ORAL TFG-TC	IgG	4	3	3	1
	IgM	1	1	2	2

REACCION DEL ANTICUERPO

0=AUSENTE

1=BAJA

2=REGULAR O
MODERADA

3=FUERTE

4=MUY FUERTE

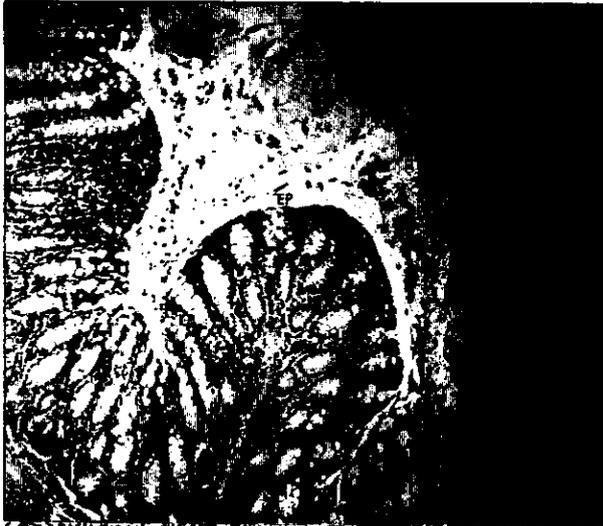


Fig. 4. Efecto de la inmunización con TFG en las poblaciones de células IgA en intestino delgado de ratón. Cortes transversales de intestinos delgados de ratón. (1) Control e inmunizados con TFG como se describe en métodos por las vías oral (2), (3). La inmunización por las vías Oral e IP, provocó un incremento en los porcentajes de linfocitos B y CP IgA y la intensidad de reacción de IgA en la lámina propia y epitelio. Se aprecia que el control (1) 63X, presenta un menor número de linfocitos B y CP IgA que el inmunizado por la vía Oral (2) 63X y (3) 400X. En (3) se aprecia la lámina propia y el epitelio. Contraintinción con hematoxilina de Mayer

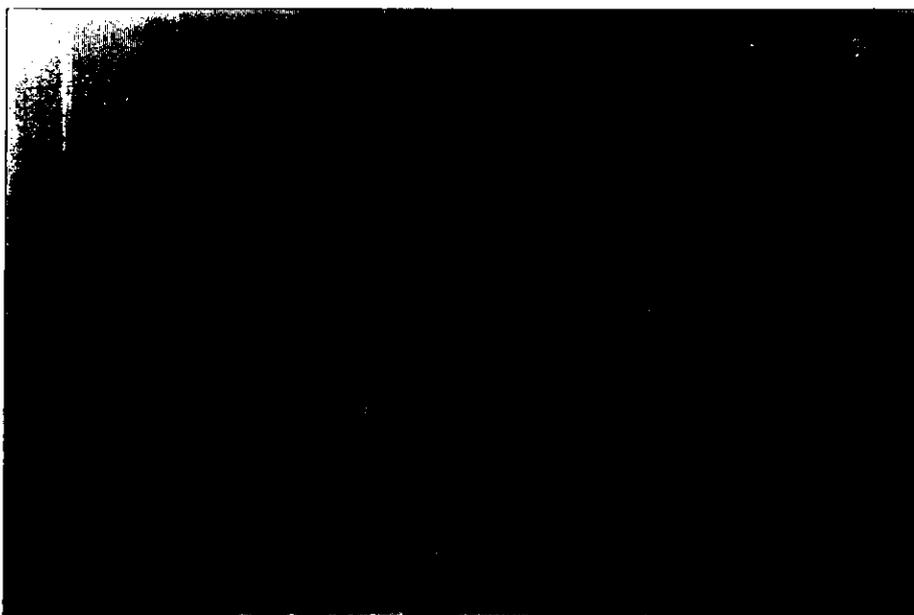


Fig. 5. Efecto de la inmunización con TFG con o sin toxina de cólera en la reacción de IgG en intestino delgado de ratón. La inmunización con TFG con o sin TC por las vías IP, IM, y Oral, aumentó la intensidad de reacción de IgG. Cortes transversales de intestinos delgados de ratón, (1) Control 40X y (2) inmunizado por la vía Oral 40X. Contratinción con hematoxilina de Mayer.



Fig. 6. Efecto de la inmunización con TFG con o sin TC en la reacción de IgA en intestino grueso de ratón. La inmunización con TFG con o sin TC, aumentó los porcentajes de linfocitos B y CP IgA. Se aprecia en los cortes transversales de IG que la intensidad de reacción en la lámina propia y en el epitelio del control (1) 63X es menor que la del inmunizado por la vía IM (2) 63X. Contratación hematoxilina de Mayer.

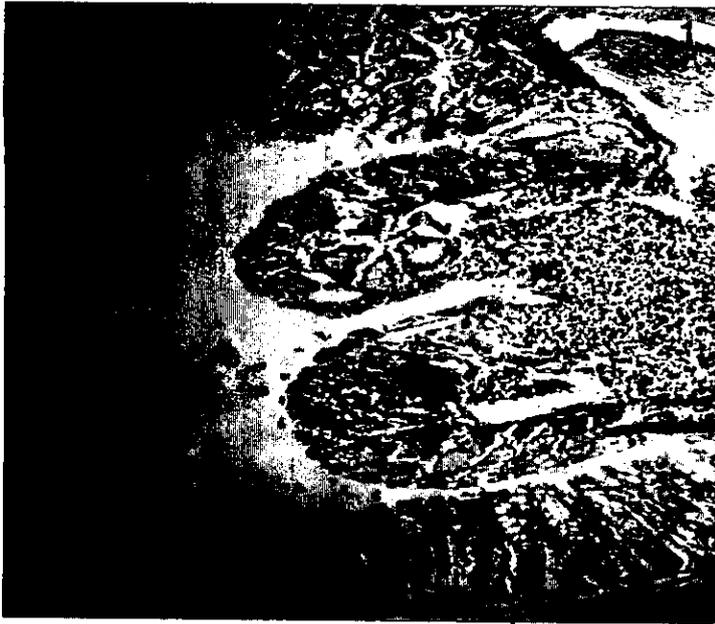


Fig. 7. Efecto de la inmunización con TFG con o sin TC en la reacción de IgM en intestino grueso de ratón. La inmunización con TFG con o sin TC, por las vías IP, IM y Oral disminuyó los porcentajes de linfocitos B y CP IgM y la intensidad de reacción de IgM. Se aprecia que en el control (1) 63X. La intensidad de reacción y el número de células plasmáticas IgM es mayor que en el inmunizado por la vía oral (2) 63X. Contratinción hematoxilina de Mayer.

VI.- DISCUSION

En este trabajo se encontró que la inmunización con amibas fijadas con glutaraldehído, modifica las células plasmáticas y linfocitos B de los isotipos IgA e IgM en intestinos delgado y grueso de ratones Balb/c; ya que los intestinos de los animales inmunizados presentaron un mayor porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgA y un menor porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgM en relación a los presentados por los controles no inmunizados.

Sin embargo, es importante mencionar que los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de los distintos isotipos encontrados en el presente trabajo, en los intestinos de los ratones controles e inmunizados, difieren de los reportados utilizando inmunfluorescencia indirecta en intestinos de humano, rata y ratón no inmunizados. Crabbé et al (1970), encontraron que en intestino delgado de ratón predominaban las células plasmáticas IgA, Sminia y Plesh (1982), encontraron en la lámina propia de intestino delgado de ratas los porcentajes eran IgA (75%), IgG (20%), IgM (5%), mientras que Brandtzen et al, (1994), encontraron en intestino delgado de humanos en duodeno y yeyuno un porcentaje de células plasmáticas IgA (79%), IgG (3%), IgM (18%).

Las células plasmáticas del isotipo IgA tienen una distribución mayor en la lámina propia (Ham 1975, y Leeson *et al*, 1987), además en la lámina propia del intestino delgado del hombre en promedio el 85% de las células B contienen IgA 5%, IgG y 10% IgM (Ernst *et al*, 1985). Una cifra estimada entre 70-80% de todas las células productoras de Igs en humanos están localizadas en la mucosa intestinal y se ha reportado una cifra comparable (>80%) en ratones (Vander *et al*, 1987).

Nosotros no observamos que en los controles predominara el porcentaje de células plasmáticas de IgA, de hecho en intestino delgado observamos que el isotipo que predominó en porcentaje fue IgM; y si bien en los inmunizados observamos un incremento en los porcentajes de plasmáticas de IgA, no observamos que nuestros valores de porcentajes de IgA fueran del orden del 80% como los reportados por otros autores. Las causas a las que podríamos atribuir el contraste de nuestros datos con los de los diferentes autores podrían ser las diferencias metodológicas, diferencias interespecies o a la influencia de factores ambientales. El trabajo de

Crabbé *et al* (1970) fue realizado en ratones sin embargo la cepa por ellos empleada fue C₃H y no Balb/c por lo que son de haplotipo diferente. Se sabe que la flora intestinal influye significativamente en las poblaciones de células plasmáticas observadas en la lámina propia y en el desarrollo de las placas de Peyer. En ratones libres de gérmenes se ha observado que los tejidos linfoides extraintestinales se caracterizan por una escasez de linfocitos B de las clases IgA e IgG y en el intestino de IgA Crabbé *et al* (1970).

En los animales inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído, se observó un incremento en el porcentaje de células plasmáticas del isotipo IgA, aún cuando en este trabajo no se cuantificaron las células plasmáticas específicas anti amiba, podríamos suponer que parte de estas células incrementadas contienen anticuerpos anti amiba; basándonos en datos previos del laboratorio en los que se ha demostrado que la inmunización local o sistémica con trofozoítos fijados con glutaraldehído incrementa la respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti amiba tanto a nivel intestinal como sistémica específica. La respuesta anti amiba se ha evaluado mediante ELISPOT en células de placas de Peyer y en bazo (Moreno-Fierros *et al*; 1994), y por ELISA en suero y en contenidos de intestinos delgado y grueso (Moreno-Fierros *et al*; 1995).

El hecho de que la población incrementada en porcentaje por efecto de la inmunización fuera la de IgA es importante porque es un isotipo que tiene mayor valor protector que IgM que fue más abundante en los controles. Es bien sabido que la IgA participa de manera importante en la protección inmune de las mucosas Mestecky *et al* (1994). La IgA tiene propiedades que le permiten funcionar de manera más eficaz que los otros isotipos de anticuerpos, además puede neutralizar virus e inhibir la adhesión bacteriana a células epiteliales Childers (1989).

Por otra parte es importante mencionar que en trabajos previos se ha observado que la inmunización con amibas induce altas respuestas de anticuerpos IgG anti amiba a nivel intestinal, en comparación con las que se obtienen utilizando otros inmunógenos con los que en general únicamente se reportan respuestas de IgA (Lamm, 1997). Sin embargo algunos autores no reportan otros isotipos porque no los analizan (Haneberg *et al*; 1994, Hopkins *et al*; 1995). En trabajos previos del laboratorio, se encontró que en intestino grueso por las vías rectal e IM las respuestas de anticuerpos anti amiba del isotipo IgG son de igual magnitud a las de IgA; pero en el presente trabajo, en general no observamos que las células plasmáticas de IgG varíaran significativamente en los intestinos por efecto de la inmunización. Únicamente se observó que

por la vía IM se incrementó el porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgG en intestino delgado y que en los grupos coadministrados con toxina de cólera en general se observó mayor número de células IgG. Se sabe que la síntesis de IgG en mucosas es bastante baja, y que no se transporta a través del epitelio (Childers 1989).

Kaetzel y col. (1994), utilizando células epiteliales de riñón de perro Madin-Darby que expresan pIgR demostraron la necesidad de IgA monomérica a permanecer en un complejo inmune con dIgA para ser transportada ya que, mIgA y mIgG pueden participar junto con dIgA en la vía de excreción para la eliminación local del complejo inmune de IgA, esto lleva a pensar que los anticuerpos monoméricos tienen el potencial a participar en el sistema inmune de mucosas. Los porcentajes de inmunocitos productores de IgG encontrados en duodeno y yeyuno se encuentran en un rango del 3% en tejidos mucosos en ausencia de inflamación, (Brandtzaeg et al;1993), El concepto de una respuesta local de IgG es de gran interés en el contexto de una vacunación local porque, la inducción de una inmunidad regional asociada a IgG puede permanecer *in situ* en defensa de la mucosa después de una invasión y acaso complementarse con S-IgA como una barrera inmune a los patógenos mucosos (Berneman et al;1998).

Las razones por las que, a pesar de que sabemos que la inmunización con TFG incrementa las respuestas de anticuerpos IgG anti amiba en intestino, no fue posible detectar cambios en las poblaciones de células IgG en los animales inmunizados pueden deberse a que con la metodología empleada, nosotros no estamos cuantificando a las células plasmáticas específicas anti amiba y por otra parte posiblemente se incrementó la síntesis de las plasmáticas con IgG anti amiba pero no el número de células IgG. En apoyo a esta última posibilidad podemos mencionar que la intensidad de reacción de IgG en lámina propia de intestino delgado en los animales inmunizados por las vías oral e IP con o sin toxina de cólera, fue mayor a la de los controles.

El concepto original del sistema inmune común de mucosas, establece que existen diferencias entre el sistema inmune sistémico y entre el asociado a las superficies mucosas; las principales diferencias son que en el mucoso, existe un predominio del isotipo IgA, la presencia de células M en el epitelio de los sitios inductores y el concepto de que la estimulación de una respuesta en mucosas da como resultado respuestas inmunes en todas las superficies mucosas (Strober y Brown, 1988). Sin embargo, varias evidencias indican que dentro del sistema inmune asociado a mucosas existen diferencias regionales (Moreno-Fierros et al;1999). En trabajos previos del

laboratorio encontramos diferencias entre los intestinos delgado y grueso, en el isotipo de anticuerpos anti amiba inducidos y en el patrón de antígenos amibianos reconocidos de manera predominante. En el presente trabajo, se observaron diferencias en los porcentajes de células plasmáticas de los diferentes isotipos, entre los intestinos delgado y grueso de los animales controles; pues en el delgado se observó que predominaban los linfocitos B y células plasmáticas IgM, mientras que en el grueso se observaron porcentajes similares de los tres isotipos analizados. En los animales inmunizados también se observaron diferencias entre los intestinos delgado y grueso; ya que en el intestino grueso de todos los grupos inmunizados predominó el porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgA, mientras que en el intestini delgado los porcentajes de linfocitos B y células plasmáticas de los diferentes isotipos fueron variables en los diferentes grupos de animales inmunizados. Estas diferencias regionales existentes entre el intestino delgado y grueso, apoyan el concepto de la regionalización de la respuesta inmune en mucosas. Otros trabajos inmunohistoquímicos que apoyan la regionalización de la respuesta inmune son primero aquellos que apoyan la idea de una diferente inmunoregulación regional en el sistema inmune de mucosas (Underdown and Mestecky, 1994, Phillips, 1994, Brandtzaeg 1994), otros apoyan la idea de que las células B se diferencian en varias regiones del sistema inmune de mucosas, por ejemplo, en suero la respuesta de las subclases de IgG, son influenciadas por la naturaleza del antígeno estimulador (Papadeu, 1989). La regionalización del sistema inmune de mucosas es más evidente en el tracto genital, con diferencias significativas del intestino. Las características básicas del tracto intestinal que están ausentes o incóspicuas en el tracto genital, incluyen transporte de antígenos por las células M epiteliales, los nódulos linfoides mucosos y el predominio de IgA, dado que en secreciones genitales IgG es el isotipo predominante (Parr, 1994).

En este trabajo observamos que la coadministración de toxina de colera no modificó significativamente las poblaciones de células plasmáticas en intestino grueso e intestino delgado en los animales inmunizados con trofozoítos fijados con glutaraldehído; pues únicamente se observó una tendencia a presentar mayor porcentaje de linfocitos B y células plasmáticas IgG. En resultados previos del laboratorio observamos que la coadministración de toxina de colera no modifica la respuesta de anticuerpos anti amiba a nivel sistémico; aunque a nivel intestinal si observamos variaciones en la respuesta de anticuerpos anti amiba dependientes del isotipo

analizado, la ruta de inmunización y la región (intestino delgado o grueso) analizada. Además observamos que solo por la ruta oral la toxina de cólera modifica el patrón de proteínas amibianas reconocidas de manera predominante por anticuerpos IgG.

La toxina de cólera es el adyuvante mucoso más efectivo y mejor estudiado, sin embargo aún no se conocen bien los mecanismos responsables de la función adyuvante de la toxina de cólera. Se ha reportado que la inmunización oral de (Hemocianina) KLH junto con la toxina de cólera y seguida de la estimulación "in vitro" estimula tanto a las células T CD4+ productoras tanto de linfocinas Th1, como Th2 (Hornquist et al 1996). En contraste, Xu-Amano et al (1993) reportaron que "in vivo" la toxina de cólera induce selectivamente las respuestas Th2 en ratones C57b1/6 inmunizados con toxoide tetánico. Sin embargo, usando la toxina de cólera sistémicamente como adyuvante para el mismo antígeno, estos autores encontraron que la estimulación de células T CD4+ tanto de Th1 como de Th2, sugiriendo que la ruta de inmunización más que la presencia de tóxina de colera era la responsable del patrón de linfocinas inducido.

La inmunización oral de KLH más el adyuvante toxina de cólera provoca mucho mayores respuestas de células productoras de anticuerpos anti KLH y de respuestas de células T CD4+ productoras de interferón gamma en lámina propia de ratones CD8-/- comparados con las respuestas de los ratones normales C57B1/6. Sin embargo no se encontraron diferencias en las respuestas sistémicas de células T y B hacia KLH entre ratones CD8-/- y normales, sugiriendo que las células T CD8+ tienen una función de regulación negativa de las respuestas inmunes mucosas, la cual podría existir a nivel de los sitios inductores (placas de Peyer) o de los sitios efectoros (lámina propia), o en ambos sitios en los ratones normales. De lo anterior, se puede apreciar que existe controversia en relación al papel modular de la toxina de cólera como adyuvante, sobre las respuestas de células Th, ya que no se sabe si el tipo de respuesta Th depende de la ruta de inmunización o del antígeno "per se". Por otro lado, los efectos de la toxina de cólera se han evaluado básicamente en modelos en los que la coadministran con antígenos solubles, por lo que no se sabe que ocurre con la respuesta humoral y celular cuando la toxina se coadministra con antígenos particulados complejos como las amibas fijadas con glutaraldehído. Además, existen parámetros de la respuesta inmune sobre los que no se ha evaluado el efecto de la toxina de cólera.

Los efectos de la toxina de cólera en la respuesta inmune se han analizado mediante la coadministración de toxina de cólera con antígenos solubles simples; la mayoría de las veces empleando la ruta oral, pero no se ha analizado el efecto de la toxina de cólera coadministrada con otros antígenos complejos como las amibas fijadas con glutaraldehído. La toxina de cólera tiene propiedades adyuvantes preferentemente sobre la respuesta de anticuerpos IgA, cuando se coadministra con proteínas solubles por la ruta oral.

Datos de nuestro laboratorio sugieren que los efectos adyuvantes de la toxina de cólera no son universales, ya que varían dependiendo del antígeno coadministrado, del isotipo analizado, de la ruta de inmunización y de la región mucosa donde se analice la respuesta inmune.

Es necesario realizar más investigación básica para conocer los mecanismos de la inducción y regulación de la respuesta inmune intestinal; ya que la respuesta inmune mucosa en los sitios específicos varía dependiendo del antígeno, la ruta de administración y la especie analizada.

La inmunización con trofozoitos fijados con glutaraldehído modifica las proporciones de linfocitos B y células plasmáticas IgA e IgM en intestino delgado y grueso, además la coadministración de toxina de cólera con trofozoitos fijados con glutaraldehído no modifica las proporciones de IgA, IgG, e IgM en intestino delgado y grueso.

VII.- CONCLUSIONES

1.- La inmunización con trofozoitos fijados con glutaraldehído modifica a los linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA (incrementandolos) e IgM (decrementandolos) en intestinos delgado y grueso de ratones Balb/C

2.- La vía de inmunización intraperitoneal con trofozoitos fijados con glutaraldehído incrementa los linfocitos B y células plasmáticas IgA en intestino delgado

3.-La inmunización con trofozoitos fijados con glutaraldehído más toxina de cólera no modifica a los linfocitos B y células plasmáticas de los isotipos IgA, IgG e IgM en intestino delgado y grueso.

4.-En intestino delgado la inmunización con trofozoitos fijados con glutaraldehído con o sin toxina de cólera, en lámina propia y epitelio aumentó la intensidad de reacción de los anticuerpos de IgG y disminuyó la de IgM, en tanto que en intestino grueso en lámina propia disminuyó la intensidad de reacción de IgG e IgM, y en epitelio disminuyó la intensidad de reacción de los tres isotipos.

1.- APENDICE 1

AMORTIGUADOR DE FORMALDEHÍDO CON PICRATO.

Paraformaldehído 20g
Ácido picrico (solución acuosa saturada, filtrada) 150 ml

Calentar a 60°C ,añadir 2-5 gotas de hidróxido de sodio .1.0 M (4%) acuoso, necesario para disolver el paraformaldehído. Filtrar, enfriar y llevar a 1000 ml con el siguiente amortiguador de fosfatos.

Fosfato de sodio, monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 3.31g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 17.89g

Agua llevar a 1000 ml.

Nota: El pH es 7.3. este fijador es estable por más de 12 meses a temperatura ambiente, el picrato no precipita las proteínas en solución neutra y las razones porque se improvisa la preservación de la estructura y antigenicidad no se conocen.

IX.-BIBLIOGRAFIA.

Berneman, A., Belec, L., Fischetti, A. and Bouvet, J. P.1998. The specificity patterns of human immunoglobulin G antibodies in serum differ from those in autologous secretions. *Infect. Immun.* 66(9):4163-4168.

Brandtzaeg, P. Hastensen, T.S. Kett, K., Krajel, P., Kavale, D., Rognum, T.O., Scott, H., y Sollid, L.M. 1989. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology.* 97:1562-1584.

Brandtzaeg, P.1994.Distribution and characteristics of mucosal immunoglobulin-producing cells.In Handbook of mucosal immunology.(P.L.Ogra,W,Strober,Mestecky,M.Lamm McGhee,J.R., y Bienestock Ed).pp:251-261..Academic Press. Inc.Usa.

Biewenga, J., Van Rens, E.P. and Sminia, T. 1993 Induction and regulation of IgA responses in microenvironment of gut. *Clinical Immunology and Immunopathology.* 67:1-7.

Camacho, V.C. 1986. La amibiasis y su terapéutica. *Atención médica* 6:14-15, 25-28.

Childers, N.K. 1989. Molecular mechanisms of immunoglobulin a defense. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:503-536.

Crabbe, P.A., Nasch, D.R, Bazin, H., Eyssen, H. y Heremans , J.F. 1970. Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice. Laboratory investigation. 22:(5) 448-457.

Curtiss, R., Kelly, S. M., Gulig, P. A. and Nakayama, K. Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. *Current Topics in microbiology and Immunology.* 146:35.

Diamond, L.S., Harlow, D.R., y Cunnick, C.C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba* transaction. *Of the Royal society of Tropical Medicine and Hygiene* 72:431-432.

Elson, C.O. y Ealding W. 1984. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with colera toxin. *The Journal of immunology*. 132: (6) 2736-2741.

Elson, C.O., y Ealding W. 1984. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *The Journal of immunology*. 133(6) 2892-2897.

Elson, C.O. Holland, S.P., Dertzbaungh, M.T., Cuff, C.F., y Anderson, A.O. 1995 Morphologic and functional alterations of mucosal T cells by cholera toxin and Hs B subunit 1. *The Journal of immunology*. 154:1032-1040.

Elson, C.O. 1989. Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 146: 29.

Ernst, P.B., Befus, A.D., Bienenstock, J. 1985. Leukocytes in the intestinal epithelium: An unusual immunological compartment. *Immunol. Today*. 6:50-56.

Ham, A.W. 1975. *Tratado de Histología*. Ed. Interamericana 7a. México D.F. pp 608-610.

Haneberg, B. Kendall, D., Amerongen, H. M., Apter, F. M., Kraehenbuhl, J. P., and Neutra, M. R. 1994. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immun.* 62: 15-23.

Holmgren, J., Clemens, J. Sack, D.A., Sanchez, J., and Svenneholm, A. M. 1989. Oral immunization against cholera. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 146: 197.

Hopkins, S., Kraehenbuhl, J. P., Schodel, F., Potts, A., Peterson, D., De Grandi, P., and Nardelli-Haeffliger, D. 1995. A recombinant *Salmonella tiphimurium* vaccine induces local immunity by four different routes immunization. *Infect. Immun.*63(9):3279-86.

Hornquist, E. Grdic, D. Mak T and Li-K, N. 1996. CD8-deficient mice exhibit augmented mucosal immune responses and intact adjuvant effects to cholera toxin . *Immunology.*87:220-229.

Kaetzel, C.S., Robinson, J.K., Lamm, M.E. 1994). Epithelial transcytosis of monomeric IgA and IgG cross-linked through antigen to polymeric IgA. A role for monomeric antibodies in the mucosal immune system. *J. Immunology.*152(1) :72-76.

Kretschmer, R.R. 1986. Immunology of amebiasis Human Parasitic diseases. Series. Vol 2. (Martinez-Palomo ed.) pp 95-165. *Elsevier Science Publishers Amsterdam.*

Kretschmer, R.R. 1990. Immunology of amebiasis. *Introduction In Amebiasis.* (R. Kretschmer ed) pp 59. CRC. press. USA.

Leeson, C.R., Leeson, T. S., Paparo, A.A. 1987. Histología. Ed. Interamericana, 5a. ed. México. D.F. 346-348.

Leeson, T.S., Leeson, C.R., Paparo A.A. 1989. Texto-Atlas de Histología. Ed. Interamericana. México. D.F. pp 419-459.

Lefrancoise; L. 1991. Intraepithelial lymphocytes of the intestinal mucosa: curioser and curioser. *Sem. Immunol.* 3:99.108.

Lycke, N., and Holmgren, J.1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology.* 59:301-308.

Marinaro,R.,Staats,H.F.,Hiroi,T.1995.Mucosal adjuvants effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2(Th2) cells and Il-4'. *The Journal of immunology*.155: 4621-4629.

Martoja,R.1970.Técnicas de histología animal.Ed.Toray-Masson.Barcelona España.pp.1-5,7-9.

McGhee,J.R.,Mestecky,J.,Dertzbaugh,M.T.,Eldridge,J.H.,Hirasawa,M.,Kiyono,H.1992.The mucosal immune system:from fundamental concepts to vaccine development.*Vaccine*.10:75-88.

Mestecky,J,Araham,R., y Ogra,P.L.1994.Common mucosal immune system and strategies for the development of vaccines. Effective at the mucosal surfaces. In Handbook of mucosal immunology. (P.L. Ogra,W, Strober, Mestecky, M.Lamm McGhee,J.R., y Bienestock Ed). pp:357-371.Academic Press. Inc.Usa.

Michalek, S. M., Childers, N.K., Kats, J. Denys, F.R., Berry, A.K. Eldrige, J. H., McGhee, J.R., and Curtis, R. 1989. Liposomes as oral adjuvants. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 146:51.

Moreno-Fierros, L.,Campos,R.R, y Enriquez,R.F.1992a. Sex differences in systemic and local immune responses to *Entamoeba histolytica* after intraperitoneal and rectal immunization in Balb/c mice.*Arch.Med.Res*.23:(2) 153-155.

Moreno-Fierros, L Campos, R. R., y Enríquez, R.F.1992 b. Kinetics of the anti-amebic antibody producing cells response in Peyer's patches and spleen after both local and systemic stimulation in Balb/c mice.*Arch.Med.Res*.23: (2) 165-168.

Moreno-Fierros,L.,Dominguez,R.M.C., y Enríquez,R.F. 1994. The use of an ELISPOT assay to evaluate intestinal and systemic antibody responses to locally administered *Entamoeba histolytica* antigen in mice. *Arch.Med.Res*. 25: (2) 183-187.

Moreno-Fierros, L., Domínguez, R. M. C. y Enríquez, R. F. 1995. *Entamoeba histolytica*; induction and isotype analysis of antibody producing cell responses in Peyer's patches and spleen after local and systemic immunization in male and female mice. *Experimental parasitology*. 80:541-549.

Moreno-Fierros, L., y Enríquez, R. F. 1996a. Quantification and isotype analysis of the serum antiamebic antibody response produced after mucosal and systemic immunization in male and female mice. *Folia Biologica. (Praha)*. 42:99-103.

Moreno-Fierros, L. Domínguez, R. M. C., Enríquez, R. F. 1996b. Immunodominant *Entamoeba histolytica* antigens recognized by serum and intestinal antibodies after local or systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed trophozoites. *Life Sciences*. 59:1283-1295.

Moreno-Fierros, L., Reséndiz-Albor, A. A. López- Revilla, R. 1999. Different antiamebic antibody isotype patterns in the large and small intestine after local and systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Life Sciences*. 64 (13): 1079-1089.

Ogra, P. L., Leibovitz, E.E., and Zhao-Ri, G. 1989. Oral immunization and secretory immunity to viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 146: 73.

Papadeu, C. And Check, I.J. 1989. Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: Biochemical, genetic, and clinical aspects. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*. 27:27-58

Parr, M.B. and Parr, E.L. 1994. Mucosal immunity in the female and male reproductive tracts. In *Handbook of mucosal immunology*. (P.L.Ogra, W, Strober, Mestecky, M.Lamm McGhee, J.R., y Bienestock Ed). pp:677-689..Academic Press. Inc.Usa.

Phillips-Quagliata, J.M. 1994. Lymphocyte homing to mucosal effector sites. In *Handbook of mucosal immunology*. (P.L.Ogra, W, Strober, Mestecky, M.Lamm McGhee, J.R., y Bienestock Ed). pp:225-239..Academic Press. Inc.Usa.

Robbins, J.B., Schneerson, R., Szu, S.C., Fattom, a., Yang, Y., Lagergard, T., Chu, C., and Sorensen, U. S. 1989. Prevention of invasive bacterial diseases by immunization with polysaccharide- protein conjugates. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 146:169.

Shalaby, W.S.W. 1995. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: Barriers and novel strategies. *Clin. Immunol. and Immunopathology*. 74:(2)127-134

Sminia, T., y Plesch, E.C. 1982. An immunohistochemical study of cells with surface and cytoplasmic immunoglobulins in situ in Peyer's patches and lamina propria of rat small intestine. *Virchows. Arch. (Cell Pathol.)* 40:181-189.

Sminia, T., Delemarre, F. y Janse, E.M. 1983. Histological observations on the intestinal immune response towards horseradish peroxidase in rats. *Immunology* 50:53-56.

Solbreux, P.M., Dive, C., Vaerman, J.P. 1990. Anti-cholera toxin IgA-, IgG- and IgM- secreting cells in various rat lymphoid tissues after repeated intestinal or parenteral immunizations. *Immunol. Invest.* 19(5-6):435-451

Spangler, B.D. 1992. Structure and function of cholera toxin and related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Microbiological reviews* .56 (4):622-647.

Stefanini et al. 1967. Buffer formaldehyde with picrate. 29-30. In *Histological and Histochemical methods*. Ed. by Kiernan, J.A. Pergamon press. New York. (1990).

Strober, W. y Brown, W.R. 1988. The mucosal immune system. In "Immunological diseases" (M. Samster, ed.) pp. 79-139. Little Brown and Co; Boston.

Taylor y Burns.1974.Localisation of immunoglobulins in paraffin sections of formaldehyde fixed tissues.In Techniques in clinical immunology.Ed.by Thompson R.A.Blackwell scientific publication Oxford. 1981.

Underdown, B.J. and Mestecky, J.1994.Mucosal immunoglobulins. In Handbook of mucosal immunology.(P.L.Ogra,W,Strober,Mestecky,M.Lamm McGhee,J.R., y Bienestock Ed),pp:79-97.Academic Press. Inc.Usa.

Van der H.P.J.,Stok,W.,Bianchi,T.J.1987.Contribution of immunoglobulin secreting cells in the murine small intestine to the " background"immunoglobulin production.*Immunology* .62:551-555.

Walsh,J.A.1986.Problems in recognition and diagnosis of amebiasis stimation of the global magnitude of morbidity and mortality.*Rev.Infect.Dis* 8:228-238.

Weir et al. 1974. Inactivation peroxidase. In.Techniques in clinical Immunology. Ed. by Thompson,R.A. Blackwell Scientific Publication. Oxford.1981.

Weisz-Carrington,P. Roux,M.E.,McWilliams,M.,Phillips-Quagliata ,J.M., and Lamm,M.E. 1979. Organ and isotype distribution of plasma cells producing specific antibody after oral immunization : evidence for a generalized secretory immune system.*The Journal of immunology* 123(4):1705-1708.

Xu-Amano, J., Kiyono, H. Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pilla, S. And McGhee, J.R. 1993. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J.Exp. med.* 178: 1309-1320.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA