

## Tesis de Posgrado

# Alteraciones en el sistema inmune asociado al intestino en un modelo de desnutrición durante la lactancia

Fló Diaz, Juan

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Fló Diaz, Juan. (1993). Alteraciones en el sistema inmune asociado al intestino en un modelo de desnutrición durante la lactancia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2561\\_FloDiaz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2561_FloDiaz.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Fló Diaz, Juan. "Alteraciones en el sistema inmune asociado al intestino en un modelo de desnutrición durante la lactancia". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2561\\_FloDiaz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2561_FloDiaz.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas  
y Naturales

Alteraciones en el Sistema  
Inmune Asociado Al Intestino  
en un Modelo de Desnutrición  
Durante la Lactancia

Autor: Juan Fló  
Director: Dr. Ernesto Massouh  
Codirectora: Dra. Estela Roux

Lugar de trabajo:  
Laboratorio de Inmunoquímica  
Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis presentada para optar al título de:  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Buenos Aires 1993

150  
1  
2

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento:

Al Dr. E. Massouh por la confianza que me depositó y la libertad con que pudimos planear y discutir todos los aspectos de esta tesis.

A la Dra. María Estela Roux porque esta tesis fue posible gracias a su llegada al laboratorio de Inmunología y su activa participación en el desarrollo de una nueva línea de trabajo.

A Cati, Hebe, Ruben y Guillermo por la excelente relación que mantenemos desde hace muchos años lo que nos permitió enfrentar distintos momentos buscando permanentemente lo mejor para todos.

A Nilda, Felisa, Carmen y Ortega porque a pesar de ser ofendidos a diario con sueldos vergonzosos, su trabajo hizo posible el mío.

A todos aquellos que trabajando diariamente y también peleando por sus derechos ayudan a mantener viva a esta Facultad.

A Soledad,  
a Ana y a Pedro

OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	
SISTEMA INMUNE DE TODAS LAS MUCOSAS	2
SITIO INDUCTIVO DEL SISTEMA INMUNE DE LAS MUCOSAS	
1. Placas de Peyer, estructura y función	7
2. Las placas de Peyer como lugar de activación de las células B.	11
2a. Células T y linfoquinas que intervienen en el switch (conmutación) a IgA	11
2b. Factores de diferenciación de las células IgA+	15
2c. Células T en las placas de Peyer	17
3. Ganglio Mesentérico	18
SITIOS EFECTORES DE RESPUESTA INMUNE EN LAS MUCOSAS	
1. Lamina propria	20
2. Linfocitos intraepiteliales	22
PRODUCCION Y TRANSPORTE DE IGA	23
MECANISMOS DE PROTECCION MEDIADOS POR IgA-S	26
ESTIMULACION DEL SISTEMA INMUNE DE LAS MUCOSAS	27
1. La toxina colérica como inmunógeno	30
2. La toxina colérica como adyuvante	32
INMUNIDAD Y NUTRICION	
1. Efectos de la desnutrición sobre el sistema inmune	35
2. Efectos de la desnutrición sobre el sistema inmune de las mucosas.	38
MATERIALES Y METODOS	
1. Animales y dietas	40
2. Preparación de las suspensiones celulares	41
3. Caracterización de las poblaciones celulares B y T por inmunofluorescencia indirecta.	42

4.	Caracterización de las células pre-B por doble inmunofluorescencia	43
5.	Poblaciones celulares caracterizadas y anticuerpos utilizados	44
6.	Inmunizaciones	46
7.	Recolección de fluidos intestinales	48
8.	ELISA para la determinación de IgA	48
9.	ELISA para cuantificar anticuerpos anti TC	50
10.	Test de neutralización en loop intestinal	53
11.	Cultivo de linfocitos de ganglio mesentérico	54
12.	Análisis estadístico de los datos	55

#### RESULTADOS

##### ALTERACIONES EN EL PESO CORPORAL Y EN DISTINTOS ORGANOS LINFOIDES DEBIDO A LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA

1.	Evolución del peso de los animales controles y desnutridos durante la lactancia desde el destete hasta los 120 días	57
2.	Evolución del peso de las placas de Peyer, del ganglio mesentérico y del timo de ratas desnutridas durante la lactancia y controles de la misma edad	57
3.	Evolución del número de células recuperadas de los tejidos linfoides asociados al intestino de ratas desnutridas durante la lactancia y controles de la misma edad	58

##### ALTERACIONES DE LAS CELULAS T DEBIDAS A LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA

1.	Porcentaje de células T totales (CD5+) y T CD4+ en las placas de Peyer de ratas desnutridas durante la lactancia de 21 y 28 días y controles de la misma edad	62
2.	Porcentaje de células T CD5+ y CD4+ en el ganglio mesentérico de ratas desnutridas de 21 días y sus controles de igual edad	63
3.	Porcentaje de células Thy1.1+ (OX7+) en el ganglio mesentérico de animales desnutridos	

durante la lactancia de 21 y 28 días y controles de la misma edad	63
4. Porcentaje de células T totales (CD5+), T CD4+ y T CD8+ en el ganglio mesentérico de ratas desnutridas durante la lactancia de 28 días y controles de la misma edad	64
5. Porcentaje de células T totales (CD5+), T CD4+ y T CD8+ en las placas de Peyer de ratas desnutridas durante la lactancia de 50 días y controles de igual edad	65
6. Porcentaje de células T totales (CD5+), T CD4+ y T CD8+ en el ganglio mesentérico de ratas desnutridas durante la lactancia de 50 días y controles de igual edad	71
7. Porcentaje de células T totales (CD5+) y T CD4+ en las placas de Peyer de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia de y controles de igual edad	71
8. Porcentaje de células T totales (CD5+) y T CD4+ en el ganglio mesentérico de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia de y controles de igual edad.	72
9. Resumen de las alteraciones producidas en las células T de las placas de Peyer y del ganglio mesentérico por la desnutrición durante la lactancia	76
<b>ALTERACIONES DE LAS CELULAS B EN LAS PP Y EN EL GM DEBIDAS A LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA</b>	
1. Porcentaje de células pre-B en el ganglio mesentérico de ratas de 21 y 28 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad	77
2. Porcentaje de células que expresan IgM ó IgA en las placas de Peyer y en el ganglio mesentérico de ratas de 28 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad	78
3. Porcentaje de células que expresan IgM ó IgA en las placas de Peyer de ratas de 50 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad	79
4. Porcentaje de células que expresan IgM ó IgA en el ganglio mesentérico de ratas de	

50 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad	84
5. Porcentajes de células que expresan IgM ó IgA en las placas de Peyer y en el ganglio mesentérico de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.	84
6. Resumen de las alteraciones en las células B de las PP y del GM provocadas por la desnutrición durante la lactancia.	85
ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE IgA EN EL FLUIDO INTESTINAL Y EN EL SUERO DEBIDAS A LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA	
1. Niveles de IgA en el fluido intestinal de ratas controles y desnutridas durante la lactancia	88
2. Concentración de la IgA en el suero de ratas de 21 y 28 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.	88
EFECTOS DE LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA SOBRE LA CAPACIDAD DE RESPONDER A LA TOXINA COLERICA ADMINISTRADA ORALMENTE	
1. Respuesta de anticuerpos séricos hacia la toxina colérica en animales de 50 días desnutridos durante la lactancia y sus controles de igual edad.	91
2. Respuesta de anticuerpos de clase IgA en el fluido intestinal de animales de 50 días desnutridos durante la lactancia y sus controles. Neutralización en el test del loop intestinal.	92
3. Análisis del efecto de la toxina colérica sobre los niveles de IgA en el fluido intestinal de ratas normales y desnutridas	93
4. Respuesta de anticuerpos séricos específicos hacia la toxina colérica en ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad	96
5. Anticuerpos anti TC en los sobrenadante del cultivo de células del ganglio mesentérico de ratas de 50 y 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles	98

6.	Respuesta de anticuerpos anti TC en ratas desnutridas durante la lactancia y sus controles inmunizados a partir del día 50 de edad	99
7.	Resumen de las consecuencias que la desnutrición durante la lactancia tiene sobre la respuesta específica hacia la toxina colérica.	103
ESTUDIOS DE LA INFLUENCIA DEL AMAMANTAMIENTO EN EL SISTEMA INMUNE DE LAS CRIAS		
1.	Transferencia de células con actividad anti toxina colérica a través de la leche.	104
2.	Estudio de la cinética de anticuerpos IgG anti TC en ratas con una desnutrición severa durante la lactancia y sus controles.	106
	DISCUSION	108
	CONCLUSIONES	136
	BIBLIOGRAFIA	143

## INTRODUCCION

## OBJETIVOS

En este trabajo se pretende determinar el efecto de una desnutrición temprana (durante la lactancia) en ratas Wistar, en la principal zona inductora del sistema inmune de mucosas (placas de Peyer y ganglio mesentérico), y la posibilidad de reversión de sus consecuencias luego de distintos tiempos de renutrición con dieta stock

Para cumplir con este objetivo se hizo un estudio del efecto de esta desnutrición sobre las distintas poblaciones y subpoblaciones de células T y B de las placas de Peyer y del ganglio mesentérico, en el momento de máxima desnutrición y luego de distintos períodos de renutrición con dieta stock.

También se analizaron los niveles de IgA séricos e intestinales.

Para evaluar las consecuencias funcionales se estudió la respuesta de anticuerpos que estos animales pueden desarrollar hacia la toxina colérica administrada oralmente tanto a nivel sistémico como a nivel de intestino, cuando la toxina es administrada a distintos tiempos de comenzada la renutrición.

Por último, siendo que esta desnutrición comienza desde el nacimiento se realizó una primera evaluación la influencia de la leche materna sobre el sistema inmune de los animales controles y desnutridos.

## **SISTEMA INMUNE DE TODAS LAS MUCOSAS**

Las mucosas representan la principal vía de entrada de los patógenos al organismo. Estos tejidos se extienden desde la cavidad oral y los orificios nasales, por el tracto respiratorio superior, el gastrointestinal y el genitourinario los cuales poseen por lo menos una superficie dos veces mayores que la de la piel. Este simple hecho determina que las mucosas y en particular el sistema inmune a ellas asociado tenga que ser una barrera fundamental para la entrada de patógenos y de sustancia extrañas al organismo. Uno de las principales elementos que participan en esta defensa son los anticuerpos IgA-secretorios, los cuales se encuentran en gran cantidad en la superficie de las mucosas.

A través de experiencias con trasferencias de células de placas de Peyer y de los tejidos linfoides asociados a los

bronquios se vió que el sistema inmune de las mucosas es un sistema integrado que vincula al conjunto de las mucosas del organismo (intestinal, respiratoria, genital, glándulas mamarias, etc.) (Rudzik et al., 1975; McDermott et al., 1979; Bienenstock and Befus, 1980; Roux et al., 1977; Weisz-Carrington et al., 1979) (figura 1) y que esta regulado por mecanismos claramente diferenciados de los involucrados en la respuesta de anticuerpos sistémica (Maestecky and McGhee, 1987). En 1971 Craig y Cebra (Craig and Cebra, 1971) trabajando con conejos encuentran que al transferir células de placas de Peyer a receptores irradiados se produce una considerable repoblación del intestino con células capaces de proliferar y diferenciarse en productoras de IgA.

Previo a esto se habían hecho experiencias con el fin de estudiar el rol inmunológico de la placas de Peyer (Cooper, 1967) en las que se inducía la aparición de células formadoras de placas específicas de clase IgM en las PP y el GLM al inocular ratas en la vena de las PP con un antígeno. En 1976 se demostró la importancia de las placas de Peyer en la inducción de la respuesta de anticuerpos específicos de clase IgA en el lumen del intestino (Cebra, 1976). Por otro lado se estructuró un modelo de circulación de las células B desde las placas de Peyer hacia la lamina propria del intestino. Con técnicas de transferencia y de fluorescencia se vio que los linfocitos mas grandes en las placas de Peyer

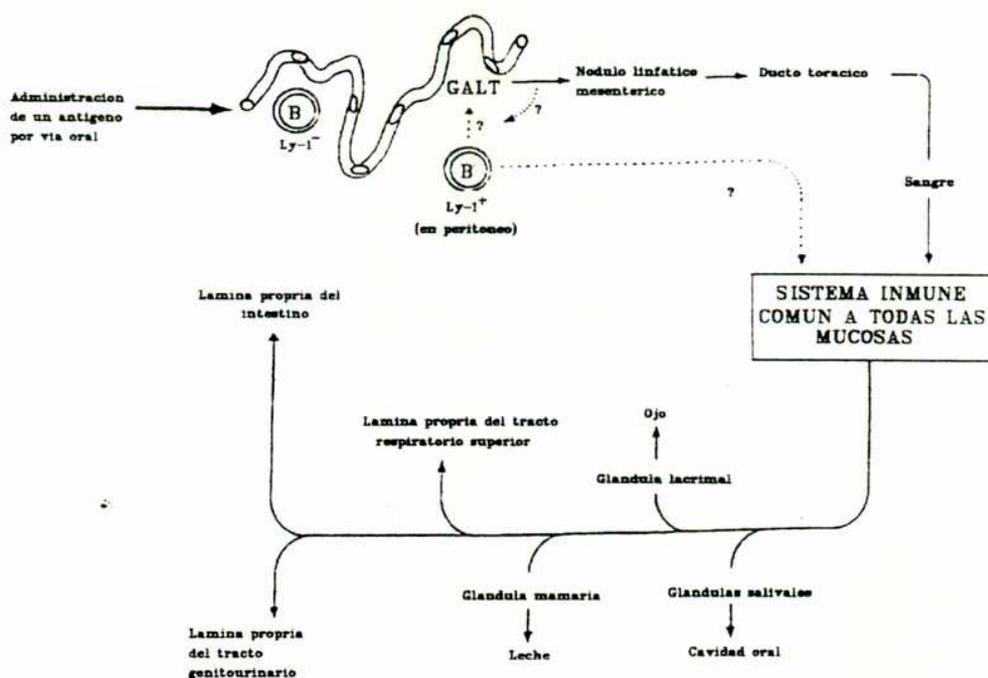
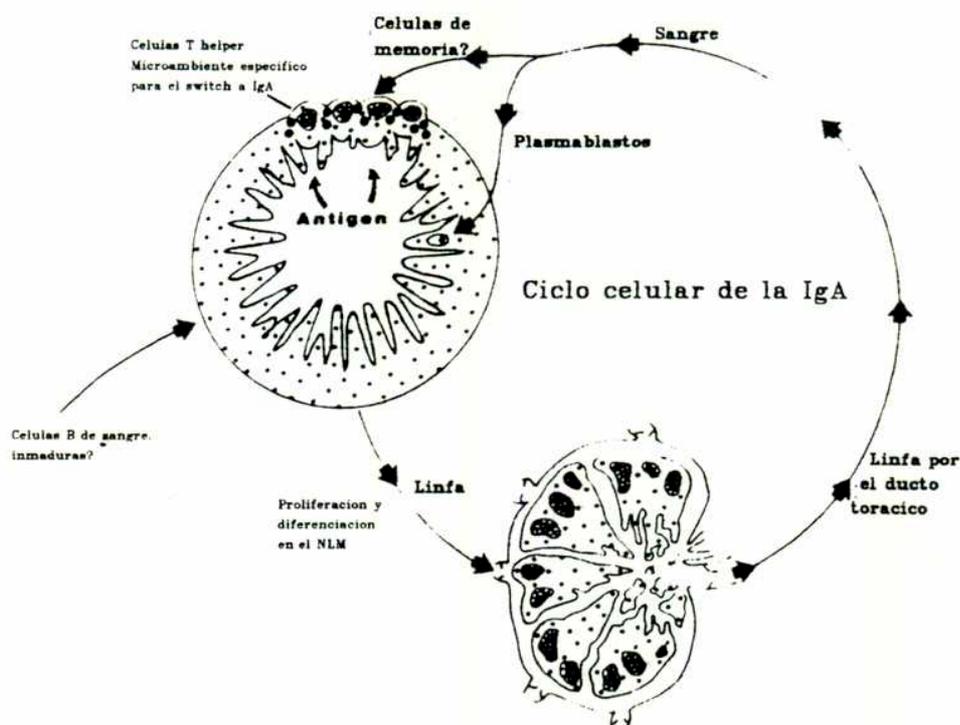


Figura 1: Inducción de la respuesta en el sistema inmune común a todas las mucosas (Mcghee et al., 1992)

y en el ducto torácico eran los que tenían IgA en superficie y a su vez los que repoblaban la lamina propia (Williams and Gowans, 1975; Parrot and Ferguson, 1974). Las experiencias de Cebra habían demostrado que las células provenientes de placas de Peyer repueblan luego de siete días de ser transferidas la lamina propia del intestino. Posteriormente se vió que previo a la llegada al intestino pasan por el ganglio mesentérico donde se dividen y diferencian en plasmablastos, luego migran vía el ducto torácico y sangre a la lamina propia del intestino donde se produce la diferenciación final a células plasmáticas productoras de IgA, llamandose a este circuito ciclo celular de la IgA

(McWilliams et al., 1975; 1977) (figura 2).



**Figura 2:** Ciclo celular de la IgA. Las primeras células que llegan a las PP no se sabe si son células inmaduras de médula ósea o linfocitos del pool circulante que se seleccionan de acuerdo a la presencia de moléculas de adhesión.

La migración de las células B es fundamentalmente independiente de la estimulación antigénica como se ha visto en experimentos con neonatos y con animales "libres de gérmenes" (Halstead, 1972); Parrott, 1974). Sin embargo la presencia del antígeno ayuda a la localización y proliferación de las células luego de la extravasación de las vénulas. (Husband, 1978; Pierce, 1982). Las células T también están en permanente circulación en el sistema inmune de

mucosas existiendo una serie de factores que determinan la localización última de las mismas. Entre estos está el reconocimiento antigénico, el cual es un prerequisite fundamental en la iniciación de las respuestas efectoras, y luego determina la persistencia de la localización y proliferación. Por otro lado juegan un rol fundamental las especificidades del endotelio alto de las vénulas las cuales aseguran que las células T efectoras migren a las regiones donde es más probable que encuentren al antígeno para las cuales son específicas (Scicchitano, 1989; Husband, 1983; 1985; 1989).

En humanos si bien por razones obvias no se puede obtener evidencia directa de un sistema común a todas las mucosas hay indicios firmes que permiten suponerlo. En secreciones externas de diversas glándulas se encuentran anticuerpos IgA-S específicos para antígeno de la dieta o microorganismos del tracto intestinal. Además la ingestión de microorganismos produce anticuerpos en distintas secreciones pero no en el suero. Se pueden detectar células productoras de anticuerpos contra esos antígenos en la sangre 7-12 días luego de la inmunización oral lo cual es precedente de la aparición de anticuerpos IgA-S específicos en saliva y en lágrimas (McGhee et al., 1992)

El sistema inmune de mucosas puede ser dividido en dos sitios, donde el antígeno es tomado y se induce respuesta

(sitio inductivo) y las grandes areas donde se encuentran las células plasmáticas productoras de IgA y se produce anticuerpo IgA-S dando como resultado una protección inmune local (sitio efector). Los antígenos presentes en el medio ambiente los cuales ingresan principalmente por inhalación o ingestión son tomados en el tracto respiratorio superior y en el tracto gastrointestinal por tejidos linforeticulares especializados (tejidos linfoides asociados a los bronquios, BALT y asociados al intestino, GALT) (Craig and Cebra, 1971; Rudzik et al., 1975)

## **SITIO INDUCTIVO DEL SISTEMA INMUNE DE LAS MUCOSAS**

### **1. Placas de Peyer, estructura y función**

Generalmente las zonas inductivas son tejido linfoide organizado, variando el número y la ubicación entre las especies. La mayoría de los estudios se ha hecho sobre el GALT (placas de Peyer, ganglio mesentérico y apéndice). Las placas de Peyer son estructuras linfoides a lo largo del intestino (principalmente intestino delgado) envueltas en un epitelio único rico en células especializadas en la captación del Ag, denominadas células M (figura 3).

En cada placa de Peyer se encuentra un número importante de folículos, con una zona oscura periférica y un centro germinal claro. Los folículos están separados entre si por un

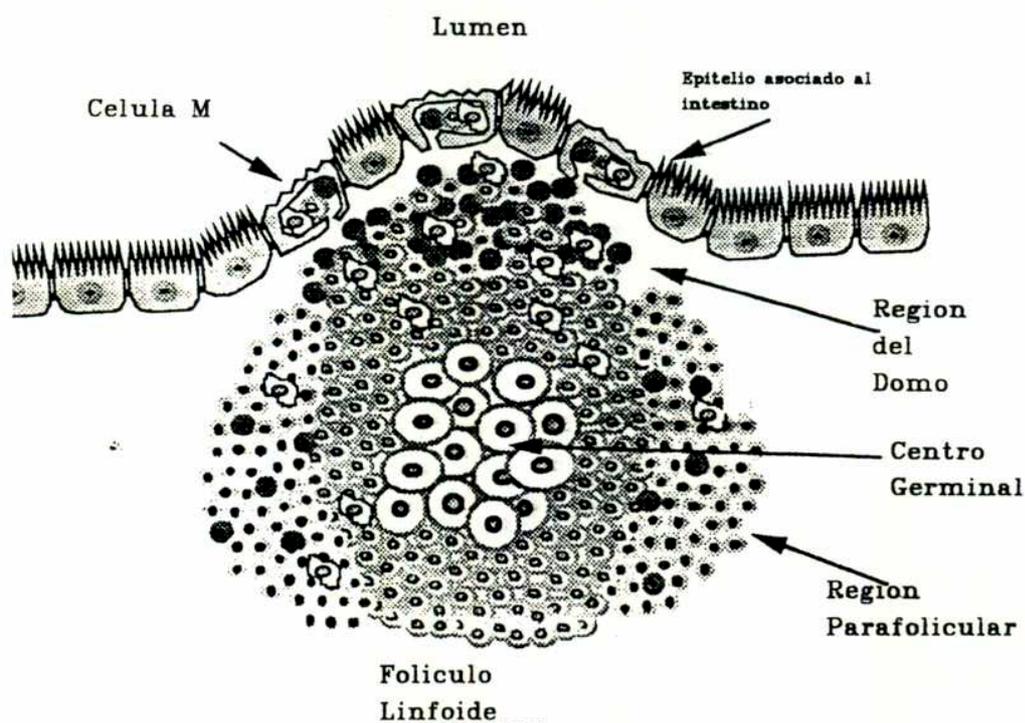


Figura 3 : Esquema de un folículo linfoide en una placa de Peyer.

área interfolicular y del epitelio de la mucosa por la corona rica en linfocitos . Las vénulas altas del endotelio (lugar donde ocurre la extravasación de los linfocitos circulantes) están situadas en las áreas interfoliculares. Las células M se encuentran presentes en una amplia gama de animales y en el hombre siendo alrededor del 10 % del epitelio asociado al foliculo en humanos y roedores (Pappo et al., 1988). Endocitan y transportan macromoléculas y organismos desde el lumen hacia el interior del tejido linfoide. La toma de partículas no parece ser selectiva aunque en la membrana

apical presentan glicoconjugados que pueden servir como sitios de unión de lectinas de la superficie de los microorganismos (Neutra et al. 1987; Owen and Ermak, 1983; Bye et al., 1984). De esta manera parece que antígenos que se adhieren eficientemente a la membrana apical de las células M despiertan una respuesta inmune eficiente mientras que los que tienen escasa capacidad de adherirse no generan respuesta (De Aizpurua and Rusell-Jones, 1988). Queda por verse si la mayor o menor eficiencia en tomar y transportar antígenos por parte de las células M juega algún rol en la tolerancia a antígenos de la dieta. El antígeno tomado por las células M es entregado al interior del órgano linfoide, no estando aún claro si las células M procesan y presentan como antígenos exógenos sustancias que hallan sido endocitadas. (Wolfand and Bye, 1984; Owen, 1983; Sneller and Strober, 1986)

Las PP fueron consideradas en un principio inmunologicamente incompetentes ya que no se pudieron identificar células plasmáticas productoras de anticuerpos luego de inmunizaciones orales o parenterales (Bienenstock and Dolezel, 1971; Henry et al., 1970). La explicación que se dio para este funcionamiento inadecuado fue la deficiencia en células presentadoras (Kagnoff and Campbell, 1974; Challacombe, 1981). Posteriormente se demostró en ratón la presencia de células accesorias funcionales cuando se las

aislaba por un método enzimático de tal manera que cultivos de células disociadas de placas de Peyer pueden ser estimuladas in vitro con un antígeno o mitógeno a producir una respuesta primaria IgM y secundaria IgA e IgG (Frangakis et al., 1982; Kiyono et al., 1982). Hoy sabemos que hay células dendríticas dentro de los centros germinales, células interdigitales en las zonas parafoliculares en estrecho contacto con los linfocitos, macrófagos ubicuamente ubicados pero con mayor concentración en la corona y células B en la corona y en los folículos (Ermak and Owen, 1986; Van Rens, 1988; Mayrhofer, 1983; Spalding et al., 1983). La capacidad de las células presentadoras de las PP de producir una activación de células T es comparable en magnitud y cinética a las provenientes de bazo o ganglio linfático mesentérico (GLM) (Williams, 1992)

A diferencia de otros órganos linfoides alrededor del 60 % de las células son linfocitos B y entre el 25 y el 30 % son LT. En los centros germinales de las PP ocurre una división significativa de las células B y es allí donde se encuentra una alto porcentaje de células con IgA de superficie (Butcher et al., 1982; Lebman, 1987) sin embargo no hay un número significativo de células plasmáticas (en humanos sin embargo se han observado plasmablastos IgA) (Spencer et al., 1986). En la periferia de los folículos y en la corona las células expresan IgM e IgD (Butcher et al., 1982). En las zonas

adyacentes a los folículos se encuentran las áreas T con la presencia de células CD4+, CD8- las cuales pudieron ser clonadas en ratón (Kawanishi et al., 1983a; 1983b); y células CD4-, CD8+ las cuales pueden ser citotóxicas (London et al., 1987). Más del 60% de las células presentan un fenotipo CD3+, CD5+ CD4+ CD8- y tienen función de colaboradoras. Así todas las células inmunocompetentes necesarias están presentes en el sitio inductivo de la IgA. Estas células van a estar encargadas de la regulación en la inducción de células efectoras específicas para diversos antígenos.

## **2. Las placas de Peyer como lugar de activación de células B**

### **2a. Células T y linfoquinas que intervienen en el switch a IgA**

Las placas de Peyer son la principal fuente de precursores de células productoras de IgA (Craig and Cebra, 1971; Cebra et al., 1976). Los antígenos intestinales estimulan la diferenciación de células B vírgenes a precursores de célula productoras de IgA y pueden además colaborar en la expansión de esos clones dentro de las placas de Peyer. Este esquema esta apoyado por una serie de experimentos realizados en ratones neonatos y en ratones libres de gérmenes (Cebra et al., 1980; Cebra et al., 1983). En PP y GLM de animales libres de gérmenes son muy raros de encontrar precursores de

células IgA con especificidad contra antígenos bacterianos como fosforilcolina o inulina. Sin embargo cuando a estos animales se los convencionaliza aumenta rápidamente la cantidad de estas células. Lo mismo sucede con animales neonatos en el desarrollo a adultos. Los ratones atímicos presentan en las PP una frecuencia semejante de clones activados hacia el antígeno como la fosforilcolina o la inulina pero principalmente productores de IgM. Sin embargo la administración oral de la TC a ratones atímicos y eutímicos da como resultado una frecuencia similar de células sensibilizadas hacia el antígeno en las PP, siendo en los primeros menos frecuentes pero evidentes las determinadas a producir IgA. Esto estaría indicando que el antígeno podría producir el switch a IgA en ausencia de células T y que estas podrían potenciar su acción (Cebra et al., 1983). Que el antígeno utilizado sea la TC la cual se sabe que actúa sobre la fisiología de las células T y B podría relativizar estos resultados.

Los factores que intervienen en la determinación del switch hacia células que expresan IgA están aún en estudio. En 1983 se clonaron células T murinas provenientes de placas de Peyer, las cuales producían un aumento de células sIgA+ en cocultivos con linfocitos B sIgM+ estimulados con LPS también provenientes de PP, al contrario de lo que ocurría con células T provenientes de bazo (Kawanishi et al., 1983a,

1983b). A estas células se las llamó T switch. También se vio que agregados (clústeres) de células T y células dendríticas provenientes de placas de Peyer producen un importante aumento en la producción de IgA cuando se cocultivan con células B provenientes de PP o de bazo, contrariamente a lo que ocurre con clústeres provenientes de bazo (Spalding and Griffin, 1986). Otros trabajos han demostrado que un subgrupo de células CD4+ de las PP obtenidas de ratones primados con el antígeno puede inducir preferencialmente respuestas específicas a GRC de clase IgA tanto en cultivos de LB de bazo como de PP (Kiyono et al., 1982; 1983).

Actualmente se piensa que el TGF- $\beta$  podría ser la citoquina responsable del Switch. El TGF- $\beta$  es una citoquina con efectos regulatorios sobre un amplio espectro de células del sistema inmune. Inhibe la generación de células T citotóxicas (Jin et al., 1989), la función de células NK y la proliferación de células B y T (Kherl et al., 1986a; Lee et al., 1987) y la producción de anticuerpos (Kherl et al., 1986b) aún la de clase IgA (Chen and Li., 1990; Sonoda et al., 1992; Eckmann et al., 1992). TGF- $\beta$  actúa sobre células IgA- de bazo o de PP estimuladas con LPS o con otros activadores policlonales en los 2 primeros días de cultivo, produciendo la aparición de células IgA+.(var Vlasseler et al., 1992; Lebman et al., 1990; Sonoda et al., 1992); Ehrhardt et al., 1992). Estudios a nivel de ARNm revelan la

aparición de mensajeros  $Ca$  en los dos primeros días de cultivo de células B IgA- activadas con LPS y TGF- $\beta$  (Shockett and Stavnezer, 1991; Lebman et al., 1990). Además se vio que el TGF- $\beta$  produce aumento en la expresión de componente secretor sobre las células del epitelio intestinal de ratas (McGee et al., 1991) lo que facilitaría el transporte de la IgA, e interviene en la regulación de la adhesión de los linfocitos del ducto torácico, a las células del endotelio alto de las vénulas de las PP, inhibiendo la adhesión (Chin et al., 1992) y por consiguiente se podría facilitar la migración a otras zonas . Por otro lado se vio que el TGF- $\beta$  tiene efectos opuestos sobre la producción de IgA en cultivos de células totales de acuerdo al contexto de acción (Chen and Li., 1990). A pesar de las diferentes resultados que llevarían a pensar que esta citoquina es el factor principal en el switch a IgA, persisten dudas de si el TGF- $\beta$  no actuaría sobre células ya determinadas a expresar IgA. Si bien el aumento en la expresión de IgA es constante e importante en valores relativos, en valores absolutos el número es pequeño y no alcanzaría a justificar la gran cantidad de células IgA+ que se encuentran en las mucosas (Ehrhart et al., 1992). Por otro lado la adición de TgF- $\beta$  al cultivo de una línea de células B IgM+ (CH12.LX) la cual está determinada a diferenciarse en células IgA+ en baja proporción, induce a que el 90% pasen a ser células IgA (Kunimoto, 1991). Esto llevaría a pensar que el TGF- $\beta$  aumenta

el switch a IgA solamente después que las células han recibido una primera señal. In vitro en las condiciones de cultivo (estimulación con LPS) probablemente una pequeña proporción de células estén en condiciones de responder a la acción del TGF- $\beta$ . Estudios llevados a cabo en ratones libres de gérmenes desafiados oralmente con un reovirus revelan la aparición de células IgA<sup>+</sup> en los centros germinales de las placas de Peyer a diferencia de lo que ocurre en los ganglios periféricos cuando la estimulación es por vía parenteral en donde además de células IgM aparecen células con IgG en la superficie (Weinstein and Cebra, 1991). Sin embargo la predisposición a la producción de IgA no ocurrió en cultivos de fragmentos de PP cuando estos provenían de tres días post inoculación (momento en que se detectan transcritos  $C\alpha$  de la línea germinal, pero no IgA<sup>+</sup> en la superficie de las células). Cultivos desarrollados en estas condiciones sólo desarrollan anticuerpos específicos al reovirus de tipo IgM. Esto estaría indicando que la aparición preferencial de células IgA<sup>+</sup> sería principalmente por factores del microambiente además de la influencia del antígeno (Gearhart and Cebra, 1979), los cuales son alterados por el cultivo in vitro del tejido.

## **2b. Factores de diferenciación de células IgA<sup>+</sup>**

El TGF- $\beta$  actúa sobre las células IgA<sup>-</sup> promoviendo el desarrollo de células IgA<sup>+</sup>, pero no estimula la

diferenciación final de estos linfocitos. La IL-5 sería la principal responsable del aumento en la síntesis de IgA por parte de las células B. Se ha visto en cultivos murinos de LB de bazo estimulados con LPS (Murray et al., 1987; Sonoda et al., 1992) y de PP sin (Beagley et al., 1988; Harriman et al., 1988) y con estimulación (Lebman and Coffman, 1988) un importante incremento en la síntesis de IgA luego de la adición de IL-5. También se vio que la rIL-5 murina estimula la síntesis de IgA por parte de cultivos de células de bazo de rata (McGhee et al., 1990). Esta citoquina actúa sobre células IgA<sup>+</sup> y no sobre células IgA<sup>-</sup> (los resultados contrarios probablemente se deban a contaminación de células IgA<sup>+</sup> (Lebman and Coffman, 1988). En principio hay coincidencia en que la IL-5 actuaría aumentando la síntesis de la IgA pero no a través de un aumento en la proliferación celular (Beagley et al., 1988) a pesar de algunos resultados opuestos a esto. (Harriman et al., 1988) pero obtenidos en cultivos estimulados con LPS. Otras interleuquinas que pueden colaborar en menor medida son la IL-4 la cual se ha descrito que actúa sinérgicamente con la IL-5 en cultivos murinos de LB de bazo estimulados con LPS (Murray et al., 1987; Coffman et al., 1987;) pero no en cultivos de PP sin activación policlonal adicional (Beagley et al., 1988); y la IL-6 la cual actúa sobre células IgA<sup>+</sup> produciendo un aumento de la síntesis de IgA superior al que provoca la IL-5, en cultivos de células murinas de PP (Beagley et al., 1989). La

IL-5 y la IL-6 pueden actuar también en forma sinérgica (Kunimoto et al., 1989). A diferencia de la IL-5, la IL-6 puede inducir la diferenciación final a células productoras de IgA también sobre pequeños linfocitos de placas de Peyer, con poca afinidad para la PNA (linfocitos de memoria?) (Beagley et al., 1991). Esto está de acuerdo con el hallazgo en un análisis hecho sobre células provenientes de apéndices humanos, en el que se vio que la expresión del receptor para IL-6 ocurre casi exclusivamente en linfocitos que expresan IgA (Fujihashi et al., 1992). También se vio que la rIL-6 murina actúa sobre cultivos de células de glándulas submaxilares de ratas produciendo un considerable aumento en la síntesis de IgA (Pockley and Montgomery, 1992)

### 2c. Células T en las placas de Peyer.

En ratón es aceptado que los LT CD4+, CD8- clonados pueden dividirse en dos grupos (Th1 y Th2) de acuerdo al patrón de citoquinas que produzcan (Mosmann and Coffman, 1987; 1989). En respuesta a la estimulación con antígenos extraños, aloantígenos o Con A las células Th1 producen IL-2 y IFN- $\gamma$  e intervienen en reacciones de hipersensibilidad retardada y las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y cooperan principalmente con las células B en la producción de anticuerpos (Mosmann and Coffman, 1987); (Mossmann et al., 1986). En placas de Peyer murinas se ha determinado la

proporción de ambos grupos de células helper por medio de la técnica de ELISPOT. Cuando se determinan los clones CD4+ que espontáneamente están produciendo IFN- $\gamma$  o IL-5 se observa que estos son escasos, en comparación con células provenientes de la lamina propia del intestino y que ambos subset están presentes en proporciones similares (mientras que en lamina propia la relación Th2 : Th1 es de 3:1). Cuando se estimulan las células con Con A aumenta el número de ambos subgrupos en forma similar (Taguchi et al., 1990a; 1990b).

Estos resultados están de acuerdo con lo que se conoce sobre la maduración de las células B. En la zona efectora (LP) es donde se espera encontrar mayor cantidad de células capaces de colaborar con los LB para permitir su diferenciación terminal en células productoras de IgA.

Finalmente cabe destacar la presencia de células CD8+ en el GALT (PP y GLM) las cuales pueden ser citotóxicas (London et al., 1987; Issekutz, 1984).

### **3. Ganglio Mesentérico**

Pegado a la pared del ileon se encuentra una cadena de ganglios a cuyo conjunto se la llama ganglio mesentérico y cuya estructura es similar a la de cualquier otro ganglio linfático. El GLM recibe linfocitos tanto de la sangre como

del drenaje de las placas de Peyer (figura 4). Este es el lugar en donde las células B provenientes de las PP que ya están determinadas para producir IgA comienzan su diferenciación y se transforman en plasmablastos (McWilliams et al., 1975; 1977). Esto determina que haya una mayor proporción de linfocitos B con IgA+ que en ganglios linfáticos periféricos (McWilliams et al., 1974) .

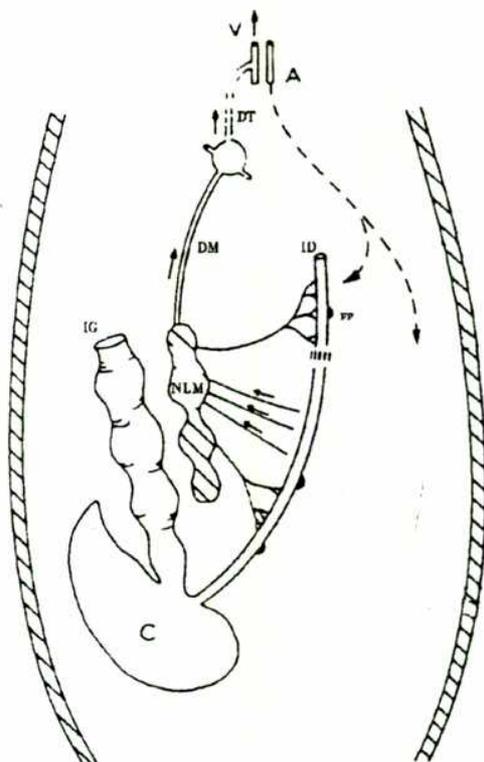


Figura 4: Esquema de la circulación entre las placas de Peyer, el ganglio mesentérico y la lamina propia del intestino.

En primates no humanos se ha descrito que las células T

del GLM expresan niveles altos de RNAm para IL-4 y IL-5 en comparación con células de sangre periférica, bazo o ganglios linfáticos periféricos . La expresión de RNAm para IL-2 e IFN- $\gamma$  por el contrario es inferior a la encontrada en otros órganos. (James et al., 1990)

En el ganglio mesentérico de ratas se encuentra alrededor de un 60 % de células T , de las cuales 2/3 son CD4+ CD8- y 1/3 CD8+ CD4- (Lyscom and Brueton, 1982)

## **SITIOS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE EN LAS MUCOSAS**

### **1. Lamina propria**

El tejido linfoide efector de la respuesta inmune está distribuido en forma difusa en la lamina propria del intestino y del tracto respiratorio superior así como en los tejidos intersticiales de algunas glándulas. Las células B provienen en gran parte de las zonas inductoras tales como las PP, luego de haber estado en contacto con el antígeno o por estimulación de la flora bacteriana natural.(McDermott and Bienenstock, 1979). Se ha descrito sin embargo que parte de las células B productoras de IgA que se encuentran en la LP podrían provenir de células B CD5+ de la cavidad peritoneal (Kroese et al., 1989). las cuales presentan altos niveles de receptor para IL-5 (Hitoshi et al., 1990; Waltzel, 1989). Hay resultados contradictorios sobre las consecuencias de la remoción quirúrgica de las PP o la canulación

prolongada del ducto torácico (Mayrhofer and Fisher, 1979). Algunos trabajos muestran una considerable disminución en el número de plasmablastos en la LP, (Heatley et al., 1981; Serizawa et al., 1990) mientras otros muestran que no hay una disminución significativa en la LP (Enders et al., 1988). Estos resultados no del todo compatibles han sido utilizados para apoyar la idea de que las células CD5+ del peritoneo pueden repoblar la lamina propia del intestino. Sin embargo no se han encontrado este tipo de células en las PP así como tampoco se ha encontrado células IgA+ en la cavidad peritoneal. Además estas células parecen generar células IgG+ en los ganglios linfáticos e IgA+ en el intestino (Kroese et al., 1989), con lo cual no tendrían un rol diferente del de las células B convencionales. (Weinstein and Cebra, 1991).

La lamina propia del intestino es el mayor sitio efector del sistema inmune de las mucosas. En roedores entre un 20 a 40 % de las células son LB la mayor parte de los cuales son productoras de IgA. En ratones el 25 % son LT la mayoría de los cuales expresan el marcador CD4 (Brandtzaeg, 1988; Ernst et al., 1985). Dentro de las células CD4+ dos tercios de ellas producen IL-5 (Th2) y un tercio IFN- $\gamma$  (Taguchi et al 1990b). Esto coincide con la idea que los LB llegan a la lamina propia determinados para producir IgA, pero la diferenciación final ocurre en la zona efectora. Alrededor de un tercio de las células T expresan el marcador CD8 y pueden exhibir funciones citotóxicas y posiblemente supresoras

(McGhee et al., 1991). Otra característica de las células T de LP es el alto porcentaje que expresan receptor para IL-2, lo cual es una señal de activación, contrariamente a lo que ocurre con las células de GLM, bazo o ganglios linfáticos periféricos las cuales poseen niveles prácticamente indetectables de IL-2R (Zertz et al., 1988).

Recientemente se ha visto en rata que la presencia de la flora bacteriana estimula la proliferación de las células T de la lamina propia de animales libre de gérmenes revirtiendo la disminución en el número de células que estas presentan (Woolverton et al., 1992).

En la figura 5 se puede ver una síntesis de los pasos desde la activación de las células B vírgenes en las zonas inductoras hasta la generación de células productoras de IgA en las zonas efectoras del sistema inmune de las mucosas.

## **2. Linfocitos intraepiteliales**

Entre las células epiteliales del intestino se encuentran gran cantidad de linfocitos, muchos de los cuales se ubican en la parte basal del epitelio cerca de la membrana basal. En todas las especies estudiadas los LIE son positivos para el marcador CD3 (Bucy et al., 1988; Cerf-Bensussan et al. 1983; De Gens et al., 1990) y mayoritariamente presentan el fenotipo CD8+. En ratones dentro de las células CD8+, el 60%

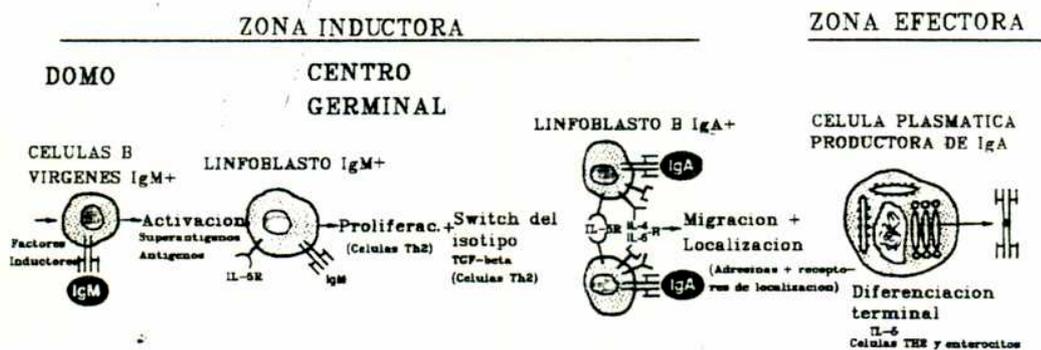


Figura 5: Esquema de la secuencia de pasos en la maduración de una célula B en la zona inductora y en la zona efectora del sistema inmune de mucosas.

presentan un homodimero  $\alpha$ - $\alpha$  (en lugar del heterodimero  $\alpha$ - $\beta$ ) (Guy Grand et al., 1991) los cuales podrían tener un origen extratímico. Otra particularidad es dentro de los LIE se encuentra un número similar que sintetiza IL-5 ó IFN- $\gamma$  dentro de las cuales se encuentran células CD8+ (Taguchi et al., 1990b).

En roedores hay evidencias que los LIE tienen funciones citotóxicas (Guy Grand et al., 1991; Kanwan et al., 1986). También se estima que estarían involucrados en la renovación del epitelio intestinal (Cerf-Bensussan et al., 1990).

#### PRODUCCIÓN Y TRANSPORTE DE IgA

Este isotipo constituye mas del 80% del total de anticuerpos producidos en la superficie de las mucosas.(Mestecky and McGhee, 1987) y el 60% del total de inmunoglobulinas que se sintetizan en el organismo. En el humano se sintetizan entre 3-5 grs de IgA diariamente principalmente IgA polimérica (pIgA) (Rusell et al., 1992). Estudios comparativos de las propiedades moleculares y especificidades para varios antígenos de IgA sérica y secretoria y de las células productoras de IgA en los tejidos de mucosas y la médula osea sugieren que los compartimientos circulatorios y de mucosas presentan un considerable grado de independecia (Mestecky and McGhee, 1987; Conley and Delacroix, 1987) (figura 6).

En humanos la IgA sérica proviene principalmente de la síntesis de células que se encuentran en médula osea y en bazo las cuales sintetizan principalmente IgA monomérica, en cambio la IgA en las secreciones proviene de la síntesis local de las distintas glándulas y tejidos las cuales sintetizan principalmente IgA polimérica (Crago et al., 1984). Sin embargo recientemente se vio por la técnica de ELISPOT que la síntesis de IgAp puede ocurrir en diferentes proporciones en los distintos tejidos, incluida la médula osea la cual puede tener hasta un 30% de células secretoras de IgAp Esto estaría indicando que el mismo clon de células puede producir una u otra de acuerdo a las circunstancias (Tarkowsky et al., 1991).

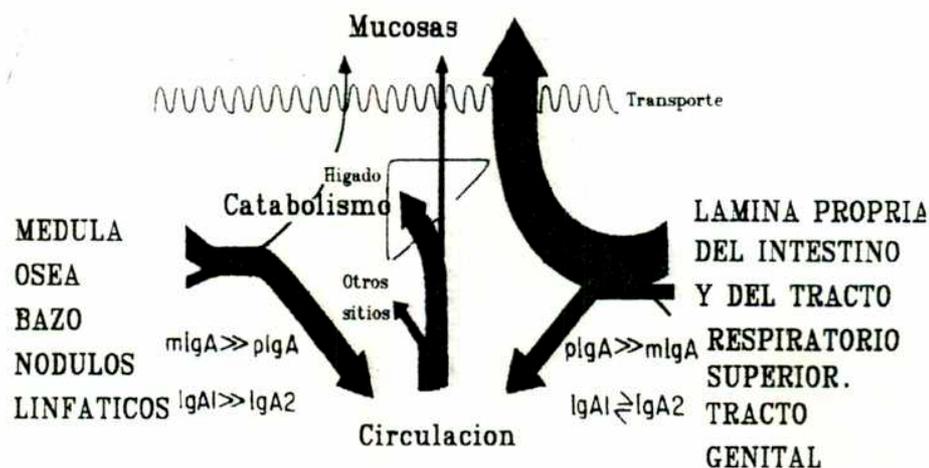


Figura 6: Esquema de la división existente entre el compartimiento de la IgA circulatoria y de la IgA de las mucosas (Russell et al, 1992).

En humanos esta aceptado que la contribución de la IgA circulante contribuye poco a la IgA de las secreciones. En roedores y conejos sin embargo gran parte de la IgA<sub>p</sub> es transportada desde la circulación a la bilis por el hígado (Orlans et al., 1978), contribuyendo luego a la IgA total en la parte superior del intestino delgado (Lemaitre Coelho et al., 1978; Vaerman et al., 1978; Orlans et al., 1983). Hay dos razones principales para explicar esta diferencia entre humanos y algunas especies animales. En roedores y conejo gran cantidad de la IgA<sub>p</sub> entra en circulación desde el ducto

torácico, el cual drena linfa proveniente del intestino, mientras que en humanos la IgA circulante es principalmente IgAm. A esto se suma que los hepatocitos de estas especies expresan componente secretor (Orlans et al., 1979), necesario para el transporte de IgA desde la circulación a la bilis, mientras que los hepatocitos humanos no expresan CS (Nagura et al., 1981; Delacroix and Vaerman, 1983; Brandtzaeg, 1985).

#### **MECANISMOS DE PROTECCIÓN MEDIADOS POR IgA-S.**

La IgA ejerce su función a través de una serie de mecanismos algunos específicos y otros no. La primera adaptación que tiene para poder funcionar en un medio rico en enzimas proteolíticas es su estructura y la unión al CS el cual la preserva del clivaje enzimático (Gilbert et al., 1983). Por otra parte su incapacidad de fijar complemento es de suma importancia para evitar daños en la superficie de las mucosas.

La IgA-S puede neutralizar eficientemente virus y aglutinar bacterias, así como neutralizar toxinas y enzimas.

La IgA polimérica tiene mayor eficiencia que la IgAm o que la IgG en neutralizar virus (Taylor and Dimmock, 1985). Su mayor eficiencia en primer lugar se debe a que tiene 4 sitios de unión al Ag (Taylor et al., 1987). Por otro lado la unión al virus ocurre en el lugar en donde se realiza el primer contacto entre el virion y el huesped.

La prevención de la adhesión de las bacterias a la pared intestinal es una de las formas de proteger contra la invasión de diversos patógenos. Esta inhibición puede producirse por una unión inespecífica al microorganismo a través de residuos manosas presentes en las cadenas pesadas que son reconocidas por lectinas que se encuentran en la pared de las bacterias. De esta manera esta interacción manosa-lectina ejerce una amplia función protectora independientemente de la especificidad de las moléculas de IgA (McGhee et al., 1992).

Para que se produzca IgA específica hacia un antígeno en las zonas efectoras del sistema inmune de mucosas es necesario que el antígeno sea administrado a través de alguna de las mucosas del organismo, por el otro lado la administración de un antígeno por vía de mucosas puede generar una respuesta de IgA circulante específica pero menor que si se administrara por vía parenteral (figura 7)

#### **ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DE LAS MUCOSAS.**

La respuesta inmune a antígenos en el intestino es compleja, ya que se puede producir tanto una verdadera inmunización con una respuesta efectora como también fenómenos de tolerancia (Mowat, 1987; Kay and Ferguson, 1989a; Kay and Ferguson 1989b; Challacombe and Tomasi, 1980; Tomasi, 1980). En que el resultado sea uno u otro intervienen una serie de factores por ejemplo la conformación molecular

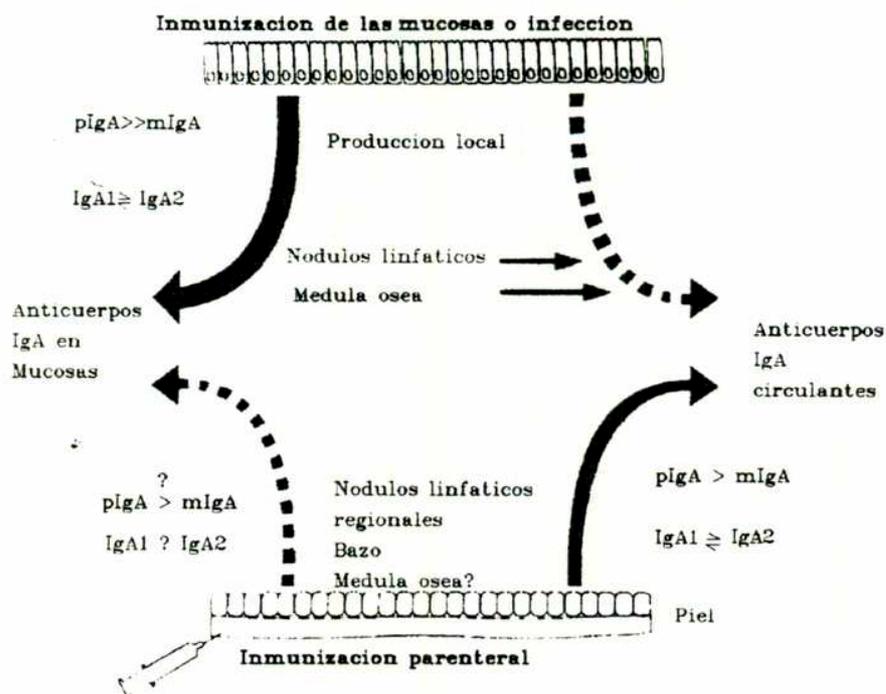


Figura 7: Esquema de la respuesta de anticuerpos IgA cuando se inmuniza por a través de las mucosas o por vía parenteral (Rusell et al., 1992).

del antígeno y su procesamiento (Vives et al., 1980; Bruce and Ferguson, 1986) la edad de los individuos (Hanson, 1981) y la constitución genética (Stokes et al., 1983).

Las células epiteliales del intestino (enterocitos) expresan moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y pueden actuar como células presentadoras de antígeno (Bland, 1987; Bland and Warren, 1986; Spencer et al., 1986; Mayrhofer et al., 1990) induciendo la proliferación de LT. También se ha descrito que los enterocitos pueden presentar el antígeno a las

células T generando una respuesta de proliferación de células supresoras (Bland and Warren, 1986), independientemente de la presencia de moléculas de clase II del CMH (Meyer et al., 1990).

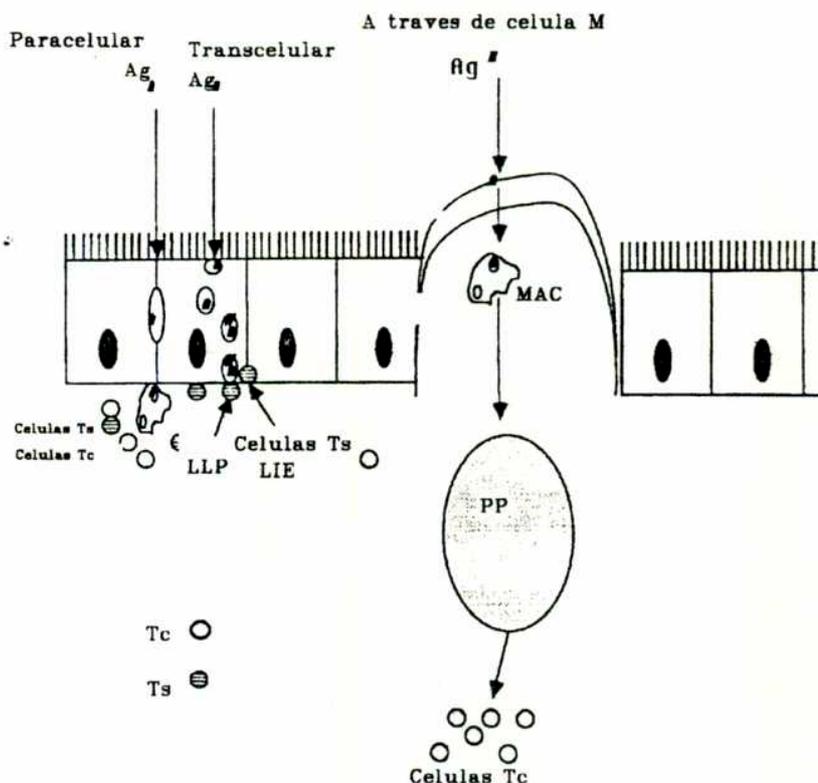


Figura 8: Posible influencia de la forma en que se toma el antígeno por el epitelio intestinal, en el desarrollo de una respuesta inmune (Mayer et al., 1990)

Se ha postulado que este mecanismo puede jugar un rol en el fenómeno de tolerancia determinando la presencia o ausencia de una respuesta sistémica a antígenos de las mucosas (figura 8). Esto coincide con la presencia de LT con actividad supresora en bazo (Challacombe, 1987) luego de la administración oral del antígeno.

### 1. La toxina colérica como inmunógeno

La TC es una molécula proteica con un peso molecular de 80.000 daltons. Su estructura consiste en una subunidad A (con un PM de 27000 daltons) rodeada por un anillo pentamérico de subunidades B (con un PM de 11600 daltons cada una). Las subunidades B se unen con una alta constante de afinidad al gangliósido GM1 ubicuamente presente en las células de los eucariotes. Esto permite la entrada del péptido A1 de la subunidad A el cual está involucrado en la ribosilación de una proteína reguladora (Gs) que estimula positivamente la actividad de la adenilatociclasa llevando esto a una activación irreversible de dicha enzima (Van Heyningen, 1983). Esto genera el incremento de los niveles de AMPc causando la secreción intestinal.

La TC a su vez es el antígeno intestinal no replicante más potente que se conoce (Pierce, 1978; 1980) induciendo la aparición en la LP de un gran número de plasmablastos productores de IgA específica con la consecuente respuesta de anticuerpos IgA secretorios en el tracto intestinal así como de anticuerpos de clase IgG a nivel sistémico cuando se administra oralmente en cantidad de microgramos (Pierce, 1984; Pierce and Gowans, 1975; Elson and Ealding, 1984).

Estos anticuerpos tienen capacidad de protección contra la acción de la TC a nivel de mucosas (Lycke and Holmgren 1987a; Lycke et al., 1987b; Pierce et al., 1980; 1983). La subunidad B también es un poderoso inmunógeno que se emplea junto a la célula completa del vibrio en la construcción de vacunas humanas (Jertborn et al., 1992; Holmgren et al., 1977). Sin embargo administrada sola produce anticuerpos con menor capacidad neutralizante que los generados por la holotoxina (Lycke et al., 1989) a pesar que esto puede ser revertido empleando bacterias como carrier de la TC-B (Van Damme, 1992).

Tanto la TC como la TC-B tienen la capacidad de generar respuestas prolongadas de memoria en la lamina propia del intestino (Lycke and Holmgren, 1986; 1987; Pierce, 1978; Pierce and Craig, 1982). La capacidad de responder a al TC esta en parte bajo control genético. Tanto la respuesta de IgA secretoria como la IgG sérica esta regulada por la subregión I-A del complejo mayor de histocompatibilidad (Elson and Ealding, 1985; 1987).

Por otra parte la TC es una de las pocas proteínas que no induce la tolerancia oral a nivel de producción de anticuerpos y a su vez es capaz de eliminar la tolerancia inducida por una proteina no relacionada (Elson and Ealding, 1984). Sin embargo la administración oral de TC suprime la hipersensibilidad retardada sistémica. (Kay and Ferguson 1989a; 1989b).

## 2. La TC como adyuvante

Tanto la TC como la TC-B cuando tienen propiedades potenciadoras de la respuesta inmune contra antígenos no relacionados que de por sí tienen escasa capacidad de generar anticuerpos a nivel del intestino. Debido a esta propiedad es que ha sido utilizado como carrier en un gran número de inmunizaciones experimentales (Liang et al., 1988; Chen and Strober, 1990); Que et al., 1988). Para que este efecto se manifieste debe aplicarse conjuntamente con el antígeno por vía oral. (Lycke and Homgren, 1986). La capacidad adyuvante de la TC es además dosis dependiente. (Lycke and Holmgren, 1986). Así como la toxina colérica es capaz de generar una respuesta de memoria, también es capaz de ayudar a que se genere ese tipo de respuesta hacia antígenos no inmunogénicos aún cuando se administre el reestímulo sin la TC. (Vajdy and Lycke, 1992). Estrictamente la TC no reúne las características clásicas de un adyuvante ya que su efecto está relacionado a su propia inmunogenicidad y a la carga genética del sujeto a inmunizar. En cepas congénitas de ratones para el H-2 con baja capacidad de responder a la toxina colérica, el efecto potenciador de la misma hacia la KLH fue mucho menor que en cepas respondedoras (Elson, 1992). Recientemente se ha visto que también depende de la capacidad de responder al LPS, ya que en las cepas lps- la respuesta al

KLH administrado conjuntamente con la TC fue claramente menor que en las cepas lps+ (Elson, 1992). Sin embargo la capacidad de romper la tolerancia oral contra el antígeno antes señalado no estuvo influido por la carga genética (Elson, 1992).

Debido a la imposibilidad de utilizar la holotoxina en la fabricación de vacunas humanas es que se ha sustituido por la subunidad B, la cual es un buen inmunógeno del sistema de mucosas. Sin embargo hay resultados contradictorios sobre su eficiencia como adyuvante. La respuesta a proteínas solubles ha sido aumentada en forma muy importante si previamente se la conjugaba a la TC-B (Cserkinsky, 1989; van der Heijden et al., 1991; McKenzie and Halsey, 1984). Por otro lado la administración de KLH conjuntamente pero sin copular a la TC-B ha fallado en generar una respuesta anticuerpos anti KLH en el intestino (Lycke and Holmgren, 1986).

Los mecanismos que hacen que la TC posea poder adyuvante no son claros. El efecto predominante sobre cultivos de LT ha sido inhibitorio, lo cual se ha atribuido a la capacidad de activar la adenilato ciclasa (Holmgren et al., 1974). Sin embargo recientemente se vio que la TC puede afectar los clones Th1 y Th2 de las células T CD4+ en diferente forma, tal que no afecta la función de las células Th2 (producción de IL-4, IL-5 e IL-6) pero si inhibe la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  en las células Th1 (Muñoz et al., 1990), lo cual posiblemente coincide con la inhibición que provoca en la

proliferación in vitro de células T estimuladas con IL-2 pero no con la toxina pertussis (Maghazachi, 1992). Sobre células B humanas altamente purificadas y preactivadas con anticuerpos anti  $\mu$  se ha descrito que la TC tiene un efecto estimulador de la proliferación. Sin embargo esto no ocurre frente a otros mitógenos (Anastassiou, 1992). Por otra parte también podría afectar la diferenciación isotípica de las células B. En cultivos de células IgM+ estimuladas con LPS (lo cual es consistente con la necesidad que se observa in vivo de ser respondedor al LPS para que la TC tenga efecto adyuvante) se ha observado un incremento en el switch a células IgG+ e IgA+ (Lycke and Strober, 1989). Este efecto se manifestó también en la expresión de transcriptos RNA  $\gamma 1$  la cual aumentó varias veces con dosis óptimas de IL-4 (Lycke et al., 1990).

La TC también actúa sobre células presentadoras de antígeno y sobre macrófagos peritoneales normales aumentando la capacidad de estimular la proliferación de células T in vitro. Posiblemente este efecto se deba a la inducción de la producción de IL-1 (Bromander et al., 1991). Este conjunto de datos puede sostener el siguiente mecanismo de acción de la TC: Un aumento de la presentación antigénica con incremento en la producción de IL-1, la cual a su vez es estimulante de los clones Th2 (Lichtman et al., 1988), los cuales a su vez no son inhibidos por la TC. La estimulación de los clones Th2 provoca la producción de IL-4, IL-5 e IL-6 las cuales actúan

en conjunto con la TC para promover la diferenciación de las células B con la consecuente producción de anticuerpos.

Si bien todos estos fenómenos en general son atribuidos a la acción de la subunidad A de la TC, se ha visto que la TC-B tiene efectos inhibitorios sobre la proliferación de LT estimulados por mitógenos y antígenos y sobre la proliferación de linfocitos B inducidos por anti IgM (Woogen et al., 1987) aumentando a su vez la expresión de antígenos de clase II del MHC sobre los LB (Francis et al., 1992). Todos estos efectos estarían mediados por la unión de la TC-B al GM1 (Francis et al., 1992). Sobre las células presentadoras de bazo la TC-B tiene un efecto parecido al descrito para la holotoxina sobre macrófagos peritoneales produciendo un aumento en la secreción de IL-1 y aumentando su capacidad presentadora de KLH, sin embargo en estos cultivos la TC entera fue 20 veces mas efectiva (Hirabayashi et al., 1992). Tomando juntos todos estos datos parecería que el efecto inmunopotenciador de la TC se debería a dos mecanismos diferentes los cuales pueden actuar sinérgicamente, uno dependiente de la activación de la adenilatociclasa y el otro de dependiente la unión al GM1.

## **INMUNIDAD Y NUTRICIÓN**

### **1. Efectos de la desnutrición sobre le sistema inmune**

La malnutrición es una de las causas más comunes de inmunodefocencia. La asociación entre malnutrición e

infección esta desde hace centurias en la historia. El estudio de los registros una iglesia inglesa en el siglo 12 muestran una clara asociación entre los años de hambruna y los años de pestes. (Chandra, 1992) (figura 9)

El análisis del efecto de la malnutrición sobre la inmunidad debe partir por reconocer en primer lugar que las funciones inmunes están reguladas por un conjunto muy complejo de interacciones entre poblaciones celulares heterogéneas y en segundo lugar que la desnutrición también es un fenómeno de gran complejidad en el que intervienen simultáneamente deficiencias diversas. El fenómeno que se observa entonces como producto de la malnutrición sobre el sistema inmune es la suma de un conjunto de alteraciones causadas por la falta de uno o varios nutrientes.

El principal efecto en la malnutrición severa se da sobre el timo con una atrofia del mismo y con el consiguiente efecto sobre la maduración de las células T (Watts, 1969;

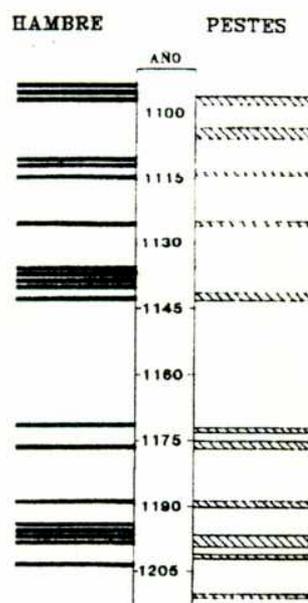


Figura 9: Relación entre malnutrición e infección (Chandra, 1992).

Baisel, 1984). Las areas T dependientes de los órganos linfoides periféricos se ven atrofiadas (Beisel, 1984) y también se observa una disminución de los LT circulantes principalmente los CD4+ (Chandra, 1983 a.). Hay un aumento de los linfocitos que no llevan marcadores ni de células B ni de células T, muchos de los cuales son células inmaduras conteniendo grandes cantidades de deoxinucleotidiltransferasa (TdT) tanto circulantes (Chandra, 1983 b) como en ganglio mesentérico (Melton, 1989) En modelos animales también se ha descrito que la desnutrición provoca un aumento en células con el fenotipo CD8+ (Nimmanwudipong et al., 1992) La inmunidad mediada por células se encuentra claramente afectada en la malnutrición calórico-proteica (Chandra and Newberne, 1977; Katz and Stiehm, 1977). Se ha visto una disminución de la hipersensibilidad retardada a PPD, así como en la capacidad de proliferar en cultivos, tanto en humanos (Beisel, 1984), como en animales (Mengheri, 1992). La producción de Il-2 e IFN- $\gamma$  también esta afectada por la desnutrición proteica (Mengheri, 1992). Las alteraciones provocadas por la malnutrición en la respuesta mediada por células T en general son reversibles luego de un período de renutrición. (Watson and McMurray, 1979; Chandra 1983a) salvo que la desnutrición haya ocurrido en el período prenatal o en los primeros momentos luego del nacimiento.(Chandra, 1983b).

Las inmunoglobulinas séricas pueden estar aumentadas en niños desnutridos. Especialmente se encuentra un incremento

de IgE posiblemente debido a las infecciones parasitarias. La respuesta sérica a antígenos se puede ver disminuída en el caso de antígenos T-dependientes (Suskurd, 1977; Christador et al., 1984), e inclusive estas alteraciones pueden permanecer hasta la segunda generación según se ha visto en experimentos realizados en ratas utilizando madres con desnutrición calórico-proteica (Chandra, 1975).

El sistema de complemento también se ve afectado con reducción en los niveles de C3, C1, C2, y C5 (Watson and McMurray, 1979).

Los distintos pasos que llevan a la fagocitosis se ven alterados en forma distinta por la desnutrición. La quimiotaxis se encuentra retardada en el primer momento pero luego es normal (Kupalongs et al., 1977; Rosar et al., 1975). El engolfamiento de partículas parece ser normal (Douglas and Schopfer, 1974; Tejeda et al., 1964), pero esta disminuída la capacidad bactericida de los fagocitos (PMN y macrófagos) (Selvaraj and Bhat, 1972).

## **2. Efectos de la desnutrición sobre el sistema inmune de mucosas.**

En las desnutrición calórico proteica se ha observado en el tejido inmune asociado al intestino al igual que en otros órganos una disminución de células T inclusive a nivel de células intraepiteliales (Chandra, 1981). Lo mismo se ha

observado en ratas sometidas a dietas libre de proteínas tanto a nivel de la zona inductora (Roux and Lopez, 1987) como de la zona efectora (Gonzalez Ariki et al., 1992).

La proliferación in vitro de linfocitos intestinales frente a la PHA y a la Con A esta disminuida, pero esta aumentada la capacidad citotóxica espontánea (Chandra, 1983b).

A nivel de células B en lamina propria se ha encontrado una disminución de células con IgA de superficie y una acumulación de células IgM+ (Chandra, 1983b). En ratas a las que se les administro dieta libre de proteínas se observo una disminución en GALT tanto de las células IgA+ como de las IgM+ (Lopez et al., 1985). A su vez en PP se encontraron linfocitos inmaduros (Lopez and Roux, 1989). A nivel de LP en el mismo modelo se observó una importante disminución de las células con IgA citoplasmática, alteración que no revirtió luego de 21 días de renutrición (Gonzalez Ariki and Roux, 1992).

En niños desnutridos la concentración de IgA secretoria esta reducida tanto a nivel de intestino (Sirinha et al., 1975; Chandra, 1983b) como en lágrimas (McMurray et al., 1977; Watson et al., 1985) y saliva (McMurray et al., 1977). En modelos animales con dietas bajas en proteínas también se ha observado esta disminución (Lim et al., 1981).

**MATERIALES Y  
METODOS**

## 1. Animales y dieta

Para todos los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar colonia cerrada de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del bioterio a una temperatura de entre 18-22°C y con un ciclo constante de luz-oscuridad de 12 horas.

Para realizar la desnutrición se armaron camadas de 16 crías por madre en los grupos experimentales y de 8 crías por madre en los grupos controles (Winick and Noble, 1966). El destete de las crías se realizó a los 21 días en todos los casos. Al destete todos los animales fueron pesados para determinar el grado de desnutrición. Se consideró desnutrido a aquellas crías que pesaran menos de un 60% del peso de los controles. Previamente se obtuvo el valor control para aplicar esta regla de decisión promediando el peso de 5 camadas de 8 crías por madre. A partir del destete a todos los animales se les administró dieta stock Purina (23.6 % de

proteínas) y agua ad libitum.

## 2. Preparación de las suspensiones celulares

Se extrajeron las placas de Peyer del intestino delgado y el ganglio mesentérico previa sangría a blanco por punción cardíaca de los animales anestesiados con éter. Los órganos fueron colocados en recipientes con medio RPMI 1640 (GIBCO) frío suplementado con 10% de suero fetal (Gen S.A.), 25 mM HEPES y pesados. Las suspensiones celulares se realizaron desmenuzando los órganos con el embolo de una jeringa plástica a través de un tamiz de acero inoxidable apoyado sobre una caja de Petri. Todo el proceso se realizó con el órgano embebido en medio RPMI frío suplementado con 10 % de suero fetal. Para eliminar restos celulares y hebras de mucus las suspensiones celulares obtenidas se pasaron por una columna de lana de nylon. Posteriormente se lavaron tres veces con el medio de cultivo centrifugando las suspensiones a 1000 rpm. La viabilidad se determinó en cámara de Neubauer por la exclusión del azul tripán al 0.01% en medio. Todos los resultados se expresan como número de células viables recuperadas. En animales de 21 días para obtener un número suficiente de células se juntaron las placas de Peyer de 3 a 5 animales antes de realizar la suspensión celular. En esos casos para expresar el peso del órgano y el número de células obtenidas por animal, se dividieron los resultados por el número de animales que formaban parte del "pool".

Cuando las células iban a ser usadas en un cultivo la extracción del órgano y la suspensión celular se realizó en un flujo laminar en condiciones de esterilidad.

### 3. Caracterización de las poblaciones celulares B y T por inmunofluorescencia indirecta.

Se estudiaron por inmunofluorescencia indirecta las poblaciones celulares de placas de Peyer y ganglio mesentérico de animales controles y desnutridos durante la lactancia de 21, 28, 50 y 120 días.

Todas las tinciones se realizaron sobre suspensiones de células vivas. Para ello se ajustaron las suspensiones celulares a  $0.5$  a  $1 \times 10^6$  células por  $100 \mu\text{l}$ . A esa cantidad de células se le agregó  $50 \mu\text{l}$  del primer anticuerpo en la dilución adecuada y se incubó la mezcla 30 minutos a  $0^\circ\text{C}$ . Cuando el primer anticuerpo fue un anticuerpo monoclonal el pellet de células se resuspendió directamente en  $60 \mu\text{l}$  de la dilución apropiada del mismo. Finalizado el período de incubación se le agregó  $1 \text{ ml}$  de PBS con azida sódica al  $0.01\%$  frío y  $100 \mu\text{l}$  de suero fetal bovino con la misma concentración de azida por las paredes del tubo. (McWilliams, 1974). Se centrifugó la suspensión celular a  $1000 \text{ rpm}$  durante 10 minutos. Este procedimiento se realizó tres veces. Luego se resuspendieron las células en  $100 \mu\text{l}$  de medio de cultivo y se les agregó  $50 \mu\text{l}$  del segundo anticuerpo conjugado con el

fluorocromo. La mezcla se incubó nuevamente 30 minutos a 0 °C. Finalizada la incubación se realizaron tres lavados tal cual se describieron previamente. Luego de haberse eliminado el fluorocromo libre las células se resuspendieron en 30  $\mu$ l de medio. Con esas suspensiones celulares se hicieron frotis sobre portaobjetos previamente albuminados, los cuales luego de secarse al aire se fijaron en metanol frío durante 30 minutos. Los frotis se montaron con una gota de glicerina tamponada (9 partes de glicerina y una parte de PBS sódico pH 7,6) y se guardaron a 4 °C. En cada experimento para evaluar el inespecífico del conjugado se hicieron en paralelo controles en los cuales en lugar del primer antisuero se agregaba PBS.

La inspección microscópica de los frotis se realizó en un microscopio Leitz de epiiluminación con lámpara de halógeno de 200 watts. El porcentaje de células positivas en cada preparado se determinó a partir de la observación de entre 400 a 1000 células.

#### **4. Caracterización de células pre-B por doble inmunofluorescencia**

Se estudió por doble fluorescencia la presencia de células pre-B en el ganglio mesentérico de ratas de 21 y 28 días desnutridas durante la lactancia y sus controles. Para ello se realizó una fluorescencia indirecta para el marcador

Thy1.1 sobre células vivas en suspensión tal cual fue descrito previamente. Los frotis fijados con metanol se hidrataron 30 minutos en PBS y luego se agregó la dilución apropiada de anti cadena  $\mu$  y se incubó a temperatura ambiente 30 minutos en cámara húmeda. Finalizada la incubación se realizaron tres lavados de diez minutos con PBS. Luego se agregó el conjugado rodaminado, incubandose 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los preparados se lavaron como ya fue descrito y se montaron con una gota de PBS-glicerina.

La inspección microscópica de los frotis se realizó en un microscopio Olympus de epiiluminación con lámpara de vapor de mercurio de 200 watts. El porcentaje de células positivas en cada preparado se determinó a partir de la observación de 400 células participando dos observadores.

##### **5. Poblaciones celulares caracterizadas y anticuerpos utilizados.**

Para el estudio de las células B y sus subpoblaciones se utilizaron los siguientes antisueros:

IgG de cabra anti IgA de rata específico para la cadena  $\alpha$  (Organon Tecknika Co. Cappel Division) para caracterizar la subpoblación IgA+.

IgG de cabra anti IgM específico para la cadena  $\mu$  (Cappel) para caracterizar la subpoblación IgM+

En ambos casos como segundo antisuero se utilizó IgG de conejo anti IgG de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Cappel).

Tanto los primeros antisueros como el conjugado se titularon previamente a su utilización. Para ello se probaron diluciones crecientes al medio tanto del primero como del segundo antisuero en frotis con células de ganglio mesentérico de animales controles. Se busco en el damero la dilución más alta de ambos reactivos que dé el menor inespecífico y que no disminuya la sensibilidad de la técnica. Las diluciones utilizadas fueron: el anti IgA diluido 1/6, el anti IgM diluido 1/6 y el conjugado diluido 1/10.

Para el estudio de las células T y sus subpoblaciones se utilizaron los siguientes anticuerpos.

IgG monoclonal de ratón anti CD5 de rata (OX19) sobrenadante (Dallman et al., 1984). (Seralab Westbury, NY, USA)

IgG monoclonal de ratón anti CD4 de rata (W3/25) sobrenadante (Williams et al., 1977) (Seralab)

IgG monoclonal de ratón anti CD8 de rata (OX8) sobrenadante (Brideau 1980) (Seralab).

IgG monoclonal de ratón anti Thy1.1 de rata (OX7) sobrenadante (Seralab)

IgG monoclonal de ratón anti IL-2R (CD25) de rata (OX39) sobrenadante (Seralab)

En todos los casos como segundo antisuero se utilizó IgG de

cabra anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (Cappel). Tanto el primer anticuerpo como el conjugado fueron titulados de la forma ya descrita. Las diluciones utilizados fueron: OX19 diluido 1/4, W3/25 diluido 1/4, OX8 tal cual, OX7 diluido 1/5, OX39 diluido 1/4.

Para el estudio de las células pre-B se utilizaron los siguientes antisueros:

IgG monoclonal de ratón anti Thy1.1 de rata (OX7) sobrenadante (Seralab)

IgG de cabra anti IgM específico para la cadena  $\mu$  (Cappel)

Los conjugados utilizados fueron:

(Fab), de conejo anti IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Cappel).

IgG de conejo anti IgG de cabra conjugado con tetrametilrodamina (Cappel).

## 6. Inmunizaciones

Para estudiar el efecto de la desnutrición sobre la capacidad de montar una respuesta inmune específica, a los animales controles y al grupo experimental se les administró por vía intragástrica con una cánula para alimentación de neonatos, tres dosis de toxina colérica (Sigma Chemical Co., St. Louis) de 10, 7 y 7.5  $\mu\text{g}$  en PBS con 3.5 % de carbonato de

sodio. La primera dosis se dió a los 28 días de edad (siete días de alimentación con dieta stock). Las otras dos dosis se administraron separadas por una semana (35 y 42 días de edad) (Pierce, 1984). Entre los 5 y los 7 días posteriores a la última inoculación los animales se sangraron a blanco y se obtuvieron los sueros los cuales se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de uso. Para estudiar el efecto de este modelo de desnutrición sobre la capacidad de montar una respuesta de memoria, a animales que habían recibido el esquema de inmunización ya descrito se les administró a los 113 días un reestímulo de  $15\ \mu\text{g}$  de toxina colérica. Con el objetivo de estudiar la cinética de la respuesta en el tiempo de estudio a un lote de estas ratas se les realizó una sangría exploratoria a los 50 días, a los 113 días (antes del reestímulo) y a los 120 días. A los siete días se los sangró como fue descrito anteriormente. Para evaluar la importancia que tenía sobre la capacidad de montar una respuesta inmune específica, el tiempo de renutrición transcurrido antes de aplicar la primera estimulación antigénica, a un lote de ratas controles y desnutridas durante la lactancia se les aplicó un esquema de inmunización a partir del día 50 de edad.

El esquema consistió en tres dosis de 15, 15 y  $10\ \mu\text{g}$  separadas por una semana cada una procesándose los animales una semana después de la última dosis.

Para el estudio de transferencia de células con actividad

anti toxina colérica a través de la leche se inmunizaron hembras maduras con tres dosis de 30  $\mu\text{g}$  de TC por vía oral separadas por una semana, la primera de ellas tres días antes de aparearlas.

#### 7. Recolección de los fluidos intestinales.

Se separó el intestino delgado de animales en ayunas durante 16 hs. y se extrajo su contenido lavando con 2 a 4 ml (según la edad del animal) de una solución fría de EDTA 50 mM con 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja (Sigma). El contenido se recogió en tubos cónicos y se le agregó 20  $\mu\text{l}$  de fluoruro de fenilmetilsulfonido PMSF (Sigma) 100 mM en etanol. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos en frío. A los sobrenadantes se les adicionó 100  $\mu\text{l}$  de suero fetal bovino y se los fraccionó antes de almacenarlos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. ( Elson, 1984 ). Todas las muestras se utilizaron dentro de los 15 días de su extracción.

#### 8. ELISA para la determinación de IgA

Los pasos de la reacción fueron los siguientes:

- 1) Se cubrieron los pocillos de una microplaca de poliestireno (Corning, N.Y.) durante toda la noche a temperatura ambiente con 200  $\mu\text{l}$  de IgG de cabra anti IgA de

rata ( $\alpha$  específico) purificado por afinidad (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery) ( $6\mu\text{g/ml}$ ) en buffer carbonato-bicarbonato pH 9.5, 0.05 M.

2) Antes de realizar la reacción se taparon los sitios libres de la placa capaces de pegar proteínas en forma inespecífica con una solución al 8% de leche en polvo descremada en buffer carbonato.

3) Se lavaron las placas 4 veces con PBS-Tween 20 al 0.05%.

4) Se hicieron diluciones al medio de las muestras (sueros y fluidos) partiendo desde 1/100 para los animales de 21 y 28 días y desde 1/400 para los animales de 50 y 120 días, hasta 1/6400. En paralelo se hicieron diluciones de IgA purificada (ICN Biomedicals, Inc.) desde  $3\text{ng/ml}$  hasta  $250\text{ ng/ml}$ , para construir una curva standard.

5) Se sembraron  $200\ \mu\text{l}$  de las muestras por duplicado en los pocillos y se incubaron las placas una hora a  $37^\circ\text{C}$ .

6) Se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.05%.

7) Se cubrieron los pocillos con  $200\ \mu\text{l}$  de IgG de cabra anti IgA de rata purificada por afinidad y conjugada con peroxidasa de rabanito (Bethyl) diluido 1/1000 en PBS-Tween.

8) Se incubaron las placas una hora a  $37^\circ\text{C}$ .

9) Se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween.

10) Se agregaron  $200\ \mu\text{l}$  de sustrato (ortofenilendiamina (Sigma)  $1\text{ mg/ml}$  en buffer citrato-fosfato 0.1 M pH 5.0, con 0.025% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y se incubaron las placas en la oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se

detuvo con 50  $\mu$ l de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  2N.

11) La reacción se leyó en un espectrofotómetro manual para policubetas (Metrolab).

Los valores de DO que se utilizaron para interpolar en la curva standard construida con IgA purificada fueron aquellos que correspondían a zonas de las curvas de las muestras lineales y paralelas a la curva standard.

En todas las reacciones se corrieron controles en los que en lugar de la muestra se agrego PBS-Tween y controles en los que se desarrolló la reacción tal cual fue descripta pero sobre pocillos en los que no se había pegado anti IgA.

Antes de realizar la reacción se tituló tanto el anti IgA como el conjugado buscando las mayores diluciones que dieran la máxima sensibilidad a la reacción y el menor inespecífico en los controles antes mencionados.

## 9. ELISA para cuantificar anticuerpos anti TC

Se utilizó con modificaciones la técnica descripta por Lycke (Lycke et al., 1985).

Los pasos de la reacción fueron los siguientes:

1) Se cubrieron los pocillos de una microplaca de 96 pocillos con 200  $\mu$ l del gangliósido GM1 en PBS (2.5  $\mu$ g/ml). Se incubaron las placas durante toda la noche a temperatura ambiente.

2) Se lavaron las placas 4 veces con PBS.

- 3) Se cubrieron los pocillos con 200  $\mu$ l de una solución de TC en PBS (2.5  $\mu$ g/ml). Se incubaron las placas toda la noche a temperatura ambiente.
- 4) Se cubrieron los pocillos con 200  $\mu$ l de leche en polvo descremada al 8% en PBS y se incubaron 1 hora a 37°C. Se lavaron los pocillos 4 veces con PBS-Tween.
- 5) Se hicieron diluciones al medio de las distintas muestras a dosar (sueros, fluidos, sobrenadantes de cultivos).
- 6) Se sembraron 200  $\mu$ l de las muestras en los correspondientes pocillos y se incubaron las placas una hora a 37°C.
- 7) Se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween.
- 8) Se cubrieron los pocillos con 200  $\mu$ l de alguno de los siguientes anticuerpos purificados por afinidad: IgG de cabra anti IgA de rata (específico para cadena  $\alpha$ ) (Bethyl) diluido 1/400 en PBS-Tween, IgG de cabra anti IgM de rata (específico para la porción Fc del anticuerpo) (Bethyl) diluido 1/800 en PBS-Tween o IgG de cabra anti IgG de rata (Sigma) (diluido 1/1000 en PBS-Tween). Se incubaron las placas una hora a 37°C.
- 10) Se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween.
- 11) Se cubrieron los pocillos con 200  $\mu$ l de IgG de conejo anti IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rabanito en una dilución 1/8000 en PBS-Tween. Se incubaron las placas una hora a 37°C.
- 12) Se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween.

13) Se agrego a cada pocillo 200  $\mu$ l de una solución de ortofenilendiamina (OPD) 1 mg/ml en buffer citrato-fosfato 0.1M pH 5.0 con 0.025% de  $H_2O_2$ . Se incubaron las placas en la oscuridad durante diez minutos.

14) La reacción fue detenida mediante el agregado de 50  $\mu$ l de  $SO_4H_2$ .

15) Se leyeron las placas en un espectrofotómetro para policubetas a 492 nm.

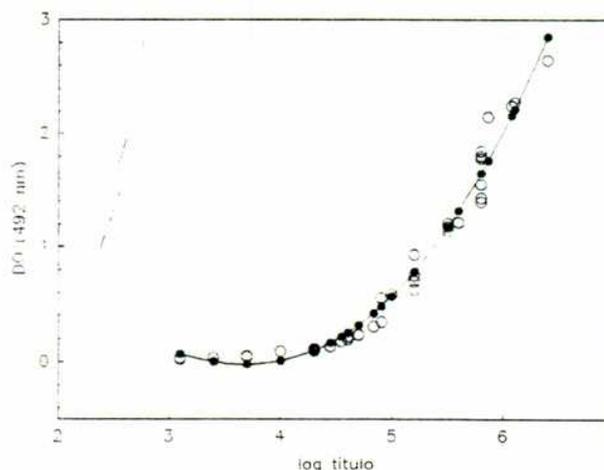
En todas las placas se corrieron tres tipos de controles a) muestras de animales sin inmunizar, b) la menor dilución de cada muestra, se corrió en pocillos al que no se le había pegado el antígeno y c) pocillos en los que en lugar de la muestra se sembró PBS-Tween.

Las concentraciones de gangliósido y toxina colérica se determinaron como la menor concentración que dió la mayor sensibilidad a la reacción. También se tituló el primer antisuero y el conjugado buscando diluciones que den la máxima sensibilidad y el menor inespecífico.

Se consideró como última dilución positiva (título) aquel valor de DO que cumpla los siguientes dos requisitos 1) que sea mayor que la DO media de 20 muestras negativas a esa misma dilución más cinco desviaciones standard (Porstman, 1992) y 2) que el valor de DO sea mayor que 0.1.

El título de anticuerpos IgG en el suero se tomo como un control de la inmunización. Para titular la IgG en las

muestras de suero se construyó una curva standard con 70 sueros de diverso título con las que se graficó la DO de las muestras a una determinada dilución (1/20000, dilución de trabajo) vs su título (Gráfico 1). Previo a la construcción de la curva standard se



**Gráfico 1:** Curva standard de títulos de IgG anti toxina colérica. La dilución de trabajo utilizada fue 1/20000.

verifíco que al graficar la DO vs la dilución en cada suero, las curvas sean aproximadamente paralelas entre sí (Kurstak, 1985)

En consecuencia posteriormente la determinación de la IgG en los sueros se realizó corriendo las muestras por duplicado a una única dilución (1/20000) e interpolando el valor en la curva standard (gráfico).

#### 10. Test de neutralización en loop intestinal

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos del fluido intestinal de neutralizar a la toxina colérica, se utilizó el método de Lange and Holmgren (1978). A animales

anestesiados con éter se les abrió el abdomen. Se ligo de ambos lados una porción de entre 10 a 15 cm de la parte media del intestino delgado teniendo especial cuidado en dejar libre la circulación sanguínea y linfática. Se inyectó 1  $\mu$ g de toxina colérica en 0.2 ml de PBS dentro del loop y luego se cerro el abdomen. A las cuatro horas los animales fueron sacrificados, se abrió nuevamente el abdomen y se extrajo el loop. Se determino su peso con su contenido y luego de vaciados se midió su longitud. Los valores de neutralización fueron expresados como la relación peso/longitud (miligramo/centímetro) de tal forma que cuanto mayor es esta relación menor es la capacidad de neutralizar a la toxina. Además de los animales controles y desnutridos durante la lactancia inmunizados con toxina colérica, se utilizaron animales sin inmunizar como controles. Otro control utilizado fueron animales a los cuales en lugar de toxina se les administró PBS. La concentración de toxina colérica a utilizar se determinó previamente seleccionado aquella que permita tener sensibilidad y reproducibilidad.

#### **11. Cultivo de linfocitos de ganglio mesentérico.**

Se extrajeron en esterilidad los ganglios mesentéricos de ratas normales y desnutridas durante la lactancia. Se prepararon las suspensiones celulares en flujo laminar tal cual ya fue descrito. Se lavaron las células con medio RPMI

1640 suplementado con 10% de suero fetal 25 mM HEPES y antibióticos (50 U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina). Se ajustaron las suspensiones a  $5 \times 10^6$  células por mililitro.

Se colocó un mililitro de las suspensiones celulares en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos (Corning) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de dióxido y 95% de aire saturado con vapor de agua. El período de cultivo fue de una semana sin cambio de medio. Los cultivos se hicieron por duplicado con y sin el agregado de 5 ng de TC (Elson, 1984). Al fin del cultivo se cosecharon las células con los sobrenadantes y se centrifugaron a 1500 rpm. Los sobrenadantes se fraccionaron y guardaron a -20 °C hasta su uso. A las células se les evaluó la viabilidad al fin del cultivo por exclusión del colorante azul tripan.

## 12. Análisis estadístico de los datos.

La normalidad y la homogeneidad de varianza de las muestras se determinó por los ensayos de Kolmogorov-Smirnov y de Scheffe-Box respectivamente. Para el análisis de los porcentajes de las distintas poblaciones celulares se realizaron transformaciones logarítmicas y arcoseno con el objetivo de obtener normalidad y homocedacia. En el análisis de los títulos de anticuerpo se realizó la transformación logarítmica.

Se realizó un análisis de varianza anidado para discriminar el origen de la variación (entre tratamientos o entre camadas o experimentos) (Sokal-Rolf).

Para la comparación de medias se utilizó el test t de Student. Cuando se realizaron comparaciones entre varias medias se utilizó el análisis de varianza y el test de Tukey para los contrastes, cuando las muestras fueron iguales.

Cuando estaban involucrados dos factores se realizó un análisis de la varianza de dos factores.

## **RESULTADOS**

**ALTERACIONES EN EL PESO CORPORAL Y EN DISTINTOS ORGANOS  
LINFOIDES DEBIDO A LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA**

**1. Evolución del peso de los animales controles y desnutridos durante la lactancia, desde el destete hasta los 120 días de edad.**

En la tabla 1 y en el gráfico 2 se observa las consecuencias de la desnutrición durante la lactancia sobre el peso corporal de las ratas desde el destete hasta que son animales adultos, comparado con animales controles de la misma edad. Como se observa, el peso de los animales desnutridos permanece significativamente disminuído, incluso luego de 90 días de renutrición con dieta comercial.

**2. Evolución del peso de las placas de Peyer, del ganglio mesentérico y del timo de ratas desnutridas durante la lactancia y controles de la misma edad.**

En la tabla 2 se observa que el peso de los tejidos linfoides asociados al intestino se recupera relativamente rápido, ya que luego de un mes de alimentación con dieta comercial alcanzan los valores de los animales controles. Contrariamente a esto el peso del timo está claramente disminuído tanto a los 21 como a los 28 días.

### 3. Evolución del número de células recuperada de los tejidos linfoides asociados al intestino de ratas desnutridas durante la lactancia y controles de la misma edad.

En la tabla 3 se observan las consecuencias de la desnutrición durante la lactancia sobre el número de células recuperadas de las placas de Peyer y del ganglio mesentérico de ratas desnutridas durante la lactancia y renutridas con dieta comercial, y de ratas controles de la misma edad. La recuperación en el número de células es más lenta que la recuperación del peso en los mismos órganos. Luego de 30 días de renutrición con dieta comercial los animales que habían sido desnutridos poseen un menor número de células que los controles. Sin embargo luego de 45 días de renutrición alcanzan los mismos valores que los controles.

**TABLA 1: EVOLUCION DEL PESO CORPORAL (Grs.) EN RATAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA**

	EDAD (DIAS)				
	21	28	50	70	120
CONTROLES	51.4±5* (18)**	79.8±8.8 (23)	169.±31.8 (25)	215±35 (10)	341.8±67.3 (12)
DESNUTRIDOS	26.5±3.2 (29)	47.3±6.6 (23)	121.8±23.4 (27)	175±25 (10)	264.3±55.8 (12)
SIGNIFICACION ESTADISTICA	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.01	p<0.01

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis significan la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.

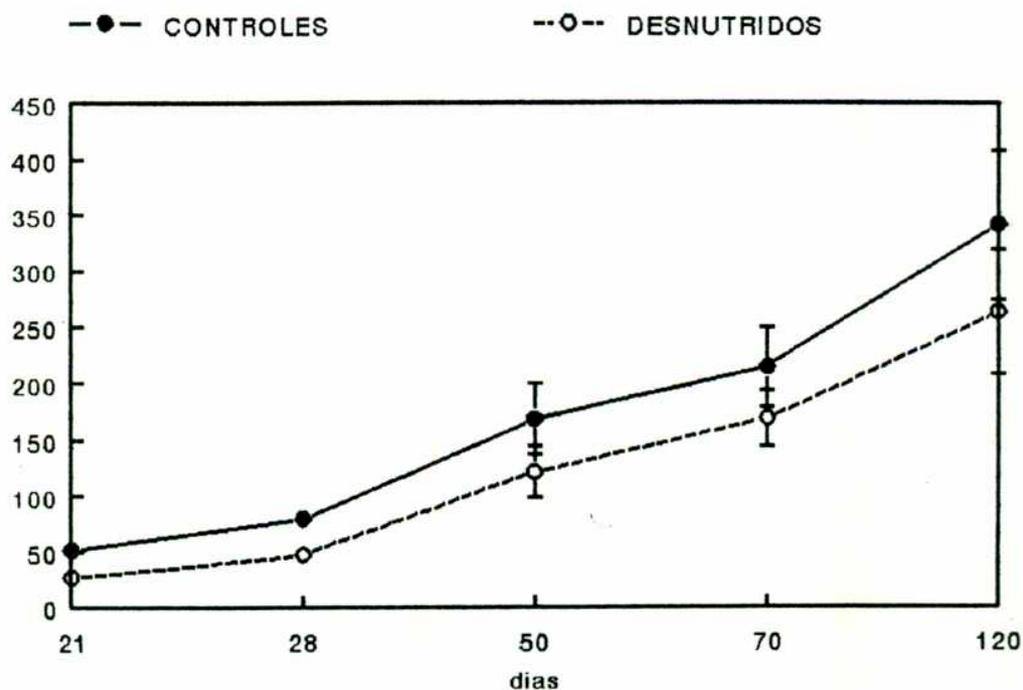


Gráfico 2

**TABLA 2: PESO DE LAS PLACAS DE PEYER, DEL GANGLIO MESENTERICO Y DEL TIMO DE RATAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA**

EDAD		PESO (MG)		SIGNIFICACION ESTADISTICA
		CONTROLES	DESNUTRIDOS	
21 DIAS	PP			
	GM	68.87±42.7* (15)**	55.16±11.1 (25)	
	TIMO	173±42 (8)	48±11 (8)	p<0.0001
28 DIAS	PP	152.72±50.5 (25)	100±45.26 (24)	p<0.001
	GM	120.5±45.1	52.5±23.3 (18)	p<0.001
	TIMO	229±20 (6)	97±16 (7)	p<0.0001
50 DIAS	PP	286.6±130.2 (20)	249.2±112.7 (22)	p=0.6
	GM	340.3±130.2 (30)	358.4±120.5 (32)	p=0.9

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.

**TABLA 3: NUMERO DE CELULAS RECUPERADAS DE LAS PLACAS DE PEYER (PP) Y DEL GANGLIO MESENTERICO (GM) DE RATAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

EDAD		NUMERO DE CELULAS x 10 <sup>6</sup>		SIGNIFICACION ESTADISTICA
		CONTROLES	DESNUTRIDOS	
21 DIAS	PP	0.5±0.2* (12)**	0.15±0.1 (14)	p<0.0001
	GM	11.22±1.6 (18)	3.94±1.62 (29)	p<0.0001
28 DIAS	GM	26.33±8.6 (23)	8.62±3.18 (23)	p<0.0001
50 DIAS	PP	3.79±2.06 (11)	1.69±0.633 (8)	p=0.01
	GM	66.3±16.1 (12)	44.14±14.54 (21)	p=0.002
70 DIAS	GM	64.6±7.09 (5)	68.8±4.66 (5)	p=0.3
120 DIAS	PP	3.13±2.28 (9)	3.31±2.29 (12)	p=0.85
	GM	64±34.33 (10)	67±22.78 (12)	p=0.77

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.

## ALTERACIONES DE LAS CELULAS T DEBIDAS A LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA

1. Porcentaje de células T totales (CD5+) y T CD4+ en las placas de Peyer de ratas desnutridas durante la lactancia de 21 y 28 días y controles de la misma edad.

En la tabla 4 y en el gráfico 3 se presenta el porcentaje de LT (CD5+) marcados con el anticuerpo monoclonal OX19, en las placas de Peyer de ratas de 21 días desnutridas durante la lactancia y controles de igual edad. Para realizar la técnica de inmunofluorescencia las células fueron obtenidas de un conjunto de placas de Peyer provenientes de 4 ratas. Se observa en los animales desnutridos un mayor porcentaje de células T que los controles aunque las diferencias entre ambos grupos no son significativas ( $p=0.228$ ).

También se presentan los porcentajes de células T totales (CD5+) y de la subpoblación CD4+ en las placas de Peyer de ratas de 28 días desnutridas durante la lactancia y los controles de la misma edad. Para realizar la técnica de inmunofluorescencia las células fueron obtenidas de un conjunto de placas de Peyer provenientes de 3 ratas. A diferencia de lo que ocurre en las placas de Peyer de animales de 21 días, a los 28 días vemos que las células T totales se encuentran significativamente disminuidas en las ratas desnutridas durante la lactancia ( $p=0.001$ ). Además la

subpoblación con fenotipo colaborador también esta significativamente disminuídas en el grupo experimental de 28 días.

## 2. Porcentaje de células T CD5+ y CD4+ en ganglio mesentérico de ratas desnutridas de 21 días y sus controles de igual edad.

En la tabla 5 y en el gráfico 4 se presentan los porcentajes de células T CD5+ y CD4+ en el ganglio mesentérico de animales de 21 días desnutridos durante la lactancia y controles de la misma edad. Los datos corresponden a tres experimentos para ambos marcadores. Para determinar la variación entre los distintos experimentos se realizó un análisis de varianza anidado. Se observa que no hay diferencias significativas entre los dos grupos ni para el porcentaje de células T totales (CD5+) ( $p=0.136$ ) ni para la subpoblación colaboradora (CD4+) ( $p=0.27$ ). Entre las distintas experiencias dentro del mismo factor principal sin embargo se observaron diferencias, principalmente al analizar los grupos de ratas desnutridas.

## 3. Porcentaje de células Thy1.1+ (OX7+) en el ganglio mesentérico de animales desnutridos durante la lactancia de 21 y 28 días y controles de la misma edad.

En la tabla 6 y en el gráfico 5 se presentan los porcentajes de células Thy1.1+ (OX7+) en el ganglio mesentérico de animales de 21 días desnutridos durante la lactancia y animales normales. También se observan los datos para el mismo marcador en animales de 28 días. Los datos corresponden a dos o tres experimentos en ambas edades. Para determinar la variación correspondiente a los experimentos se realizó un análisis de varianza anidado. Se observa que a los 21 días no hay diferencias significativas entre los grupos de animales desnutridos y los grupos control.

A los 28 días, sin embargo, si se observan diferencias entre el grupo experimental y el control de la misma edad para este marcador ( $p=0.0006$ ). Cuando se compara la presencia de células que expresan este marcador entre animales de 21 y 28 días se ve que en las ratas normales hay una disminución significativa en la medida que el animal crece ( $p<0.001$ ), sin embargo en las desnutridas el porcentaje no cambia.

#### **4. Porcentaje de células T totales (CD5+), T CD4+ y T CD8+ en el ganglio mesentérico de ratas desnutridas durante la lactancia de 28 días y controles de la misma edad.**

En la tabla 7 y en el gráfico 6 se presentan los porcentajes de células T totales (CD5+), T CD4+ y T CD8+ en el ganglio mesentérico de ratas de 28 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad. Los datos provienen de dos experimentos para los controles y de cuatro

experimentos para los desnutridos. Para determinar cual es el aporte a la varianza total de la variación entre experimentos se realizó un análisis de la varianza anidado. A diferencia de lo que ocurre a los 21 días tanto las células T totales como las células CD4+ se encuentran significativamente disminuidas en los grupos de animales desnutridos cuando se lo compara con los grupos control ( $p=0.0045$  y  $p=0.0027$  respectivamente). Las células CD8+ también se encuentran disminuidas en el grupo desnutrido ( $p=0.03$ ). Se observa una contribución significativa a la varianza total debida a la variación entre experimentos (o camadas) en el análisis de las células T totales del grupo de ratas desnutridas.

##### **5. Porcentaje de células T totales (CD5+), T CD4+ y T CD8+ en las placas de Peyer de ratas desnutridas durante la lactancia de 50 días y controles de igual edad.**

En la tabla 8 y en el gráfico 7 se presentan los porcentajes de células T totales (CD5+), T CD4+ y T CD8+ en las placas de Peyer de ratas de 50 días desnutridas durante la lactancia y sus controles. Los datos provienen de tres experimentos separados, salvo para el marcador CD8+. Tanto las células T totales como las células CD4+ permanecen significativamente disminuidas en el grupo experimental luego de 30 días de renutrición con dieta comercial cuando se las compara con el control ( $p=0.01$  y  $p=0.02$  respectivamente), lo mismo ocurre con las células CD8+ ( $p<0.001$ ).

**TABLA 4: PORCENTAJE DE CELULAS T EN LAS PP DE RATAS DE 21 Y 28 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

	21 DIAS		28 DIAS	
	OX19+(CD5+)		OX19+(CD5+)	W3/25+(CD4+)
CONTROLES	14.33±3.78* (4)**		15.00±2.58 (4)	12.33±0.57 (4)
DESNUTRIDOS	18.33±3.05 (4)		6.14±2.79 (6)	5.00±2.00
SIGNIFICACION ESTADISTICA	p=0.228		p=0.001	p=0.004

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de datos utilizados para obtener cada media. Cada dato a su vez proviene de analizar las células de 4 ó 3 animales dependiendo que sean de 21 o de 28 días. El test estadístico utilizado fue un análisis de varianza anidado.

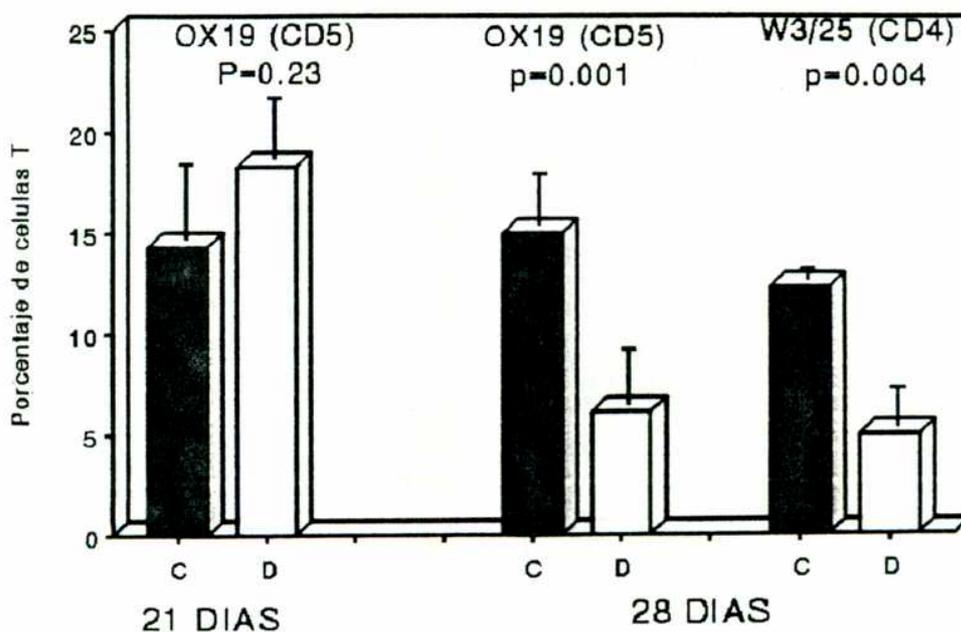


Gráfico 3

**TABLA 5: PORCENTAJE DE CELULAS T EN EL GANGLIO MESENTERICO DE RATAS DE 21 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

	Exp N°	OX19+ (CD5+)	W3/25+(CD4+)
CONTROL	1	29.33±2.16 (6)	18.66±3.93 (6)
	2	27.50±2.91 (5)	20.5±3.20 (6)
DESNUTRIDO	1	25.90±0.17 (3)	12.58±2.90 (6)
	2	23.80±4.08 (5)	19.14±4.70 (7)
	3	18.20±3.19 (5)	12.75±1.25 (4)
SIGNIFICACION ESTADISTICA		p=0.136	p=0.27

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue un análisis de varianza anidado.

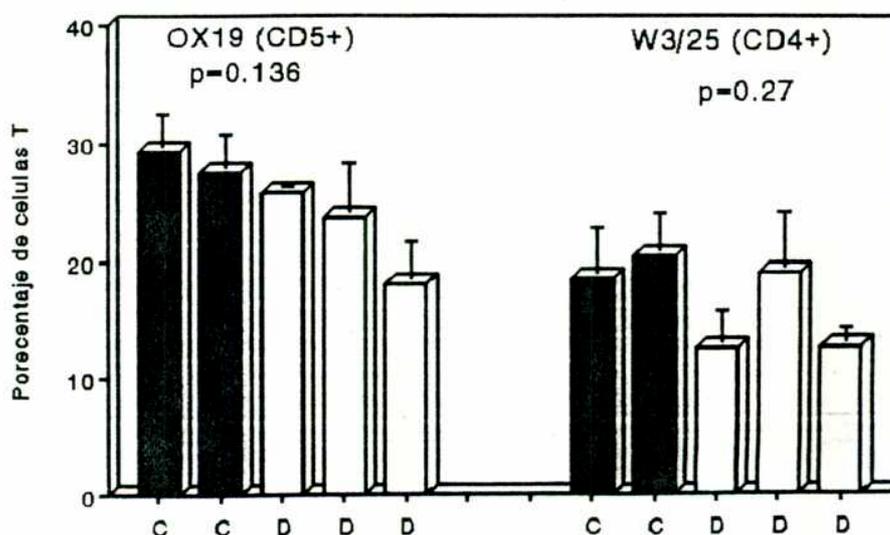


TABLA 6: PORCENTAJE DE CELULAS OX7+ (Thy1.1+) EN EL GM DE RATAS DE 21 y 28 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.

	EXP. N°	21 DIAS	28 DIAS
CONTROLES	1	21.90±1.67* (5)**	10.87±1.93 (4)
	2	15.00±1.00 (4)	11.50±0.80 (5)
	3	-	9.66±0.57 (3)
DESNUTRIDOS	1	24.40±4.09 (5)	20.50±1.81 (7)
	2	22.50±2.06 (5)	19.60±3.38 (6)
SIGNIFICACION ESTADISTICA		p=0.34	p=0.0006

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\* Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue un análisis de varianza anidado.

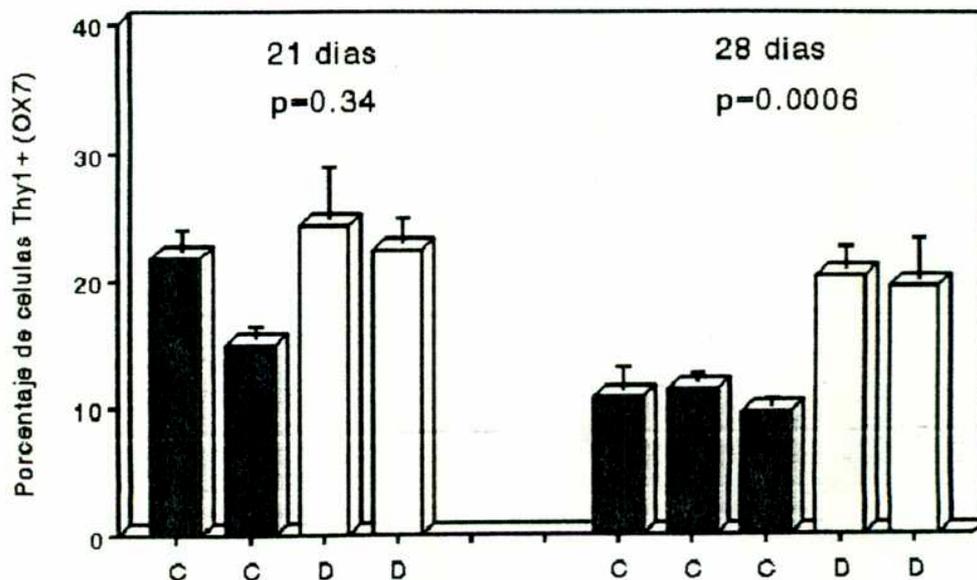


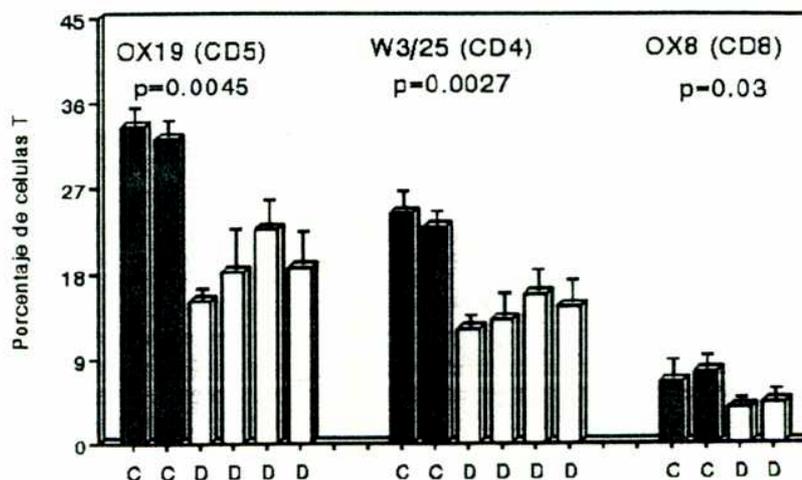
Gráfico 5

**TABLA 7: PORCENTAJE DE CELULAS T EN GM DE RATAS DE 28 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

	Exp. N°	OX19+(CD5+)	W3/25+(CD4+)	OX8+(CD8+)
CONTROL	1	33.50±1.73* (5)**	24.50±2.00 (6)	6.66±2.06 (6)
	2	32.25±1.70 (4)	23.00±1.41 (5)	7.60±1.50 (6)
DESNUTRIDOS	1	15.25±0.95 (4)	12.30±1.15 (3)	3.80±0.83 (5)
	2	18.33±4.16 (3)	13.30±2.51 (3)	4.40±1.14 (5)
	3	22.75±2.80 (4)	16.00±2.21 (6)	-
	4	18.80±3.48 (7)	14.70±2.50 (4)	-
SIGNIFICACION ESTADISTICA		p=0.0045	p=0.0027	p=0.03

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue un análisis de varianza anidado.



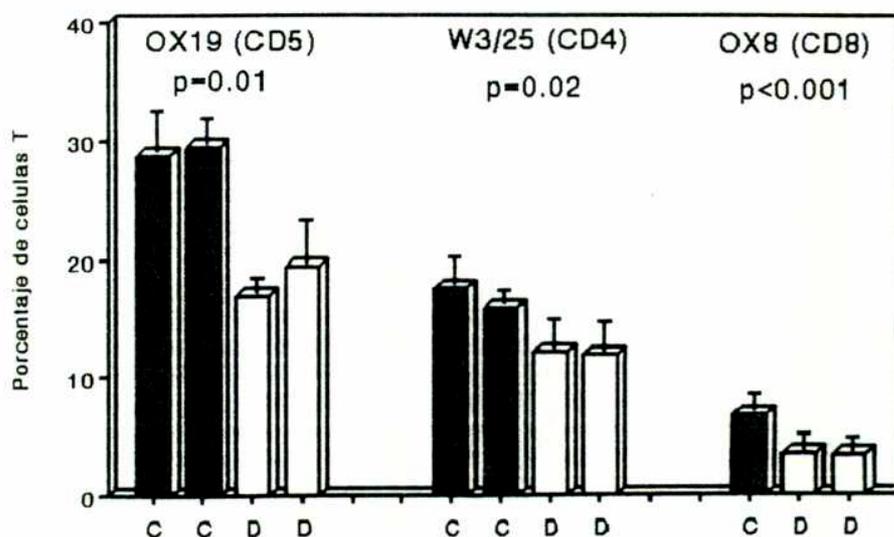
**Gráfico 6**

**TABLA 8: PORCENTAJE DE CELULAS T EN LAS PP DE RATAS DE 50 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

	EXP N°	OX19+(CD5)	W3/25+(CD4+)	OX8+(CD8+)
CONTROLES	1	28.80±3.42* (5)**	17.70±2.28 (7)	6.83±1.47 (6)
	2	29.50±2.08 (4)	16.00±1.15 (4)	-
DESNUTRIDOS	1	17.00±1.22 (5)	12.20±2.50 (5)	3.50±1.30 (4)
	2	19.50±3.70 (4)	12.00±2.54 (5)	3.44±1.13 (5)
SIGNIFICACION ESATDISTICA		p=0.01	p=0.02	p<0.001

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue un análisis de varianza anidado, salvo en el marcador CD8, para el análisis del cual se utilizó el test de t de Student.



**Gráfico 7**

6. Porcentaje de células T totales (CD5+), T CD4+ y T CD8+ en el ganglio mesentérico de ratas desnutridas durante la lactancia de 50 días y controles de igual edad.

En la tabla 9 y en el gráfico 8 se presentan los porcentajes de células T CD5+, T CD4+ y T CD8+ en el ganglio mesentérico de ratas de 50 días desnutridas durante la lactancia y sus controles. Los datos provienen de dos o tres experimentos realizados por separado. Tanto las células T totales como las células CD4+ y las CD8+ permanecen significativamente disminuídas en el grupo experimental luego de 30 días de renutrición con dieta comercial cuando se las compara con el control ( $p=0.004$ ,  $p=0.02$  y  $p=0.02$  respectivamente).

7. Porcentaje de células T totales (CD5+) y T CD4+ en las placas de Peyer de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y controles de la misma edad.

En la tabla 10 y en el gráfico 9 se presentan los porcentajes de células T CD5+ y T CD4+ en las placas de Peyer de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y ratas controles de la misma edad. Los datos corresponden a uno ó dos experimentos independientes. Se observa que luego de 3 meses de alimentación con dieta comercial las ratas del grupo experimental continúan presentando en las placas de Peyer una disminución significativa en el porcentaje de células T CD5+

y CD4+ ( $p < 0.01$  y  $p = 0.01$  respectivamente).

**8. Porcentaje de células T totales (CD5+) y T CD4+ en el ganglio mesentérico de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.**

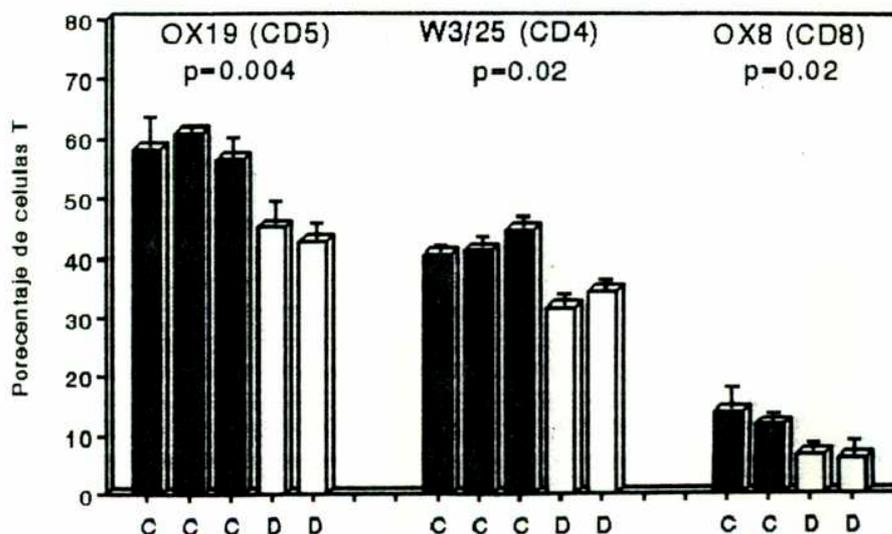
En la tabla 11 y en el gráfico 10 se presentan los porcentajes de células CD5+ y CD4+ en el ganglio mesentérico de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad. Los datos corresponden a dos experimentos independientes. Para analizar los resultados se utilizó un análisis de varianza anidado. Los porcentajes de las células CD5+ y CD4+ se encuentran significativamente disminuidos en el grupo experimental en relación al control ( $p = 0.003$  y  $p = 0.015$ ).

**TABLA 9: PORCENTAJE DE CELULAS T EN EL GM RATAS DE 50 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

	EXP N°	OX19+(CD5+)	W3/25+(CD4+)	OX8+(CD8+)
CONTROLES	1	58.25±4.85* (4)**	40.60±1.15 (3)	14.00±3.53 (5)
	2	61.00±0.70 (5)	41.40±1.81 (5)	11.75±1.5 (4)
	3	56.60±3.20 (5)	44.80±1.78 (4)	-
DESNUTRIDOS	1	45.40±3.57 (5)	31.80±1.78 (5)	6.60±1.52 (5)
	2	43.00±2.55 (5)	34.60±1.52 (5)	6.00±2.55 (5)
SIGNIFICACION ESTADISITCA		p=0.004	p=0.02	p=0.02

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue un análisis de la varianza anidado.



**Gráfico 8**

**TABLA 10: PORCENTAJE DE CELULAS T TOTALES (CD5+) Y T CD4+ EN LAS PLACAS DE PEYER DE RATAS DE 120 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA**

	EXP. N°	OX19+(CD5+)	W3/25+(CD4+)
CONTROLES	1	29.40±2.70* (5)**	18.40±2.30 (5)
DESNUTRIDOS	1	23.50±2.30 (5)	14.20±1.90 (5)
	2	-	13.20±2.50 (3)
SIGNIFICACION ESTADISTICA		p<0.01	p=0.01

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue el t de Student.

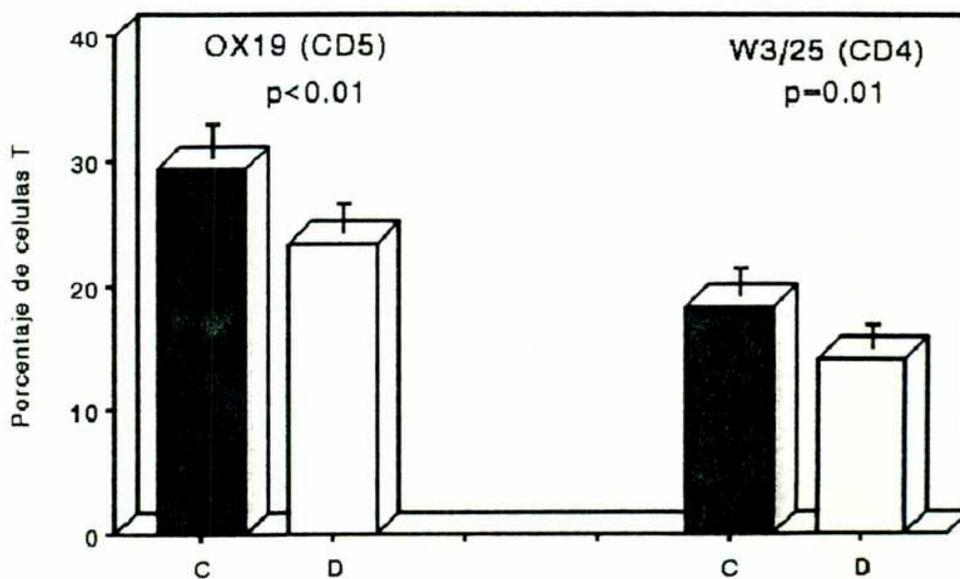


Gráfico 9

**TABLA 11: PORCENTAJE DE CELULAS T EN EL GANGLIO MESENTERICO DE RATAS DE 120 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA**

	EXP. N°	OX19+(CD5+)	W3/25+(CD4+)
CONTROLES	1	55.40±3.90* (5)**	38.40±3.00 (5)
	2	57.30±2.50 (3)	41±4 (3)
DESNUTRIDOS	1	41.40±4.50 (5)	28.80±2.20 (5)
	2	41.50±1.50 (6)	28.50±2.66 (6)
SIGNIFICACION ESTADÍSTICA		p=0.003	p=0.015

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue un análisis de la varianza anidado.

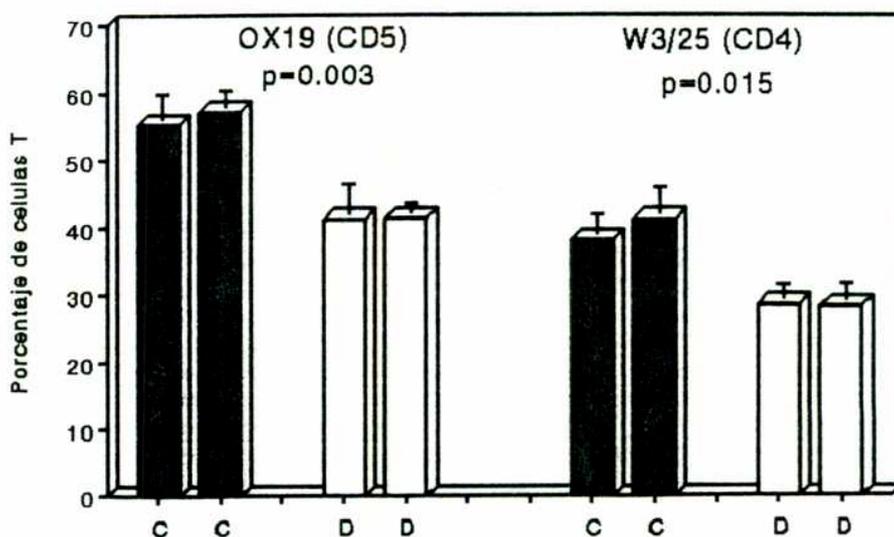


Gráfico 10

## 9. Resumen de las alteraciones producidas en las células T de las placas de Peyer y del ganglio mesentérico por la desnutrición durante la lactancia

Las células T totales (CD5+) y las células T CD4+ se encuentran disminuidas en los animales desnutridos aún luego de tres meses de renutrición con dieta stock tanto en las placas de Peyer como en el ganglio mesentérico. Curiosamente a los 21 días de edad (día del destete) no se observan diferencias en los porcentajes de ambos marcadores. Las células que expresan el marcador CD8 también se encuentran disminuidas luego de 30 días de renutrición con dieta comercial. Por otra parte el porcentaje de células que expresan el marcador Thy1.1 aumenta en los animales desnutridos de 28 días de edad. Para evaluar el grado de activación de las células T en los animales controles y desnutridos se realizó un inmunofluorescencia indirecta para determinar el grado de expresión del receptor para IL-2. Los niveles de expresión del receptor para IL-2 en el ganglio mesentérico fueron menores o iguales al 1% tanto en los animales normales como en los desnutridos de 21, 28 y 50 días.

**ALTERACIONES EN LAS CELULAS B EN LAS PP Y EN EL GM DEBIDAS A LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA**

1. Porcentaje de células pre-B en el ganglio mesentérico de ratas de 21 y 28 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.

A los 21 días se observa en los animales desnutridos un aumento significativo, en relación a los controles, de las células que expresan Thy1.1 en la superficie y cadenas  $\mu$  en el citoplasma ( $p < 0.001$ ). Conjuntamente con esto hay una disminución de los plasmablastos que poseen IgM en el citoplasma ( $p < 0.01$ ) (Tabla 12 y Gráfico 11). A los 28 días las células Thy1.1+  $c\mu$ + en los animales controles disminuyen hasta prácticamente no encontrarse mientras que en los desnutridos permanecen aumentadas ( $p < 0.0001$ ). También se observa una disminución en las células  $c\mu$ + en el grupo desnutrido ( $p < 0.0001$ ), mientras que las células OX7+  $c\mu$ - en este mismo grupo están aumentadas en relación al control ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 13 y Gráfico 12).

2. Porcentaje de células que expresan IgM ó IgA en las placas de Peyer y en el ganglio mesentérico de ratas de 28 días desnutridas durante la lactancia y en sus controles de igual edad.

En la tabla 14 y en el gráfico 13 se presentan los porcentajes de células  $s\alpha+$  en las placas de Peyer de ratas de 28 días desnutridas durante la lactancia y controles de igual edad.

Para realizar la técnica de inmunofluorescencia las células fueron obtenidas de un conjunto de placas de Peyer de tres ratas .En los animales desnutridos se observa una disminución significativa de las células con IgA en su superficie ( $p=0.002$ ).

También se presentan los porcentajes de células  $s\mu+$  y  $s\alpha+$  en el ganglio mesentérico. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes. El porcentaje de células con IgA en la superficie está significativamente disminuído en los animales desnutridos ( $p<0.001$ ), mientras que el porcentaje de células con IgM en su superficie no presenta diferencias significativas entre ambos grupos.

**3. Porcentaje de células que expresan IgM ó IgA en las placas de Peyer de ratas de 50 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.**

En la tabla 15 y en el gráfico 14 se presentan los porcentajes de células  $s\mu+$  y  $sa+$  en las placas de Peyer de ratas de 50 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.

Los datos corresponden a 3 experimentos independientes. Se observa que en los animales desnutridos hay un aumento significativo en las células que expresan IgM en relación a los controles ( $p < 0.05$ ). Por otro lado las células con IgA en su superficie están significativamente disminuídas en el grupo experimental ( $p < 0.05$ ). Para determinar el porcentajes de células que expresan IgA o IgM ( la suma de las células IgM+ y de las células IgA+) se utilizaron sólo aquellos animales a los cuales se les había determinado ambas poblaciones. Como se observa en la tabla no se encontraron diferencias al comparar entre ambos grupos el porcentaje de células que expresan una u otra inmunoglobulina.

**TABLA 12: PORCENTAJE DE CELULAS PRE-B EN EL GANGLIO MESENTERICO DE RATAS DE 21 DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA Y SUS CONTROLES**

		OX7+ cμ+	OX7- cμ+	OX7+ cμ-
	CONTROL	1.6±0.9* (4)**	8.1±1.9 (4)	18.7±3.1 (4)
21 DIAS	DESNUTRIDO	6.6±1.5 (4)	4.3±1.44 (4)	17.6±2.6 (4)
	SIGNIFICACION ESTADISTICA	p<0.001	p<0.01	NS

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue el t de Student

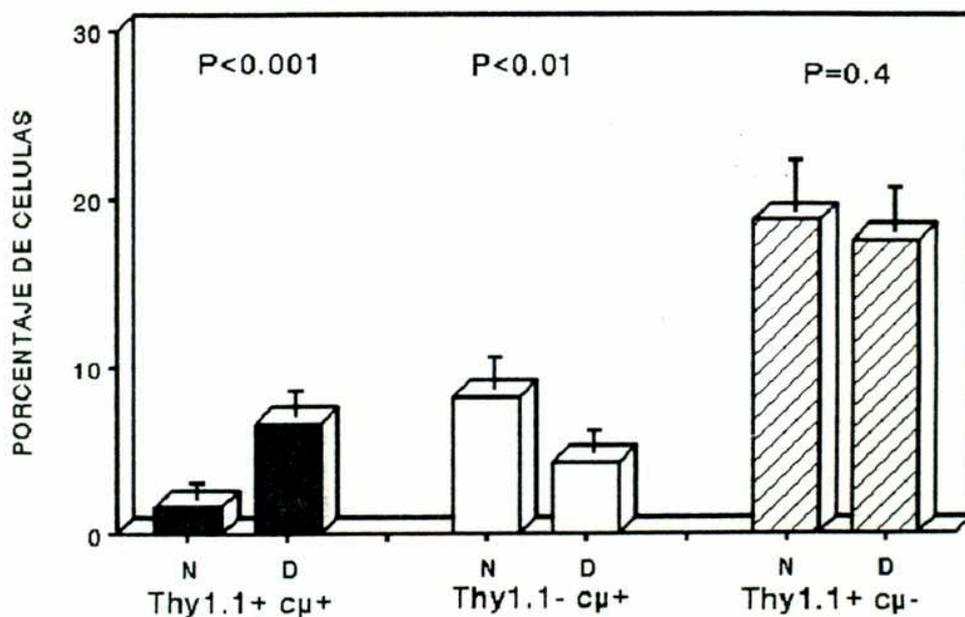


Gráfico 11

**TABLA 13: PORCENTAJE DE CELULAS PRE-B EN EL GANGLIO MESENTERICO DE RATAS DE 28 DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA Y SUS CONTROLES**

		OX7+ cμ+	OX7- cμ+	OX7+ cμ-
	CONTROL	0.5±0.3* (5)**	9.4±1.14 (5)	11.2±1.22 (5)
28 DIAS	DESNUTRIDO	6.3±0.67 (5)	4.2±0.83 (5)	15.8±0.83 (5)
	SIGNIFICACION ESTADISTICA	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue el t de Student

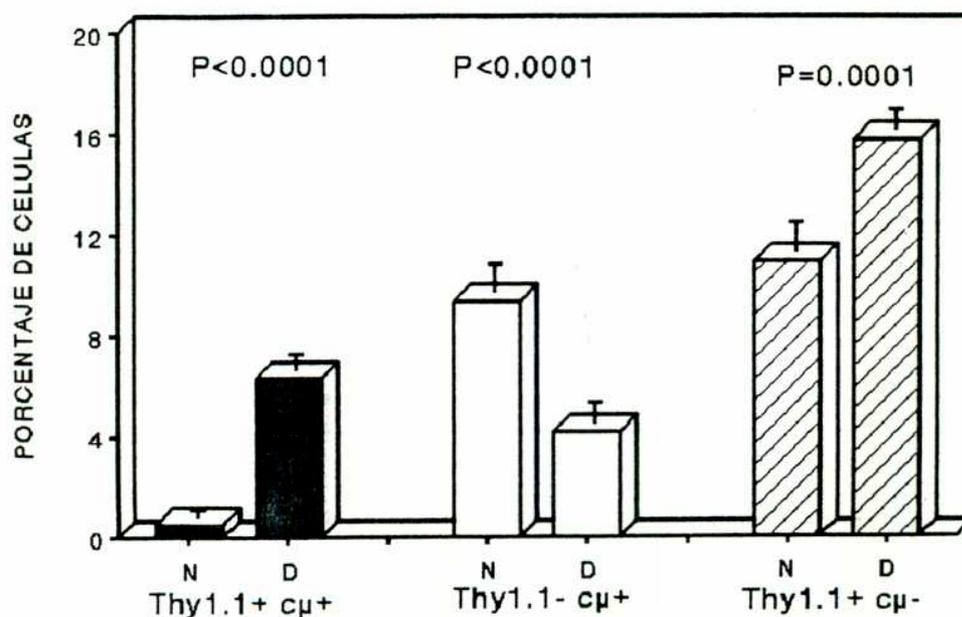


Gráfico 12

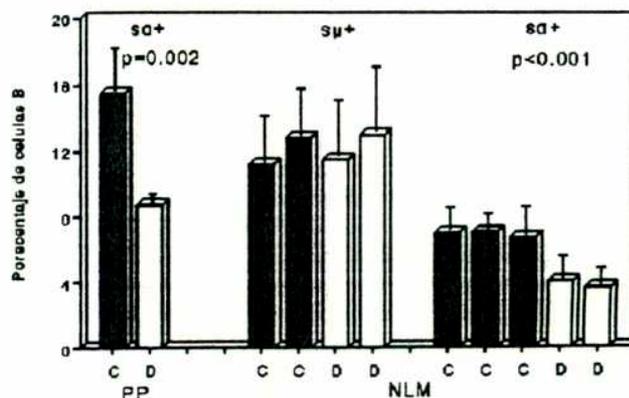
**TABLA 14: PORCENTAJE DE CELULAS IgM+ ó IgA+ EN LAS PP Y EN EL GLM DE RATAS DE 28 DIAS NORMALES Y DESNUTRIDAS.**

	EXP. N°	PLACAS DE	GANGLIO MESENTERICO	
		PEYER	IgM+(sμ+)	IgA+(sα+)
CONTROLES	1	15.50±2.50* (5)**	11.20±2.77 (5)***	7.00±1.41 (6)
	2	-	12.80±2.77 (5)	7.10±0.92 (5)
	3	-	-	6.75±1.70 (4)
DESNUTRIDOS	1	8.75±0.50	11.50±3.40 (4)	4.00±1.41 (5)
	2		13.00±3.90 (4)	3.66±1.03 (6)
SIGNIFICACION ESTADISTICA		p=0.002	p<0.001	

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\* Los números entre paréntesis significan la cantidad de datos utilizados para obtener cada media. Cada dato a su vez proviene del análisis conjunto de las células de 3 animales.

\*\*\*Los números entre paréntesis significan la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue el test t de Student (PP) o un análisis de varianza anidado (GLM).



**Gráfico 13**

**TABLA 15: PORCENTAJE DE CELULAS B QUE EXPRESAN IgM O IgA EN LAS PP DE RATAS DE 50 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

	EXP N°	IgM (s $\mu$ +) (n)	IgA+ (sa+) (n)	IgM+IgA
CONTROLES	1	28.75 $\pm$ 6.45* (4)**	20.50 $\pm$ 1.00 (4)	
	2	25.33 $\pm$ 0.58 (3)	17.00 $\pm$ 1.20 (4)	43.7 $\pm$ 2.9
	3	-	19.60 $\pm$ 3.43 (5)	
DESNUTRIDOS	1	37.50 $\pm$ 5.00 (4)	13.83 $\pm$ 2.48 (6)	
	2	42.60 $\pm$ 3.20 (6)	15.80 $\pm$ 2.26 (7)	50.8 $\pm$ 7.8
	3	-	9.33 $\pm$ 3.21 (3)	
SIGNIFICACION ESTADISTICA		p<0.05	p=0.045	p=0.1

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis significan la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue un análisis de la varianza anidado.

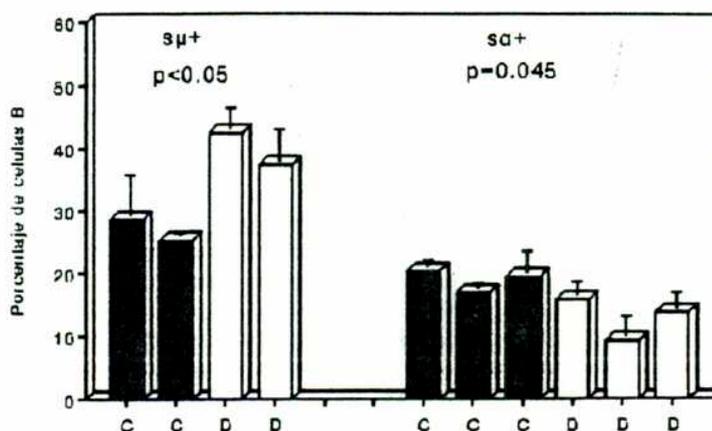


Gráfico 14

**4. Porcentaje de células que expresan IgM ó IgA en el ganglio mesentérico de ratas de 50 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.**

En la tabla 16 y en el gráfico 15 se presentan los porcentajes de células  $s\mu+$  y  $s\alpha+$  en el ganglio mesentérico de ratas de 50 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad. Los datos corresponden a 4 ó 5 experimentos realizados independientemente. Al igual que en las placas de Peyer, se observa un aumento significativo en las células que expresan IgM ( $p < 0.001$ ) y una disminución en las células que expresan IgA ( $p < 0.0001$ ). Para determinar el porcentaje de células que expresan IgA o IgM ( la suma de las células IgM+ y de las células IgA+) se utilizaron sólo aquellos animales a los cuales se les había determinado ambas poblaciones. Como se observa en la tabla no se encontraron diferencias al comparar entre ambos grupos el porcentaje de células que expresan una u otra inmunoglobulina.

**5. Porcentaje de células que expresan IgM e IgA en las placas de Peyer y en el ganglio mesentérico de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.**

En la tabla 17 y en el gráfico 16 se presentan los porcentajes de células  $s\mu+$  y  $s\alpha+$  en las placas de Peyer y en

el ganglio mesentérico de ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad. Se observa que luego de 90 días de renutrición los porcentajes de células que expresan IgM o IgA en ambos órganos no difieren con los valores de los controles.

**6. Resumen de las alteraciones en las células B de las PP y del GM provocadas por la desnutrición durante la lactancia.**

A los 21 y 28 días se observa en los animales desnutridos un aumento en las células OX7+  $\mu$ + en relación a los controles. La proporción de células que expresan IgA se encuentran disminuída tanto en las placas de Peyer como en el ganglio mesentérico de ratas que han sido desnutridas durante la lactancia. Estas alteraciones persisten hasta luego de 30 días de renutrición con dieta comercial. Sin embargo a los 90 días de renutrirlas (120 días de edad) la cantidad de células IgA+ se normaliza. Por el otro lado vemos que los porcentajes de células con IgM en la superficie al principio no difieren, pero luego a los 50 días aumentan respecto de los controles, normalizandose sus valores a los 120 días. Por otro lado las células que expresan cadenas  $\mu$  en el citoplasma se encuentran disminuídas en los animales desnutridos tanto a los 21 como a los 28 días de edad.

**TABLA 16: PORCENTAJE DE CELULAS B QUE EXPRESAN IgM O IgA EN EL GANGLIO MESENTERICO DE RATAS DE 50 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS**

	EXP N°	IgM+ (sμ+)	IgA+ (α+)	IgA+IgM
CONTROLES	1	16.30±1.70** (7)**	15.25±1.26 (5)	30.8±4.0
	2	15.50±2.33 (8)	15.30±3.87 (9)	
	3	17.00±2.00 (5)	15.00±1.22 (5)	
	4	14.50±2.08 (4)	-	
DESNUTRIDOS	1	20.70±2.98 (7)	9.50±0.50 (3)	28.7±3.6
	2	20.25±3.84 (8)	9.80±2.04 (6)	
	3	18.40±0.90 (4)	9.70±2.06 (7)	
	4	20.20±1.92 (5)	9.00±1.70 (6)	
	5	20.10±2.04 (5)	-	
SIGNIFICACION ESTADISTICA		p=0.008	p<0.0001	p=0.15

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue un análisis de la varianza anidado.

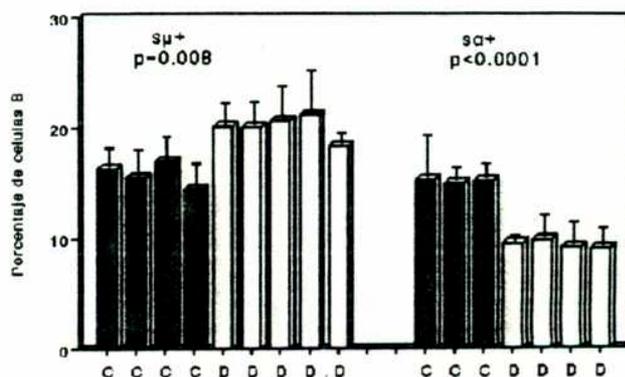


Gráfico 15

TABLA 17: PORCENTAJE DE CELULAS B IgM+ E IgA+ EN LAS PLACAS DE PEYER Y EL GANGLIO MESENTERICO DE RATAS DE 120 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDOS DURANTE LA LACTANCIA

	PLACAS DE PEYER	GANGLIO MESENTERICO	
	IgA+(sα+)	IgM+(sμ+)	IgA+(sα+)
CONTROLES	22.20±2.55* (5)**	14.66±3.88 (5)	16.80±3.16 (5)
DESNUTRIDOS	20.20±4.25 (5)	13.50±4.76 (5)	18.80±2.17 (5)
SIGNIFICACION ESTADISTICA	p=0.43	p=0.6	p=0.23

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre parindican la cantidad de animales utilizados en cada experimento. El test estadístico utilizado fue el t de Student.

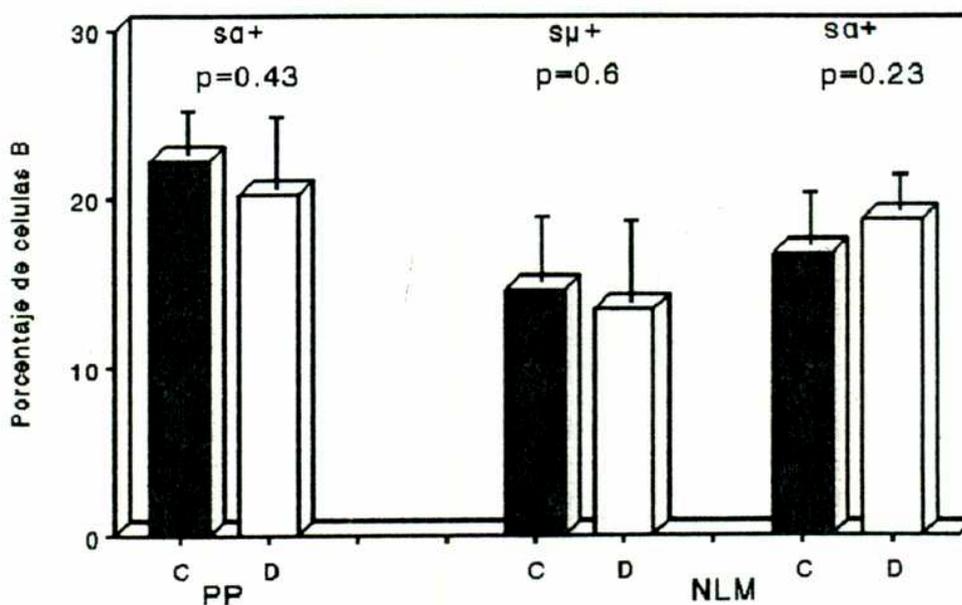


Gráfico 16

**ALTERACIONSE EN LOS NIVELES DE IgA EN EL FLUIDO INTESTINAL Y EN EL SUERO DEBIDAS A LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA.**

**1. Niveles de IgA en el fluido intestinal de ratas controles y desnutridas durante la lactancia.**

En la tabla 18 y en el gráfico 17 se observan las alteraciones sobre los niveles en la IgA total del fluido intestinal en las ratas desnutridas durante la lactancia en relación a los controles de la misma edad. Tanto en los controles como en el grupo experimental hay un aumento relacionado con la edad en la cantidad de IgA del fluido intestinal. En las ratas desnutridas el nivel de IgA es significativamente menor desde el destete hasta los 50 días de edad comparado con los controles de igual edad. A los 120 días el nivel de IgA en el fluido intestinal se normaliza alcanzando los valores de los controles.

**2. Concentración de IgA en el suero de ratas de 21 y 28 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad**

En la tabla 19 y en el gráfico 18 se presentan los resultados obtenidos por ELISA correspondientes a las concentraciones de IgA en el suero de ratas de 21 y 28 días controles y desnutridas durante la lactancia. A diferencia de lo que ocurre en el fluido intestinal en el suero no se observa una disminución de la concentración de IgA.

**TABLA 18: IgA TOTAL EN EL FLUIDO INTESTINAL DE RATAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

EDAD (DIAS)	21	28	50	120
	IgA TOTAL ( $\mu$ g)			
CONTROLES	70.0 $\pm$ 9.9 (6)**	126.3 $\pm$ 18.1 (9)	683.0 $\pm$ 101.0 (14)	780.0 $\pm$ 150 (6)
DESNUTRIDOS	17.4 $\pm$ 7.5 (5)	58.9 $\pm$ 18.4 (11)	480.0 $\pm$ 111.0 (9)	805.0 $\pm$ 213 (6)
SIGNIFICACION ESTADISTICA	p<0.0001	p<0.0001	p<0.001	p=0.6

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.

IgA total en el fluido intestinal de  
ratas controles y desnutridas

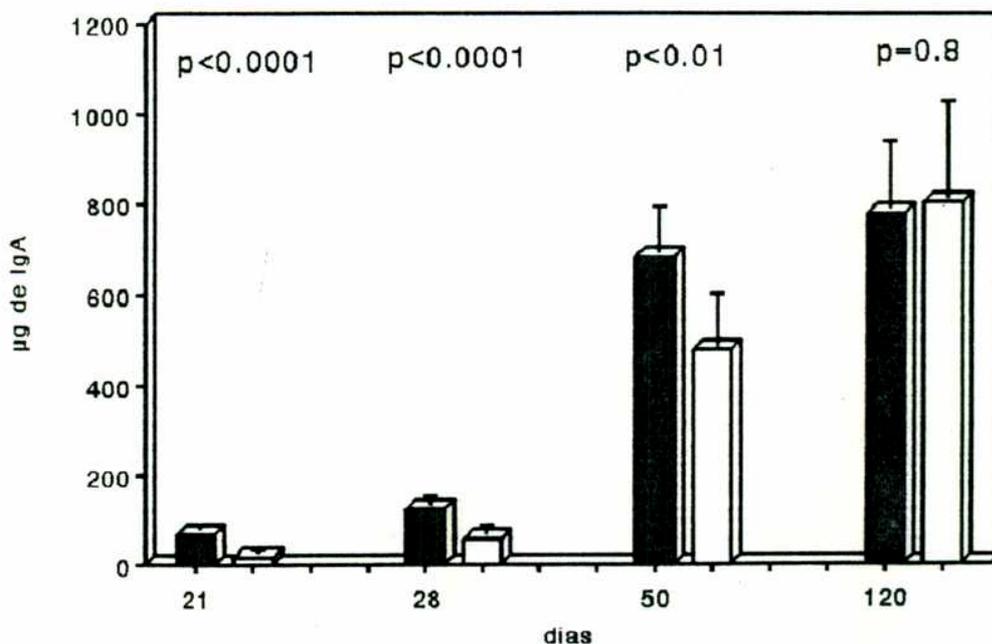


Gráfico 17

**TABLA 19: CONCENTRACION DE IgA EN EL SUERO DE RATAS DE 21 Y 28 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA**

	CONTROLES	DESNUTRIDOS	
	$\mu\text{g/ml}$ de IgA		SIGNIFICACION ESTADISTICA
21 DIAS	$1.284 \pm 0.355$ (6)	$1.339 \pm 0.58$ (6)	NS
28 DIAS	$7.5 \pm 1.7$ (6)	$8.3 \pm 1.8$ (6)	NS

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.

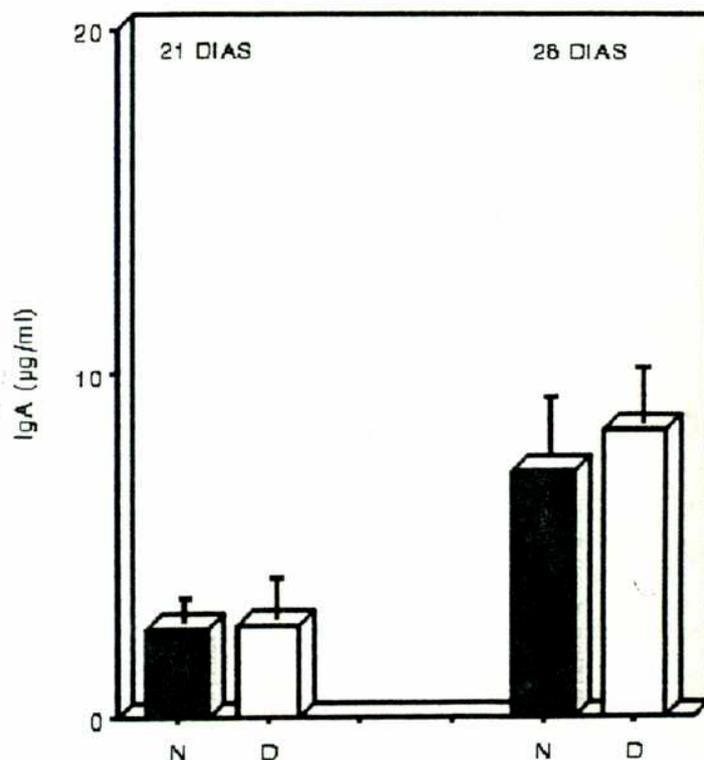


Gráfico 18

**EFFECTOS DE LA DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA SOBRE LA  
CAPACIDAD DE RESPONDER A LA TOXINA COLERICA ADMINISTRADA  
ORALMENTE**

1. Respuesta de anticuerpos séricos hacia la toxina colérica en animales de 50 días desnutridos durante la lactancia y los controles de igual edad.

Cuando se administran tres dosis de toxina colérica por vía oral a partir de los 28 días de edad se observa que los animales desnutridos presentan una respuesta de anticuerpos séricos claramente inferior a los controles. Esta deficiencia en la respuesta esta dada por una disminución en IgG, IgM e IgA ( $p < 0.0001$  en los tres casos). En la Tabla 20 y en el Gráfico 19 se observa los niveles de anticuerpos de las distintas clases en ratas controles y desnutridas. Los datos correponden a por lo menos tres experimentos para cada grupo. Al no encontrarse diferencias significativas entre los mismos los datos son analizados en conjunto. Por otro lado cuando se analiza en cada individuo la relación IgA/IgG en ambos grupos se observa que la misma es superior en los animales desnutridos ( $p = 0.012$ ).

**2. Respuesta de anticuerpos de clase IgA en el fluido intestinal de animales de 50 días desnutridos durante la lactancia y sus controles. Neutralización de la toxina en el test del loop intestinal.**

En el fluido intestinal de las ratas inmunizadas oralmente se encuentra IgA específica contra la toxina colérica, sin embargo esta se encuentra significativamente disminuida en los animales desnutridos durante la lactancia ( $p < 0.001$ ) (Tabla 21).

También se evaluó la actividad biológica de estos anticuerpos a través de su capacidad de neutralizar a la toxina colérica cuando esta se inocula en un loop intestinal. Se ve que en los animales desnutridos la acumulación de líquido en el interior del loop luego de la inoculación de la toxina es igual a la de los animales controles no inmunizados ( $p = 0.289$ ). Por otro lado en las ratas controles inmunizadas hay una disminución significativa del líquido acumulado en el interior del loop cuando se la compara con el control no inmunizado o con las ratas desnutridas inmunizadas ( $p < 0.001$ ). Sin embargo la protección no es total ya que en controles a los cuales en lugar de toxina se les inoculó PBS la acumulación de líquido en el interior del loop intestinal es menor (Tabla 21).

Cuando a los 113 días se administra un reestímulo, y se siete días después analiza el título de anticuerpos anti TC en el

fluído intestinal, también se encuentra disminuída la actividad de anticuerpos IgA contra la TC ( $p=0.001$ )(Tabla 21).

### 3. Análisis del efecto de la toxina colérica sobre los niveles de IgA en el fluído intestinal de ratas normales y desnutridas.

En la tabla 22 se observan como la administración por vía oral de la TC no tiene efecto sobre los niveles de IgA en el fluído intestinal, tanto en los animales de 50 días desnutridos como en los controles de la misma edad.

**TABLA 20: TITULO DE ANTICUERPOS ANTI TOXINA COLERICA EN SUERO DE RATAS DE 50 DIAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

	TITULO DE ANTICUERPOS			RELACION IgA/IgG
	IgM	IgA	IgG	
CONTROLES	6381±10075* (19)**	6909±7341 (22)	371904±398241 (21)	0.03±0.018
DESNUTRIDOS	990±846 (16)	1377±1204 (26)	27500±25099 (23)	0.06±0.04
SIGNIFICACION ESTADISITCA	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p=0.019

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.

**IgA, IgM e IgG ANTI TC EN RATAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DE 50 DIAS**

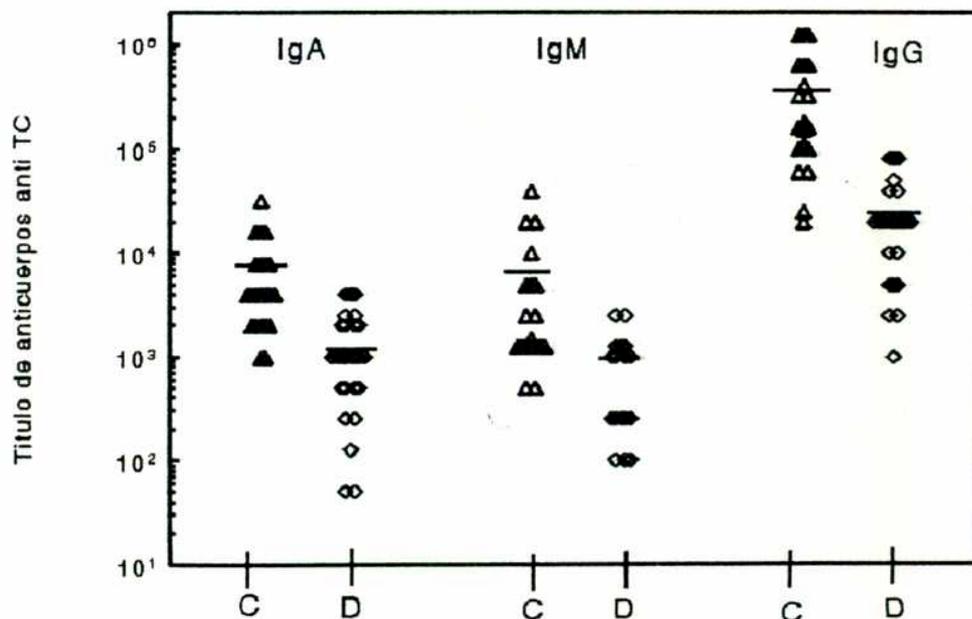


Gráfico 19

**TABLA 21: IgA TOTAL EN EL FLUIDO INTESTINAL DE RATAS DE 50 DIAS DESNUTRIDAS Y SUS CONTROLES INMUNIZADAS Y NO INMUNIZADAS CON TC.**

	MICROGRAMOS DE IgA TOTAL EN EL FLUIDO INTESTINAL		SIGNIFICACION ESTADISITCA
	NO INMUNIZADOS	INMUNIZADOS CON TC	
NORMALES	697.6±88.39* (5)**	666.15±115.8 (10)	NS
DESNUTRIDOS	476.00±81.34 (5)	484.00±140.36 (5)	NS
SIGNIFICACION ESTADISITCA	p<0.001	p<0.001	INTERACCION NS

\* Los valores representan la media y el desvío standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican el número de animales utilizado.

El test estadístico empleado fue un análisis de la varianza de dos factores. Para los contrastes se utilizó el test de Tukey-Krammer.

**TABLA 22: TITULOS DE IgA ANTI TC EN FLUIDO INTESTINAL Y PROTECCION EN EL TEST DE LOOP INTESTINAL (TLI), EN RATAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

EDAD		TITULO DE IgA	TLI (mg/cm)
	CONTROLES NO INMUNIZADOS	-	0.34±0.035
50 DIAS	CONTROLES INMUNIZADOS	1800±1179 (6)	0.22±0.021 <sup>1</sup>
	DESNUTRIDOS INMUNIZADOS	≤100 (6)	0.31±0.019 <sup>2</sup>
120 DIAS	CONTROLES INMUNIZADOS	640±219 (6)	-
	DESNUTRIDOS INMUNIZADOS	130±67 (6)	-

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados.

<sup>1</sup>p<0.001 cuando se compara con el control no inmunizado

<sup>2</sup>p=0.289 cuando se compara con el control no inmunizado. Para la comparación entre varias medias se realizó un anova de un factor y para los contrastes el test de Tukey.

#### 4. Respuesta de anticuerpos séricos específicos hacia la toxina colérica en ratas de 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles de igual edad.

Para evaluar la capacidad de generar una respuesta de memoria, a un grupo de animales desnutridos durante la lactancia y a sus controles que habían recibido tres dosis de TC se les administró un reestímulo a los 113 días de edad. La respuesta de anticuerpos evaluada 7 días después, en las ratas desnutridas se encontró claramente disminuída. (Tabla 23, Gráfico 20). Prácticamente no hubo respuesta de clase IgM. También la respuesta de anticuerpos de clase IgG fue extremadamente baja en relación al control ( $p < 0.0001$ ). Si bien los anticuerpos IgA específicos hacia la TC también estuvieron significativamente disminuídos ( $p < 0.0001$ ), su decrecimiento no fue tan agudo como para las otras dos clases. Por otro lado la relación IgA/IgG en las ratas del grupo desnutrido fue superior a la del grupo control ( $p < 0.05$ ).

**TABLA 23: TITULO DE ANTICUERPOS EN SUERO DE RATAS DE 120 DIAS  
CONTROLES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

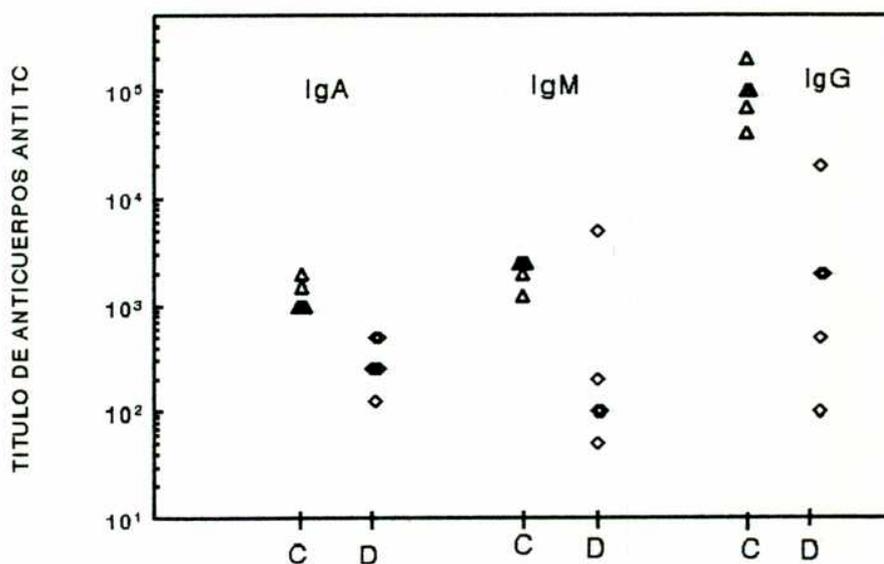
	TITULO DE ANTICUERPOS			RELACION IgA/IgG
	IgM	IgA	IgG	
CONTROLES	2250±559* (5)**	1200±447 (5)	102000±6016 6 (5)	0.014±0.07
DESNUTRIDOS	1 (5)+	286±157 (7)	4920±8473 (5)	0.22±0.2
SIGNIFICACION ESTADISTICA		p<0.0001	p<0.0001	p<0.05

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis significan la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.

+Respondió un animal de 5.

**ANTICUERPOS ANTI TC EN SUERO DE RATAS  
NORMALES Y DESNUTRIDAS DE 120 DIAS**



**Gráfico 20**

**5. Anticuerpos anti TC en los sobrenadantes del cultivo de células del ganglio mesentérico de ratas de 50 y 120 días desnutridas durante la lactancia y sus controles.**

Cuando se analizó el sobrenadante del cultivo de células de ganglio mesentérico de ratas de 50 días que habían recibido tres dosis de TC se encontró que la actividad de anticuerpos anti TC estaba claramente disminuída en las ratas desnutridas durante la lactancia (Tabla 24 y Gráfico 21). Esta alteración se manifestó tanto en los niveles de IgG ( $p < 0.0001$ ) como de IgA ( $p = 0.012$ ). Cuando se analizaron los sobrenadantes del cultivo de células del ganglio mesentérico de ratas de 120 días inmunizadas con tres dosis de TC y que recibieron un reestímulo una semana antes de procesarlas, se encontró que tanto la respuesta de IgG como de IgA anti toxina colérica estaban disminuídas en las ratas que habían sido desnutridas ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.04$  respectivamente). Sin embargo las alteraciones en la respuesta de anticuerpos de clase IgA pareció menos afectada que la de IgG cuando se compara con el control. Por otro lado la relación IgA/IgG tanto a los 50 como a los 120 días fue mayor en los animales desnutridos que en los controles.

**6. Respuesta de anticuerpos anti toxina colérica en ratas desnutridas durante la lactancia y controles inmunizadas a partir del día 50 de edad.**

Para determinar la importancia que tiene el tiempo de renutrición previo a la administración de la primera dosis de toxina esta se inoculó luego de un mes de alimentación con dieta comercial tanto a los animales desnutridos como a los controles. La respuesta de anticuerpos IgG a nivel sérico en las ratas desnutridas no presentó diferencias significativas con sus controles ( $p=0.8$ ) (Tabla 25 y Gráfico 22). En el fluido intestinal tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el control en la respuesta de anticuerpos IgA ( $p=0.07$ ) aunque se pudo observar que la respuesta si bien en gran medida se recompuso permaneció en alguna medida disminuída. En los sobrenadantes de los cultivos de células de ganglio mesentérico la actividad de anticuerpos anti TC de clase IgG e IgA fue en el grupo de animales desnutridos similar al control ( $p=0.6$  y  $p=0.8$  respectivamente)(Tabla 26 y Gráfico 23).

**TABLA 24: TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI TOXINA COLERICA EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE CELULAS DE GANGLIO MESENTERICO DE RATAS NORMALES Y DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.**

EDAD		NORMALES	DESNUTRIDOS	SIGNIFICACION ESTADISTICA
50 DIAS	TITULO de IgA	8±5* (5)**	≤2 (5)	p=0.012
	TITULO de IgG	50±40 (5)	3±1 (5)	p<0.0001
	IgA/IgG	0.15±0.056	0.475±0.335	p<0.05
120 DIAS	TITULO de IgA	6±3 (5)	≤2 (5)	p<0.05
	TITULO de IgG	30±22 (5)	≤2 (5)	p<0.0001
	IgA/IgG	0.363±0.396	1.8±0.427	p=0.001

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican el número de animales utilizado en cada experimento. Cada cultivo se realizó por triplicado para cada animal y se utilizó la media. El test estadístico utilizado fue el t de Student.

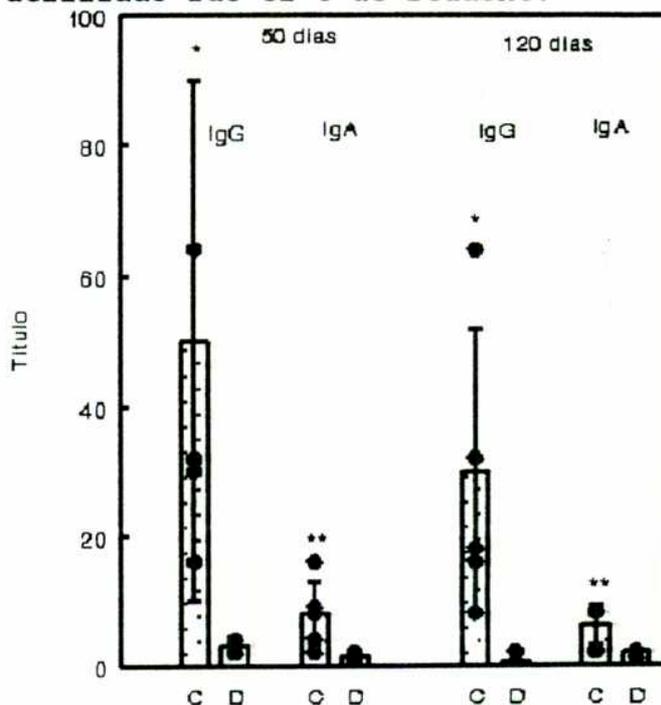


Gráfico 21

**TABLA 25: TITULO DE ANTICUERPOS ANTI TOXINA COLERICA EN SUERO DE ANIMALES NORMALES Y DESNUTRIDOS INMUNIZADOS A PARTIR DE LOS 50 DIAS DE EDAD**

TITULO	IgG	IgM	IgA
CONTROLES	1056000±659302* (5)**	5400±3577 (5)	8800±7014 (5)
DESNUTRIDOS	860000±528469 (5)	4000±2449 (5)	5600±5900 (5)
SIGNIFICACION ESTADISTICA	p=0.8	p=0.49	p=0.45

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.  
 \*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.

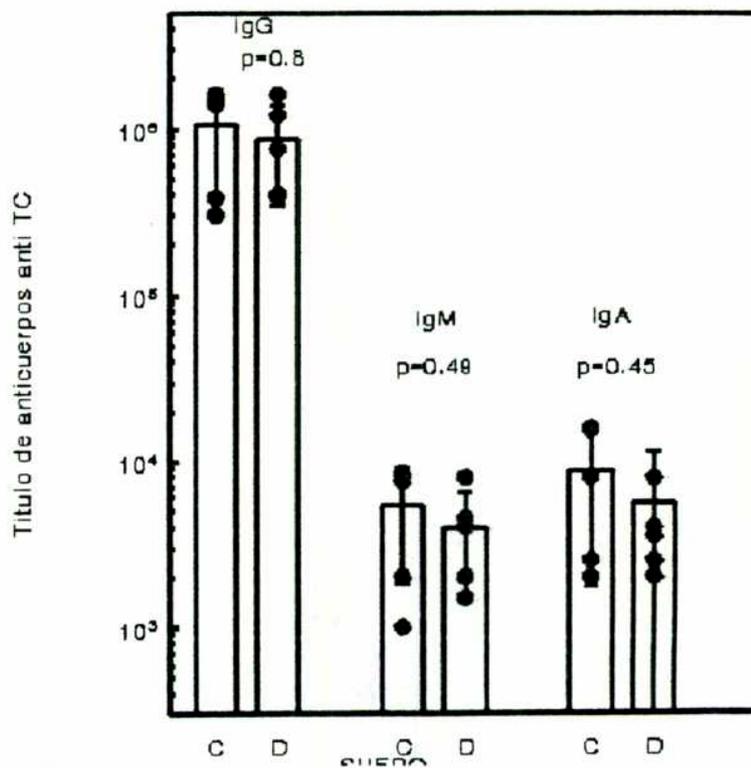


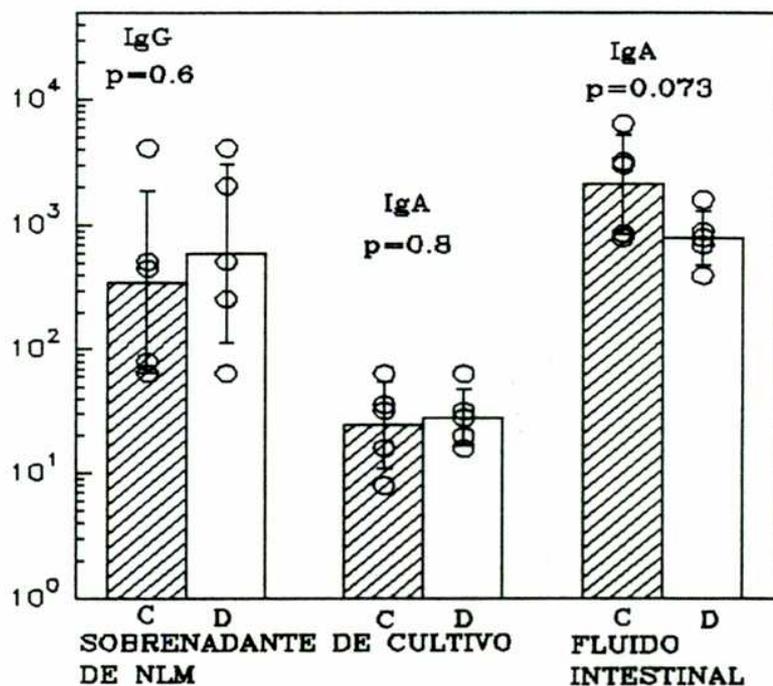
Gráfico 22

**TABLA 26: TITULO DE ANTICUERPOS ANTI TOXINA COLERICA EN FLUIDO INTESTINAL Y SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE GLM DE ANIMALES NORMALES Y DESNUTRIDOS INMUNIZADOS A PARTIR DE LOS 50 DIAS DE EDAD**

	FLUIDO	SOBRENADANTE DE CULTIVO DE GLM	
	IgA	IgG	IgA
CONTROLES	2880±2304* (5)**	1050±1717 (5)	30±23 (5)
DESNUTRIDOS	880±440 (5)	1395±1700 (5)	30±21 (5)
SIGNIFICACION ESTADISTICA	p=0.073	p=0.62	p=0.8

\* Cada valor representa la media y la desviación standard.

\*\*Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales utilizados. El test estadístico empleado fue el t de Student.



**Gráfico 23:** Las barras representan las medias geométricas de 5 datos.

7. Resumen de las consecuencias que la desnutrición durante la lactancia tiene sobre la respuesta específica hacia la toxina colérica.

En ratas desnutridas durante la lactancia inmunizadas luego de una semana de renutrición con pellet comercial, la respuesta de anticuerpos específicos contra la TC se ve seriamente afectada. Los anticuerpos en el suero están disminuidos en todas las clases ensayadas (IgM, IgG e IgA). En el fluido intestinal la actividad de anticuerpos IgA anti TC también esta claramente disminuída. Cuando se determina la capacidad de neutralizar a la toxina en loops intestinal se vió que en las ratas desnutridas no había capacidad de neutralización. Cuando se estudió la capacidad que tenían las células del ganglio mesentérico de producir anticuerpos anti TC en cultivos de siete días, se vio que la misma estaba disminuída en los animales desnutridos. Al administrar un reestímulo antigénico dos meses después de terminado el primer esquema de inmunización y al estudiar la respuesta de anticuerpos se encontró que esta estaba disminuída tanto en suero como en el fluido intestinal. Lo mismo ocurrió en los cultivos. En general la relación IgA/IgG fue mayor en los animales desnutridos que en los controles.

Al administrar la TC luego de un mes de renutrición la respuesta en suero y en cultivo de células de ganglio mesentérico fue similar a la de los controles. En el fluido

intestinal la respuesta de IgA se recuperó aunque siguió levemente disminuída.

#### ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AMAMANTAMIENTO EN EL SISTEMA INMUNE DE LAS CRIAS.

##### 1. Transferencia de células con actividad anti toxina colérica a través de la leche.

En la tabla 27 se observan los resultados del análisis de la actividad de anticuerpos anti toxina en el sobrenadante del cultivo de células de ganglio mesentérico de ratas de 21 días con una desnutrición severa (23 grs. de peso promedio) y con una desnutrición intermedia (32 grs. de peso) y de los controles, que habían sido amamantadas por madres inmunizadas con toxina colérica por vía oral y por madres sin inmunizar. En el sobrenadante del cultivo de células provenientes de crías severamente desnutridas amamantadas por madres inmunizadas se observó por ELISA la presencia de anticuerpos de clase IgG, y en menor medida de clase IgM e IgA. En los sobrenadantes de cultivo de células provenientes de crías con una desnutrición intermedia se observó actividad anti TC pero menor que en el grupo mencionado anteriormente. Por último en los sobrenadantes de cultivo de células de animales controles amamantados por madres inmunizadas y sin inmunizar no se observó actividad anti TC.

**TABLA 27: TRANSFERENCIA DE CELULAS CON ACTIVIDAD ANTI TC A TRAVES DE LA LECHE**

TITULO DE ANTICUERPOS ANTI TC EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO DE GM DE RATAS DE 21 DIAS			
	IgG	IgM	IgA
<b>MADRE NORMAL</b>			
Cría Normal 1	S/T	S/T	S/T
Cría Normal 2	S/T	S/T	S/T
<b>MADRE INMUNIZADA 1</b>			
Cría normal 1	S/T	S/T	S/T
Cría normal 2	S/T	S/T	S/T
<b>MADRE INMUNIZADA 2</b>			
Cría desnutrida 1 (32 grs.)	1	S/T	S/T
Cría desnutrida 2 (32.5 grs)	2	S/T	S/T
<b>MADRE INMUNIZADA 3</b>			
Cría desnutrida 1 (24 grs)	2	S/T	S/T
Cría desnutrida 2 (22 grs.)	4	1	1
Cría desnutrida 3 (21 grs)	2	1	S/T
Cría desnutrida 4 (26 grs)	4	1	1
Cría desnutrida 5 (27 grs)	4	1	1

S/T (sin título)

## **2. Estudio de la cinética de anticuerpos IgG en ratas con una desnutrición severa durante la lactancia y sus controles**

A un grupo de ratas que a los 21 días tenían un peso menor (22 grs.) que la media del grupo de ratas desnutridas, se les administró tres dosis de TC tal cual fue descrito y se les siguió la respuesta individualmente sangrandolas a los 113 días (antes de reestimarlas) y a los 120 días (una semana después del reestímulo). Lo mismo se hizo con un lote de ratas controles. Se encontró que a los 50 días los títulos de IgG anti TC en el suero fueron superiores a la media de los títulos obtenidos en las ratas desnutridas. A los 113 días (70 días después de la última dosis) tanto en los controles como en los desnutridos el nivel de anticuerpos anti TC en el suero disminuye siendo prácticamente nulo en los animales desnutridos. Luego de reestimarlos el nivel de anticuerpos IgG específicos en suero aumenta en forma significativa en los controles, mientras que en el grupo de animales desnutridos la respuesta continuó siendo baja (Gráfico 24).

CINETICA EN SUERO DE LA RESPUESTA HACIA LA TOXINA COLERICA EN ANIMALES NORMALES Y SEVERAMENTE DESNUTRIDOS.

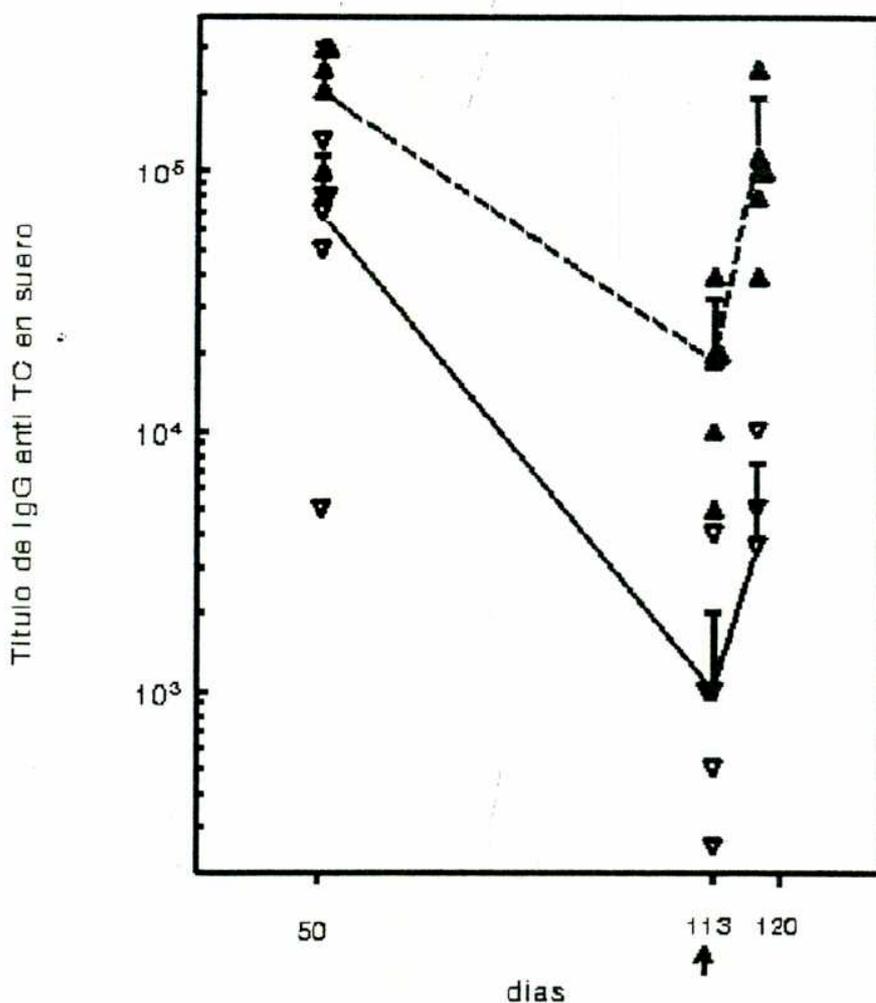


Gráfico 24

A ratas normales y desnutridas severas se les administró tres dosis de toxina colérica a partir del día 28 de edad. A los 50, 113 y 120 días se las sangró para medir la respuesta de anticuerpos IgG en suero. Los símbolos llenos representan a los animales normales y los vacíos a los desnutridos. La flecha indica el momento del reestímulo. Las líneas verticales representan los desvíos estándar

## DISCUSSION

En este trabajo nos hemos propuesto estudiar los efectos que tiene sobre la maduración de los tejidos linfoides asociados al intestino una desnutrición severa durante la lactancia. Estas áreas inmunocompetentes son de vital importancia en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva capaz de evitar la acción de patógenos o sus toxinas. Allí es donde van a comenzar los procesos de inducción de la respuesta a través de la presentación del antígeno y la activación de los correspondientes clones de células B y T. A diferencia de otros lugares del sistema inmune, en estas áreas no se va a desarrollar la respuesta efectora. Serán necesario procesos de migración de las células B y T activadas a las distintas áreas efectoras del sistema de mucosas (principalmente la lamina propria del intestino delgado). Todo este conjunto de procesos está regulado por una serie de mecanismos en los que intervienen varias poblaciones celulares heterogéneas, así como gran cantidad de mediadores químicos producidos por estas. Las alteraciones que se producen en los mecanismos regulatorios y de

maduración de este sistema cuando se produce una desnutrición debida a una serie de carencias nutricionales son varias y de una gran complejidad. Cada una de estas inmunodeficiencias puede ser causada por uno o múltiples factores que intervienen directamente en el proceso que se está visualizando o pueden intervenir en etapas tempranas que al verse afectadas generan consecuencias en procesos posteriores.

A su vez cuando la desnutrición se produce cuando hay aún una relación con la madre a través de la lactancia se suman una serie nueva de elementos a tener en cuenta como es la regulación que ejerce la leche materna con todos los componentes inmunocompetentes que esta posee sobre el desarrollo del sistema inmune del neonato.

Se ha descrito que la desnutrición genera una serie de inmunodeficiencias principalmente en todas las áreas relacionadas con el timo (Watts, 1969; Baisel, 1984). También se ha visto que el efecto es mas relevante en el sistema inmune asociado a las mucosas (Chandra, 1984). Por otro lado es muy importante el período en que la desnutrición se ha desarrollado, en la medida que se produzca durante las etapas mas tempranas del desarrollo, más permanentes serán sus efectos (Chandra, 1983b). En el modelo de desnutrición que se ha empleado en éste trabajo se ven afectados los primeros pasos en la diferenciación celular. El peso de diversos órganos se encuentra disminuído en forma permanente entre

ellos el timo y el bazo (Winnick and Noble, 1966). El número de células también está sumamente afectado y no se recupera aún cuando el animal es adulto (Winnick and Noble, 1966). Algunos marcadores de células T maduras se encuentran disminuidos en el timo. (Slobodianik et al., 1991). En médula ósea de ratas sometidas a este tipo de desnutrición se ha visto un retardo en la división celular y en la proporción de células que entran en el ciclo de división, (Ortiz and Betancourt, 1984; 1992) lo que genera la consecuente disminución en las células que van a poblar los órganos linfoides secundarios.

Los resultados presentados en este trabajo confirman lo antes expuesto. Hemos encontrado que la desnutrición durante la lactancia provoca una pérdida muy importante del peso corporal al momento del destete (50 % del peso en relación a los controles). Esta alteración permanece durante todo el período en que se realizó el estudio, si bien en el animal adulto hay una recuperación importante del peso. El número de células recuperadas de las placas de Peyer y del ganglio mesentérico también permanece afectado durante el período de desarrollo del animal. Al destete las ratas que han sido desnutridas prácticamente no presentan placas de Peyer (3 a 5 en todo el intestino) y su tamaño está sumamente reducido. El ganglio mesentérico si bien no está tan disminuido en tamaño si lo está en su celularidad. Estos resultados nos

están indicando una detención en la proliferación celular, la cual puede tener origen en la médula de acuerdo a lo descrito por otros (Ortiz and Betancourt, 1984, 1992). Sorprendentemente cuando estudiamos la expresión de distintos marcadores en las células de las PP y del GLM nos encontramos con que al destete el porcentaje de células que expresan marcadores presentes en células T maduras no presenta diferencias con el control. Inclusive se observa que en las placas de Peyer el porcentaje de células CD5+ esta levemente aumentado en los animales desnutridos. Luego de una semana de renutrición con dieta comercial en los controles hay un aumento importante en los porcentajes de células CD5+, CD4+ y CD8+ en las placas de Peyer y en el ganglio mesentérico, mientras que en las ratas desnutridas durante la lactancia estos porcentajes no aumentan. Este resultado a primera vista inesperado puede deberse a la contribución de células de la madre a través de la lactancia. La presencia de linfocitos en calostro y en leche ha sido confirmada en humanos (Smith C.W. et al., 1968; Diaz-Juanan et al., 1974; Parmely M.J. et al., 1976) y en animales incluyendo ratas (Beer A.E., 1975) Estas células son en un 90 % macrófagos y el 10 % restante linfocitos principalmente linfocitos T (Pamerly, 1976, Crago S.S. et al., 1979). Varias investigaciones han demostrado la capacidad de estas células de responder frente mitógenos in vitro (Smith C.W. et al., 1968; Diaz-Juanan et al., 1974) y de sintetizar anticuerpos de clase IgA (Goldbum R.M., 1975).

Estudios hechos en rata demuestran que el 45% de los linfocitos son OX19+ (CD5+), el 35% son W3/25+ (CD4+) y el 34% son OX8+ (CD8+) de los cuales el 21% son OX8+OX19- (Na H.R. et al., 1992). Ensayos de proliferación celular indican que parte de estos linfocitos proliferan al ser estimulados in vitro por antígenos bacterianos habituales en el intestino. No está claro el significado funcional de las células de la leche. Hay observaciones que indican que en la rata el amamantamiento puede ocasionar una inmunización adoptiva y en cierto contexto genético llevar a una reacción de injerto versus huesped (Beer, 1975)

Esto sugiere que las células de la leche pueden penetrar por las paredes del tubo digestivo y colonizar al neonato. Estudios de las condiciones fisicoquímicas del contenido estomacal en las ratas lactantes así como de otros animales indican que el ambiente permitiría la supervivencia de las células (Boass and Willson, 1963; Luckey et al., 1954; Mason, 1962). Para demostrar que esta transferencia existe se han realizado varios experimentos. Estudios en ratón en los cuales se administraron oralmente células viables marcadas con fluoresceína indican que alrededor del 0.1% de las células ingeridas penetran en el lactante, las cuales serían funcionales durante algunas semanas (Weiler J.I. et al.; 1983). En otros trabajos por otro lado no se ha logrado demostrar el pasaje de las células (Trentin J.J. et al. 1977).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo podrían explicarse por una contribución de células maternas a las crías, las cuales contribuyen a aumentar el número de células que expresan marcadores de linfocitos maduros. Como los animales desnutridos tienen un número de células significativamente menor que los controles, el posible aporte hecho por la madre a través de la leche tiene una significación mayor en aquellas ratas que en las normales. Se podría pensar en contra de esto que así como hay menos células también hay una contribución menor por parte de la madre en los animales desnutridos ya que estos ingieren menos leche. Ya que parece que el número de células que ingresan a la cría a través del tracto digestivo es sólo una pequeña proporción del total ingerido, es posible pensar que hay una regulación de este fenómeno de tal manera que la cantidad de células ingeridas por los animales desnutridos son suficientes para mantener el nivel de incorporación de células descrito en animales normales. Estudios sobre la maduración del intestino delgado en ratas hipotímicas recién destetadas muestran que estas poseen en la lamina propia un número incrementado de células que expresan el receptor para IL-2 (células activadas) (Cummins A.G. et al., 1990). La explicación que los autores dan a este fenómeno es un posible injerto de células de la madre que se han activado en el intestino del lactante. Con el modelo de desnutrición que se ha utilizado en el presente trabajo nos encontramos con ratas

que se han transformado en hipotímicas (el peso del timo en estas ratas al destete es menos de un tercio de los controles). Esta inmadurez del timo lleva a un retardo en el desarrollo del sistema inmune. Como se ha planteado que el injerto de células maternas es activamente rechazado cuando madura el sistema inmune de la cría (Weiler I.J. et al., 1981), consecuentemente es posible que en estas condiciones se retarde el rechazo de las células maternas contribuyendo de esta manera durante un período mas prolongado al sistema inmune de las crías.

Para comprobar esto, inmunizamos con TC hembras adultas antes de aparearlas y durante la preñez. A algunas de estas hembras se les colocó 16 crías para realizar la desnutrición, otras fueron utilizadas para criar un número normal de crías y por último a otra se les pusieron 13 crías para obtener una desnutrición moderada. Luego se realizaron cultivos de siete días de células del ganglio mesentérico de las crías de 21 días. Al analizar por ELISA los sobrenadantes encontramos que en todos los cultivos de los animales con desnutrición severa había anticuerpos IgG con actividad anti toxina y 3 de 5 presentaban anticuerpos de clase IgM y de clase IgA. En los sobrenadantes de los cultivos de ganglio mesentérico de ratas normales amamantados por madres inmunizadas no se encontraron anticuerpos anti TC de ninguna de las tres clases ensayadas (valores de densidad óptica iguales a los de crías amamantadas por madres no inmunizadas), mientras que en los

cultivos correspondientes a las crías con desnutrición moderada se encontraron anticuerpos anti TC de clase IgG pero en menor cantidad que en los de desnutridos severos. Estos resultados claramente están demostrando la transferencia de células de la madre a través de la leche. A su vez la ausencia de evidencias que demuestren este pasaje en las crías normales puede deberse a las razones ya mencionadas: 1) por un lado un rechazo activo por parte del sistema inmune de la cría de las células de la madre, mientras que los desnutridos al ser inmunodeficientes no están en condiciones de realizarlo y 2) como todos los cultivos se realizaron con el mismo número de células y en los desnutridos el número de células por órgano es mucho menor, la proporción de células provenientes de la madre es mayor en estos que en los normales.

La migración de células del ganglio mesentérico a la glándula mamaria esta bajo control hormonal (Weisz-Carrington et al., 1978), ocurriendo principalmente durante el embarazo y la lactancia (Brandtzaeg, 1983; Wiesz-Carrington, 1977). Se ha descrito que las células que migran ya estan determinadas a producir IgA (Roux et al., 1977; Phillips-Quagliata and Lamm, 1989). Nuestros resultados indican que también hay migración de células productoras de IgG e IgM e inclusive sugieren que estas son más que las productoras de IgA. Sin embargo es probable que las células determinadas a producir IgA anti TC, transferidas a la cría hayan migrado a la lámina

propria del intestino delgado que es el lugar donde van a transformarse en células productoras de anticuerpos. Por otro lado las células que producen IgG entrarían en la circulación general y por lo tanto son detectadas en el ganglio mesentérico el cual recibe el drenaje de las placas de Peyer y de la circulación sistémica.

Con respecto a la migración de las células T a la glándula mamaria hay más confusión, siendo posible que mientras que las células plasmáticas son derivadas casi exclusivamente de las PP y del GM, las células T puedan provenir además de los ganglios linfáticos periféricos (Manning and Parmely, 1980).

En el ganglio mesentérico de ratas de 28 días de edad, desnutridas durante la lactancia, nos encontramos con un porcentaje muy alto de células que expresan el marcador Thy1.1 En ratas este marcador se encuentra expresado en las células de médula osea desde la pluripotencial (Stem cell) (Hale M.L. et al. 1987) hasta los estadios pre-B (Opstelten et al., 1986). En el timo también está presente expresándose en los estadios tempranos del desarrollo, en los timocitos corticales y medulares, perdiéndose antes de que las células salgan para poblar los órganos periféricos (Goldschneider, 1982). En las ratas controles encontramos que a los 21 días alrededor del 20 % de las células del ganglio mesentérico expresan este marcador, mientras que a los 28 días disminuye al 12%. Estos datos son coincidentes con los mencionados por

otros para el bazo en ratas de esas edades (Ritter M.A. et al.; 1978). En las ratas desnutridas el porcentaje encontrado a los 21 días es semejante al de los controles, sin embargo a los 28 días no disminuye, manteniéndose en alrededor de un 20%. Este marcador asociado a la presencia de cadena  $\mu$  citoplasmática caracteriza a las células pre B (Hunt S.V., 1979; Crawford J.M. and Goldschneider I., 1980) y asociado a la enzima TdT en el núcleo caracteriza a células pre T (Goldschneider, 1982). En otro modelo de desnutrición en ratas durante etapas tempranas del desarrollo se han encontrado células Thy1.1+ y  $c\mu$ + en las placas de Peyer (Lopez M.C. and Roux M.E., 1989). También se ha encontrado en niños desnutridos y en modelos experimentales de desnutrición temprana por dieta libre de proteínas (Chandra, 1984; Melton and Roux, 1989) células T inmaduras (TdT+). Nuestros resultados indican que en los animales desnutridos hay una migración de células inmaduras desde médula osea hacia el ganglio mesentérico observándose como consecuencia de ello células pre-B en esta zona a los 21 y 28 días. Posiblemente la diferencia de células Thy1.1+ en los animales desnutridos en relación a los normales, que no son  $c\mu$ + sean células pre-T (Thy1.1+ TdT+) que migran desde el timo. Que a los 21 días no haya diferencias entre el grupo experimental y los controles en el porcentaje de todas las células que expresan Thy1.1 posiblemente este indicando la inmadurez natural que tiene el sistema inmune a esa edad. Cuando se produce el

destete y comienza una maduración acelerada (Cummins, 1988), los tejidos linfoides de los animales controles se pueblan de células maduras mientras que en los desnutridos permanecerían células inmaduras y llegarían de los órganos linfoides centrales nuevas células también inmaduras, ya que el número total de estas en el órgano aumenta sustancialmente.

Luego de un tiempo prolongado de renutrición ( 1 a 3 meses) la deficiencia en células T totales y CD4+ en el tejido linfoide asociado al intestino se mantiene. Las alteraciones observadas en las PP y en GLM correlacionan con lo encontrado por otros en el timo en el mismo modelo de desnutrición, en donde se ha visto una disminución en las células reconocidas por el monoclonal W3/13, el cual marca células T maduras. (Slobodianik N. et al., 1991). El timo es uno de los órganos más afectados por la desnutrición. Se ha descrito que las células tímicas son sensibles a la presencia elevada de glucocorticoides (van Vliet et al., 1986). Durante la desnutrición éstos se encuentran aumentados en el suero (Alleyne, 1966). Que la reversión del daño provocado por la desnutrición no sea completo posiblemente sea debido al período en que ésta ocurre. Las alteraciones provocadas en el timo durante etapas tempranas del desarrollo posiblemente sean permanentes. Se ha descrito en ratas alimentadas desde el nacimiento con leche deficiente en ácidos grasos, alteraciones en el desarrollo del timo, las

cuales se manifiestan en el peso y número de células de este órgano, así como en la capacidad de proliferación que tienen las células T del timo y del bazo cuando se las cultiva con mitógenos, aún cuando provengan de animales que han sido alimentados por más de 20 días con dieta comercial (Dvorak and Stepankova, 1992). En un modelo de desnutrición a partir del destete, generada por una dieta libre de proteínas también se ha observado una detención en la maduración de las células linfoides del timo trayendo como consecuencia un incremento de células W3/13- TdT+ y una disminución de las células OX7+ TdT+ y de las W3/13+ TdT+ (Melton and Roux, 1989). En el ganglio mesentérico se reflejan estas alteraciones del timo como una disminución de las células W3/13+ y CD5+ la cual permanece luego de 21 días de renutrición con caseína al 20% en niveles semejantes a los encontrados por nosotros (60 % de células CD5+ en los controles versus 42% en los desnutridos) (Melton et. al., 1989; Lopez et al., 1987)

El análisis de las células B en las ratas controles y desnutridas nos está indicando que esta desnutrición provoca en las PP y en el GLM una evidente disminución de las células que expresan IgA en la membrana. Esta alteración se detecta claramente a los 28 días de edad, y continúa hasta más de un mes después de iniciado el período de renutrición con dieta comercial. En las ratas de 50 días (un mes de renutrición)

conjuntamente con esto hay un aumento en el porcentaje de células de las PP y del GLM que expresan IgM en la membrana, mientras que a los 28 días no se observan diferencias entre controles y desnutridos en el porcentaje de células perteneciente a esta población celular. Tomando estos datos en conjunto podemos pensar que en las ratas desnutridas hay un retardo en la maduración de las células B. Los resultados correspondientes a las células IgM+ observados a los 28 días nos pueden estar indicando que mientras que en los controles de 28 días hay un pasaje de células con IgM en membrana a células con IgA, en los desnutridos recién está ocurriendo el pasaje de células pre-B (Thy-1+  $\mu$ +) a células IgM+. A su vez cuando vemos los resultados de las ratas de 50 días observamos que en los controles el pasaje a IgA ya ocurrió, provocado por una serie de factores , mientras que en los desnutridos se acumulan células IgM+ debido posiblemente a un pasaje más lento a IgA+ que en los controles. Mientras que a los 28 días se podría estar detectando inmadurez del linaje B en estadíos previos a la intervención de las células T, a los 50 días la inmadurez que persiste involucra pasos que dependen de la presencia de células T. Por otro lado si sumamos los porcentaje de células que expresan IgM o IgA en los controles y en los desnutridos nos encontramos que no hay diferencias entre ambos grupos. Esto estaría apoyando la idea que la principal dificultad que persiste luego de un mes de alimentación con dieta comercial se encuentra en el pasaje de

células IgM<sup>+</sup> a células IgA<sup>+</sup> y no en pasos previos de la maduración. Una posible explicación a estos resultados es que a los 50 días el switch de células IgM<sup>+</sup> a células IgA<sup>+</sup> permanece alterado. Las células CD4<sup>+</sup> a través de citoquinas juegan un rol fundamental en este proceso (Coffman R.L. et al., 1989, Sonoda E. et al., 1992) en el microambiente de las placas de Peyer (Weinstein P.D. et al., 1991), por consiguiente una disminución de aquellas, como se ha encontrado en el presente modelo a lo largo de las etapas tempranas del desarrollo del sistema inmune, podría retardar el pasaje de las células IgM<sup>+</sup> a células IgA<sup>+</sup>. Estas observaciones coinciden con lo encontrado en otros modelos de desnutrición (Roux and Lopez, 1987) así como en trabajos sobre desnutrición en humanos (Chandra, 1983b). A los 120 días (tres meses de renutrición) sin embargo, los porcentajes de células que expresan IgM o IgA en las PP y en el GLM en las ratas desnutridas es semejante al de los controles. Esto ocurre a pesar de que las células T todavía están disminuídas. Parece por lo tanto que una reducción del 30% (que es lo observado por nosotros) en las poblaciones de células T si bien puede retardar el proceso de maduración de las células B no lo impide y luego de un período mas prolongado se alcanzan los valores de los controles. A esta edad también se ha recuperado el número total de células lo que indica que en general el animal está alcanzando parámetros de normalidad.

Otra de las alteraciones que se observaron en los animales desnutridos fue el nivel de IgA en el fluido intestinal. Para expresar los resultados en masa ( $\mu\text{g}$ ) se construyó una curva standard con IgA de rata proveniente de mieloma. Cabe destacar que el comportamiento de la IgA en el ELISA es distinto según que esta sea monomérica o polimérica y que posea o no componente secretor (Tsuji and Reen, 1990) por lo tanto puede ser cuestionable haber contruido una curva standard con IgAm para medir IgA total en fluido intestinal (la cual es polimérica y está asociada al componente secretor). En nuestros experimentos se observó esta diferencia de comportamiento en el ELISA entre la IgA proveniente del fluido intestinal, con la curva standard y la IgA proveniente de suero. En todos los casos se intentó tomar la zona de las curvas que fueran paralelas, sin embargo esto no siempre fue posible, con lo cual es probable que en valores absolutos los  $\mu\text{g}$  obtenidos no se ajusten exactamente a la realidad. En la bibliografía se encuentran variaciones en la cantidad de IgA en el fluido intestinal de ratones que varía en más de cinco veces de un resultado a otro según los autores (Lim et al., 1981; Elson, 1984; van der Heijden et al., 1988; McGee and McMurray, 1988) dependiendo el método usado en el dosaje así como el patrón utilizado en la construcción de la curva standard. En nuestro caso, de todas formas nuestros datos son útiles en términos relativos para comparar entre ambos grupos de ratas.

Al analizar los valores de IgA en el fluido intestinal se observa que estos aumentan en ambos grupos con la edad. Sin embargo en los animales desnutridos durante la lactancia estos niveles permanecen disminuídos en relación al control durante toda la etapa del desarrollo del animal. La variación con la edad de la cantidad IgA en el fluido intestinal es coincidente en varios modelos de animales (van der Heijden et al., 1988) y en humanos, y esta relacionado con la dependencia que tiene la síntesis de inmunoglobulinas en las PP, en el GLM y en la lamina propia del intestino con la exposición a antígenos externos, a diferencia de lo que ocurre en bazo (Benner et al. 1981, 1982 en Van Der Heijden 1988). También está vinculado al tiempo transcurrido desde el destete. Cuando se cuantifican las células productoras de IgA en ratas de 28 días, que habían sido destetadas entre los 15 y los 23 días de edad, se observa que cuanto antes se destetan mayor es su número (van der Heijden, 1990).

Se ha visto que la desnutrición calórico proteica provoca un decrecimiento de la IgA en las secreciones tanto en animales como en humanos (Lim et al., 1981; McGee et al., 1988; Chandra, 1983b). También se ha descrito que este decrecimiento es mucho mayor cuando la desnutrición ocurre durante el período de crecimiento (Lim et al. 1981). En nuestro caso esta disminución correlaciona con la disminución de células IgA+ en las PP y en el ganglio mesentérico. Las células plasmáticas que pueblan la lamina propia del

intestino, las cuales en roedores son principalmente productoras de IgA, provienen principalmente de precursores localizados en las placas de Peyer. Por consiguiente nuestros resultados que describen un decrecimiento en el porcentaje y en el número total de células IgA+ en los tejidos linfoides asociados al intestino puede estar indicando un decrecimiento en el número de células productoras de IgA que migran a la lamina propria, con la consecuente caída en los niveles de IgA en el fluido intestinal. Esto además se ve apoyado por el hecho que la recuperación en los animales desnutridos de las células IgA+ en las PP y el GLM coincide con la recuperación de los niveles de IgA en el fluido intestinal.

Por otra parte en ratas está extensamente descripta la importancia en la contribución de IgA sérica al contenido total de IgA en el fluido intestinal a través del sistema hepatobiliar (Lemaitre-Coelho et al., 1977; 1978a; 1978b). En la desnutrición también puede verse afectado el flujo y la composición de la bilis (Villalon et al., 1987) por lo tanto otra causa además de una disminución de las células productoras de IgA en la lamina propria del intestino puede ser una disminución del aporte de IgA por parte de la bilis. Cuando se analiza la concentración de IgA en el suero observamos que esta no está alterada en los animales desnutridos de 21 y 28 días. En humanos y en ratones se ha visto que la desnutrición proteica provoca un aumento en la concentración de IgA sérica (Newmann et al., 1975, McGee and

McMurray, 1988) lo cual ha sido explicado por una deficiencia en los mecanismos de remoción de la IgA del suero. Nuestros indican que no hay un aumento de la concentración sérica de IgA en los desnutridos. Esto podría deberse a que el sistema de pasaje de IgA del suero al fluido en las ratas es muy eficiente. Por otro lado parecería que esta desnutrición tiene un efecto más pronunciado sobre la producción de IgA secretoria que de IgA sérica. De todas formas hay que considerar que la cantidad total de IgA también está disminuída ya que el volumen sanguíneo es menor en los animales desnutridos.

Conociéndose que la producción de IgA es altamente dependiente de las células T colaboradoras (Kawanishi et al., 1983a; 1983b; Sonoda et al., 1992; Beagley et al., 1988) podría ser contradictorio que a los 120 días se haya normalizado la cantidad de IgA en el fluido intestinal, mientras que permanece disminuído el porcentaje de células T (entre ellas las CD4+). Esto quizás pueda explicarse considerando que los mecanismos que producen el switch a IgA como los que llevan a la maduración final de las células B para producir células plasmáticas son dependientes de factores solubles (citoquinas) que actúan en el microambiente del tejido linfoide. Una disminución consistente pero limitada en magnitud de las células T CD4+ en la principal zona inductora del sistema inmune de las mucosas, como la

encontrada por nosotros, puede que no sea suficiente para alterar estos mecanismos que no involucran una relación célula a célula. Por otro lado a medida que aumenta el período de renutrición posiblemente también se produzca una recuperación del microambiente del intestino (principalmente en la flora intestinal) el cual también es un factor determinante en la maduración de las células B del intestino (Cebra et al., 1980; 1983).

Para determinar si las alteraciones observadas en los tejidos linfoides asociados al intestino tenían consecuencias funcionales se inmunizaron ratas con toxina colérica a partir del día 28 de edad (una semana de renutrición con dieta comercial) y se evaluó la respuesta de anticuerpos a los 50 días y a los 120 días luego de un reestímulo. Se eligió esa edad para comenzar la inmunización pues en ese momento es que comienzan a aparecer centros germinales en las placas de Peyer (van Rens et al., 1990). Una inmunización realizada antes de esto podría producir una baja respuesta en los animales controles con lo cual no se hubiera podido evaluar el efecto de la desnutrición. La estimulación de una respuesta inmune secretoria es sumamente dificultosa cuando se inmuniza con proteínas solubles (Elson, 1987), siendo la toxina colérica una excepción. Los efectos que esta tiene sobre la maduración y función de las células presentadoras, células B y células T podrían interferir con la evaluación de

los efectos de la desnutrición, por lo tanto se administraron dosis mas bien bajas de la misma (Pierce et al., 1984).

La respuesta de anticuerpos sistémicos luego de tres dosis (50 días de edad) estaba disminuída en IgM, en IgA y en IgG en relación a los controles. Lo mismo sucedió en la respuesta de anticuerpos IgA en el fluído intestinal, determinada por ELISA o por la capacidad de neutralizar a la toxina colérica en la prueba del loop intestinal. La toxina colérica es un antígeno timo dependiente (Lycke et al., 1987) que necesita la presencia de células CD4+ principalmente en la zona inductora del sistema inmune de mucosas para poder desencadenar una respuesta de anticuerpos (Hornqvist et al., 1991). Estudios recientes han demostrado en ratón que la administración de un antígeno por vía oral estimula preferencialmente los clones CD4+ Th2 en las placas de Peyer, mientras que la estimulación por vía parenteral estimula tanto los Th1 como los Th2 en el bazo (Xu-Amano et al., 1992)

Los clones Th2 son los que secretan interleuquinas necesarias para colaborar en la respuesta de anticuerpos, una disminución de los mismos puede determinar por lo tanto una disminución en la respuesta de anticuerpos en el fluído intestinal y en el suero. En nuestro modelo de desnutrición observamos que las células CD4+ están disminuídas significativamente durante el período de estimulación antigénica, con lo cual no se estaría en condiciones de montar una respuesta de anticuerpos, siendo posiblemente esta

una de las causas de la baja respuesta de los animales desnutridos.

Para determinar si en los animales desnutridos había una disminución en las células T activadas se analizó la presencia del receptor para IL-2 en células del ganglio mesentérico. En las 3 edades estudiadas (21, 28 y 50 días) se encontró que menos de un 1% expresaban este marcador. Esto también se ha encontrado en primates no humanos (Zeititz et al., 1988). En estudios realizados en rata se ha visto que luego de una inmunización intra placa de Peyer aparecen células T colaboradoras para ese antígeno en las placas de Peyer y en el ducto torácico, las cuales migran posiblemente a la lamina propia del intestino. Cuando se extrajo quirúrgicamente el ganglio mesentérico para evaluar el aporte que este hacía al total de células T colaboradoras circulantes se vio que este era muy pequeño (Dunkley and Husband, 1986; 1987). Si esto es así, es posible esperar una baja expresión del receptor para IL-2 en estas células. Esto nos está marcando una clara diferencia con lo que ocurre con las células B, las cuales proliferan en el ganglio mesentérico antes de migrar a lamina propia.

Además de la disminución en las células T debemos considerar que el linaje B, en estadíos previos a la intervención de las células T está afectado. Hemos visto que a los 21 y 28 días se encuentra en el ganglio mesentérico un aumento en las células que expresan el

marcador Thy1.1 y  $c\mu$ , el cual en ratas esta asociado en médula osea a células pre-B (Opstelten et al., 1986). En otro modelo de desnutrición realizado con dieta libre de proteínas a partir del destete se han descrito células pre B en las placas de Peyer (Lopez and Roux, 1989). Es posible por lo tanto que en nuestro modelo en el momento del primado con el antígeno como las células presentes en las zonas inductoras del sistema inmune de mucosas son inmaduras no son por lo tanto capaces de generar la respuesta inmune.

Se ha descrito que la desnutrición calórico proteica puede ocasionar una disminución en la localización en la lamina propia del intestino de los linfoblastos provenientes del ganglio linfático mesentérico (McDermott et al., 1982). Por lo tanto otra explicación de la baja actividad de IgA anti toxina en el fluído intestinal en nuestro modelo podría ser que las células estuvieran primadas por el antígeno y que el problema se centrara en la incapacidad de estas de localizarse en la lamina propia del intestino, lugar donde van a terminar de madurar para transformarse en plasmablastos y secretar anticuerpos. Para evaluar esta hipótesis se realizaron cultivos de células del ganglio mesentérico de animales inmunizados normales y desnutridos. Luego de siete días de cultivo se cosecharon y se guardaron los sobrenadantes para analizarles el contenido de anticuerpos anti toxina colérica. Si realmente el problema central es el

de la localización de las células en la lamina propia del intestino y no la incapacidad de estimularse por el antígeno, el sobrenadante del cultivo debería tener un título de anticuerpos semejante en ambos grupos (desnutridos durante la lactancia y controles). Sin embargo en los sobrenadantes del cultivos de células de los animales desnutridos la cantidad de anticuerpos antitoxina colérica esta claramente disminuída, por lo tanto el problema central que se presenta en esta desnutrición es la incapacidad de las células en la zona inductora de ser estimulados por el antígeno.

La inmunogenicidad de la toxina colérica radica principalmente en la capacidad de la subunidad B de unirse al GM1, jugando esto de por si un rol fundamental y por otro lado posibilita la acción de la subunidad A sobre la adenilato ciclasa, lo cual también parece ser importante. Podría ocurrir que en los animales desnutridos cuando se comienza el esquema de inmunización haya una disminución en la expresión del GM1 sobre las células o, en la afinidad del mismo por la toxina. Estudios que se han hecho con la toxina termoestable de *Escherichia coli* y con toxina colérica parecen indicar que esto no sucede (Cohen et al., 1992) y si sucede se revierte luego de dos o tres días de renutrición (Baker et al., 1989), por lo tanto no es de suponer que juegue un rol importante en la baja respuesta a la toxina por parte de los animales desnutridos.

La contribución de los anticuerpos IgA específicos en la bilis a la IgA específica en el fluido intestinal es también importante (Tamaru and Brown, 1985; Pierre et al., 1990; Jackson et al., 1992). La disminución de anticuerpos IgA específicos anti toxina colérica en el suero nos estaría indicando que el aporte de la bilis a la IgA específica también se encontraría afectado ya que la IgA de la bilis en las ratas proviene de la IgA sérica.

Se sabe que la toxina colérica es uno de los pocos antígenos no replicantes que genera una respuesta de memoria cuando se administra oralmente (Lycke and Holmgren 1986; 1987). Para determinar si las ratas desnutridas durante la lactancia desarrollaban una respuesta de memoria, se analizó la respuesta a la TC en éstas y en grupos controles luego de administrar un reestímulo después de 70 días de haber dado la última de las tres dosis. Los resultados muestran que los títulos de anticuerpos anti toxina en los animales desnutridos se mantienen disminuídos en el suero (tanto la IgG como la IgM y la IgA), así como en el fluido (IgA) y en los sobrenadantes de cultivo de células de ganglio mesentérico (IgG e IgA).

Un resultado sugestivo es que cuando se inmunizó un lote de animales con un peso inferior a los desnutridos habitualmente utilizados se observó a los 50 días una respuesta de anticuerpos séricos superior a la de estos. Sin

embargo a los 113 días la IgG anti TC en suero descendió, no recuperándose luego de un reestímulo. Esto podría ser explicado por una mayor presencia de células transferidas por la madre que tienen un grado de funcionalidad en la cría directamente vinculada a su estado nutricional (es decir al grado de inmadurez del sistema inmune propio), tal cual parece suceder in vitro.

Se ha descrito que la TC puede favorecer el switch a células IgA+ (Lycke and Strober, 1989; Lycke, 1991). En otros trabajos se ha visto que la administración de TC o TC-B como adyuvante en la inmunización por vía oral con el virus de la influenza produce un aumento sustancial y preferencial en las placas de Peyer de las células que producen anticuerpos de clase IgA contra el virus (Chen and Strober, 1990). En vista de esto es que se planteó la posibilidad de que en los animales desnutridos, los cuales parecen tener problemas en el proceso que lleva a pasar de células IgM+ a células IgA+ pudiera ocurrir alguna influencia de la TC sobre este fenómeno en las células que responden específicamente contra ella. Para evaluar esto se analizó la relación que hay en cada animal en su respuesta de anticuerpos IgA e IgG (IgA/IgG) en el suero y en el sobrenadante de cultivo de ganglio mesentérico y luego se determinó si había diferencias entre esta relación en las ratas desnutridas y en los controles. Tanto a los 50 como a los 120 días se observa

que sí hay diferencias tanto en el suero como en los sobrenadantes. En los animales desnutridos hay una mayor respuesta de clase IgA en relación a la de clase IgG que en los controles, lo que nos estaría indicando posiblemente la acción de la TC directa o indirectamente sobre las células B compensando en alguna medida la deficiencia provocada por la desnutrición en la respuesta de anticuerpos de clase IgA. Para determinar si esta posible influencia de la TC sobre el switch a IgA se manifestaba en el contenido de IgA total en el fluido intestinal es que se comparó el contenido de IgA del fluido intestinal de animales normales y desnutridos, a los cuales se los había inmunizado o no con toxina colérica. Los resultados muestran que no hay diferencias cuando se compara entre los animales normales inmunizados con toxina y sin inmunizar y entre los desnutridos inmunizados y no inmunizados. Que la toxina colérica no afecta los niveles de IgA en el fluido intestinal ya había sido descrito (Schmucker et al, 1988). Esto nos lleva a la conclusión de que la acción de la TC ocurre específicamente sobre algunos clones de células que están involucrados en la respuesta inmune y no de forma inespecífica como un activador policlonal aumentando indiscriminadamente la aparición de células IgA+, o aumentando la producción de esta inmunoglobulina. Esto concuerda con lo descrito en otros trabajos sobre la acción de la toxina como adyuvante, en los cuales se ha visto que en cultivos de células de bazo, la

producción de anticuerpos anti KLH de clase IgG no es acompañada por un aumento en la producción de IgG total (Hirabayashi et al., 1992).

Para determinar que sucede cuando se extiende el período de renutrición previo a la inoculación del antígeno, se administró la toxina colérica a los 50 días de edad cuando las ratas aún presentan alterados los porcentajes de células B y T de los tejidos linfoides asociados al intestino. Los resultados obtenidos muestran una clara recuperación en la respuesta de anticuerpos a nivel sistémico (tanto IgA como IgG). En los cultivos de células de ganglio mesentérico también se obtuvieron valores de IgG e IgA anti TC semejantes a los controles. A nivel de la respuesta de anticuerpos IgA en el fluido intestinal se observa una recuperación, aunque en este caso persisten ciertas diferencias con los controles, si bien estas no alcanzan a ser significativas desde el punto de vista estadístico. Esta recuperación ocurre a pesar que los niveles de células T CD5+ y T CD4+ persisten disminuídos a lo largo de todo el período en que se desarrolla el esquema de inmunización. A su vez en este momento (luego de un mes de renutrición) las células B se encuentran en pasos de maduración que son T dependientes. Estos resultados nos podrían estar indicando que quizás la principal causa de la baja respuesta hacia la toxina colérica en los animales desnutridos sea la presencia de células linfoides inmaduras

durante los primeros tiempos de la renutrición (momento en que se esta realizando el primado con el antígeno) las cuales no pueden ser estimuladas. Para determinar con más precisión en donde radica principalmente el problema habría que realizar una serie de experiencias de cultivos de linfocitos de células T de ratas normales y desnutridas inmunizadas con un hapteno- carrier, con células de animales normales inmunizadas con el mismo hapteno acoplado a un carrier diferente. El problema que se presenta para poder realizar estos ensayos es la dificultad en contar con ratas singeneicas.

Mas allá de cual sea la alteración principal, si es que hay una, queda claro que este modelo de desnutrición durante el período de lactancia determina una inmunodeficiencia en la zona inductora del sistema inmune de mucosas, la cual necesita un largo período de renutrición para revertirse desde el punto de vista funcional. Esto es claramente diferente a lo que ocurre cuando se desnutren ratas adultas, situación que genera una deficiencia en la respuesta a la toxina colérica, pero practicamente circunscripta al período en que se esta realizando la desnutrición (Barry and Pierce, 1979).

## CONCLUSIONES

Al estudiar las consecuencias sobre los tejidos linfoides asociados al intestino, de una desnutrición durante el período de lactancia en ratas Wistar, observamos que:

a) El peso corporal permanece disminuído a lo largo de todo el período en que se realizó el estudio.

b) Hay una clara disminución en el número de células tanto en las placas de Peyer como en el ganglio linfático mesentérico, lo cual está indicando un retardo en la proliferación celular. Esto recién se revierte luego de más de un mes de renutrición con dieta comercial.

c) Cuando se estudia la población de células T CD5+ y las subpoblaciones CD4+ y CD8+ encontramos que estas permanecen disminuídas aún luego de tres meses de renutrición con dieta comercial tanto en las PP como en el GLM. Esta permanencia de

las alteraciones puede estar relacionada con el hecho que el timo es uno de los órganos más afectados en la desnutrición. Sin embargo a los 21 días (momento del destete) se observa que no hay diferencias en el porcentaje de células T CD5+ ni en las PP ni en el GLM, así como en las CD4+ en el GLM. Esto podría estar indicando un injerto de células de la madre en las crías, las cuales pasaron a través de la leche. Al analizar la presencia de anticuerpos anti TC en el sobrenadante de cultivos de células de GM de ratas de 21 días amamantadas por madres inmunizadas con TC, se comprueba que si hay transferencia de células principalmente en los animales desnutridos.

El análisis en GLM de células que expresen el receptor para IL-2 (células T activadas) dió como resultado una muy baja expresión tanto en los controles como en el grupo experimental.

d) Al estudiar la presencia del marcador Thy1.1 en las células del GLM, encontramos que a los 21 días los porcentajes en ambos grupos eran similares pero que a los 28 días en los controles este disminuye, mientras que en los desnutridos permaneció elevado (alrededor de un 20%). Esto estaría indicando la presencia de células inmaduras (posiblemente pre B o pre T) en la principal zona inductora del sistema inmune de las mucosas, ya que en rata éste

marcador se encuentra en el linaje B (en médula osea) y en el linaje T (en el timo) en los estadios tempranos en la maduración, perdiéndose antes de migrar a los órganos linfoides periféricos.

e) Cuando se estudia en el ganglio mesentérico de ratas 21 y de 28 días la presencia de células pre-B, encontramos un aumento de éstas en los animales desnutridos así como una disminución de las células B con cadenas  $\mu$  en el citoplasma. Esto nos está indicando que en los animales desnutridos hay un retardo en la maduración del sistema inmune que lleva a la migración de células inmaduras desde médula osea a la periferia, las cuales no estarían en condiciones de ser estimuladas por un antígeno.

f) Cuando se estudian las poblaciones de células B con IgM o IgA en la membrana encontramos que a partir de los 28 días las células IgA+ se encuentran disminuídas tanto en las PP como en el GLM. Esta alteración permanece hasta luego de un mes de renutrición con dieta comercial, sin embargo luego de tres meses de renutrición se revierte completamente. Por otro lado encontramos que el porcentaje de células IgM+ aumenta desde los 28 días (momento en que es el mismo que el del control) hasta los 50 días tanto en las PP como en el GLM. Esto podría estar indicando que luego de un mes de renutrición permanecen ciertas dificultades en el switch de

IgM a IgA, posiblemente debido a las alteraciones en las células T así como al retardo en la maduración que la desnutrición causa sobre el propio linaje B en médula osea.

g) El estudio de los niveles de IgA en fluido intestinal indica que los mismos aumentan con la edad a partir del destete, en la medida en que comienza una fuerte estimulación antigénica en el ambiente del intestino. En los animales desnutridos sin embargo el nivel permanece disminuído en relación a los controles aún luego de un mes de renutrición con dieta comercial. La edad en que se restableció la cantidad de IgA en el fluido coincide con la observada para la recuperación de la cantidad de células con IgA+. Esto era previsible ya que la mayor fuente de precursores de las células plasmáticas productoras de IgA en la lamina propria del intestino provienen de las placas de Peyer y del GLM.

h) Cuando se analizaron las consecuencias funcionales de éste tipo de desnutrición a través de la evaluación de la respuesta de anticuerpos hacia la toxina colérica, cuando ésta es administrada oralmente se vio que:

1) Luego de tres dosis de TC administradas a partir del día 28 de edad la respuesta de anticuerpos séricos IgM, IgA e IgG estaba profundamente disminuída. En el fluido intestinal los títulos de IgA anti TC también se encontraron muy deprimidos

en los animales desnutridos. Por otro lado el estudio del fluido intestinal de éstas ratas desnutridas durante la lactancia demostró que no tenía la capacidad de neutralizar a la toxina cuando se compara con los controles. El análisis del sobrenadante del cultivo de células de GLM de ratas inmunizadas desnutridas y controles dió como resultado que en los animales desnutridos estaban muy disminuidos los títulos de IgA e IgG anti toxina colérica. Esto indicaría que la falta de actividad anti toxina en el fluido intestinal y en el suero se debe principalmente a una deficiencia en el primado con el antígeno en la zona inductora del sistema inmune asociado a las mucosas (aunque no pueden descartarse otras alteraciones).

2) Cuando se administró a los 113 días, un reestímulo a los animales que ya habían recibido tres dosis de antígeno se encontró que las ratas desnutridas seguían respondiendo deficientemente en relación a los controles, tanto en el suero como en el fluido intestinal y en los sobrenadantes de cultivo de células de GLM. Esto nos indicaría la imposibilidad que tiene las ratas del grupo experimental de desarrollar una respuesta de memoria.

3) Cuando se analizó la relación entre los títulos de IgA e IgG en cada animal tanto en suero como en el sobrenadante del cultivo de células de GLM se observó que esta relación era

mayor en los desnutridos. Esto quizás se deba a que la TC es capaz de favorecer el switch a IgA y posiblemente esta acción sea más notable en presencia de alguna inmunodeficiencia. Este fenómeno parece ser específico ya que la cantidad total de IgA en el fluido intestinal no varió entre las ratas inmunizadas y las no inmunizadas.

4) Cuando se analizó la importancia que tenía la extensión del período de renutrición previo a la primera administración del antígeno, se observó que cuando los animales eran inmunizados a partir de los 50 días de edad, las consecuencias de la desnutrición en la imposibilidad de montar una respuesta de anticuerpos se revertía. Esto ocurría principalmente en la respuesta en suero y en los sobrenadantes del cultivo de células de GLM y en menor medida en la IgA anti toxina del fluido intestinal.

El conjunto de estos resultados nos estaría diciendo que la desnutrición durante la lactancia provoca importantes alteraciones en los tejidos linfoides asociados al intestino algunas de las cuales no se revierten aún luego de tres meses de renutrición. Eso trae aparejado importantes consecuencias a nivel funcional, lo que lleva a la incapacidad de montar una respuesta inmune efectiva. Esta incapacidad se podría deber a dos causas fundamentales a) alteraciones a nivel del linaje de células B durante los primeros estadios en médula ósea y 2) alteraciones en el linaje T desde la maduración

intratímica, lo cual también determinaría una deficiencia en la colaboración con las células B.

Para que estas deficiencias se reviertan desde el punto de vista funcional es necesario un largo período de renutrición previo a la primera administración del antígeno.

A handwritten signature in black ink, consisting of a vertical line on the left, a loop at the bottom, and a series of peaks and valleys on the right.A handwritten signature in black ink, featuring a large, sweeping loop on the left that crosses over the rest of the signature, which includes several connected, somewhat uniform strokes.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Alleyne G.A. and Young V.H. Adrenal function in malnutrition. *Lancet* i; 1966: 911.
2. Anastassiou D.D, Yamada H., Boumpas D.T., Tsokos G.C., Thyphronitis G., Balow J., and Mond J.J. Cholera toxin promotes the proliferation of anti- $\mu$  antibody-prestimulated human B cells. *Cellular Immunology*; 1992; 140: 237 - 247.
3. Baker S.S., Campbell C., and Walker W.A. Short term neonatal starvation altered cholera toxin binding in rabbits. *J. Nutr.*; 1989; 119: 280 - 285.
4. Barry W.S. and Pierce N.F. Protein deprivation causes reversible impairment of mucosal immune response to cholera toxoid/toxin in rat gut. *Nature*; 1979; 281: 64 - 65.
5. Beagley W. Kenneth, Eldridge J. H., Lee F., Kiyono H., Everson M. P., Koopman W. J., Hirano T., Kishimoto T. and McGhee Jerry R. Interleukins and IgA synthesis. *J. Exp. Med.*; 1989; 169: 2133-2148.
6. Beagley K.W., Eldridge J.H., Aicher W.K., Mestecky J., Di Fabio S., Kiyono H., and McGhee J.R. Peyer's patch B cells with memory cell characteristics undergo terminal differentiation within 24 hours in response to interleukin 6. *Cytokine*; 1991; 3: 107-116.
7. Beagley W. Kenneth, Eldridge W. J., Kiyono H., Everson M. P., Koopman W. J., Honjo T. and McGhee Jerry R. Recombinant Murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA positive Peyer's patch B cells. *J. Immunol.*; 1988; 141: 2035 - 2042.
8. Beer A.E., Billingham R.E., Head J.R. Natural transplantation of leukocytes during suckling. *Transplant. Proc.*; 1975; 7: 399.
9. Beisel W. R. Nutrition, infection, specific immune

responses, and non specific host defenses: a complex interaction. In: Nutrition, disease resistance, and immune function; 1984: 3-34.

10. Benner R., Meima F., Van der Meulen G.M. and Van Muiswinkel W.B. Antibody formation in mouse bone marrow I. Evidence for development of plaque forming cells in situ. *Immunology*; 1974; 26: 247.

11. Betancourt, M.; Ortiz, R.; Gonzalez, C. Proliferation Index in Bone Marrow Cells from Severely Malnourished Rats During Lactation. *Mutation Research*; 1992; 283: 173-177.

12. Bienenstock J. and Befus A.D. *Mucosal Immunology*. *Immunology*; 1980; 41: 249.

13. Bienenstock J. and Dolezel J. Peyer's patches: lack of specific antibody containing cells after oral and parenteral immunization. *J. Immunol.*; 1971; 106: 938.

14. Bland P.W. and Warren L.G. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. *Immunology*; 1986; 58: 1-7.

15. Bland P.W. Antigen presentation by gut epithelial cells: secretion by rat enterocytes of a factor with IL-1 like activity. *Adv. Exp. Med. Biol.*; 1987; 216: 219-225.

16. Boass A. and Willson T.H. Development of mechanisms for intestinal absorption of vitamin B12 in growing rats. *Am. J. Physiol.*; 1963; 204: 101.

17. Brandtzaeg P. The role of J chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man. *Scand. J. Immunol.*; 1985; 22: 111.

18. Brandtzaeg P. The secretory immune system of lactation human mammary gland compared with others exocrine organs. *Ann. N.Y.Acad. Sci.*; 1983; 409: 353.

19. Brandtzaeg P. Sollid M.L., Thrane P.S., Kvale D., Bjerke K., Scott H., Kett K. and Rognum T.O. Lymphoepithelial interactions in the mucosal immune system. *Gut*; 1988; 29: 1116-1130.

20. Brideau R.J., Carter P.B., McMaster W.R., Mason D.W., and Williams A.F. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Europ. J. Immunol.*; 1980; 10: 609.

21. Bromander A., Holmgren J. and Lycke N. Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation

- by macrophages in vitro. *J. Immunol.*; 1991; 146: 2908.
22. Bruce M.G. and Ferguson A. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and "biologically filtered" antigen. *Immunology*; 1986; 57: 627.
23. Bucy R.P., Chen C.L.H. Cihak J. Avian T cells expressing  $\gamma\delta$  receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J. Immunol.*; 1988; 141: 2200-2205.
24. Butcher E.C., Rouse R.V., Coffman R.L., Nottenburg C.N., Hardy R.R., and Weissman I.L. Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J. Immunol.*; 1982; 129: 2698.
25. Bye W.A., Allan C.H. and Trier J.S. Structure, distribution and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology*; 1984; 86: 789-801.
26. Cebra J.J., Cebra E.R., Clough E.R., Furhman J.A., Komisar J.L., Schweitzer P.A. and Shahin R.D. IgA commitment: modes for B cell differentiation and possible role of T cells in regulating B cell development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 1983; 409: 25-37.
27. Cebra J.J., Gearhart P.J., Kamat R., Robertson S.M. and Tseng J. Origin and differentiation of lymphocytes involved in the secretory IgA response. in Cold spring harbor symposium of quantitative biology; 1976; 41: 215.
28. Cebra J.J., Gearhart P.J., Hajsey J.F., Hurwitz J.L., and Shahin R.D. Role of environmental antigens in the ontogeny of the secretory immune response. *J. Reticuloendothel. Soc.*; 1980; 28: 61s.
29. Cerf-Bensussan N., Brousse N. Jarry A. Role of in vivo activated T cells in the mechanisms of villous atrophy in humans: Study of allograft rejection. *Digestion*; 1990; 46: 297-301.
30. Cerf-Bensussan N., Schneeberger E.E. and Bhan A.K. Immunohistologic and immunoelectron microscopic characterization of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of monoclonal antibodies. *J. Immunol.*; 1983; 130: 2615-2621.
31. Challacombe S.J. Cellular factors in the induction of mucosal immunity by oral immunization. *Adv. Exp. Med. Biol.*; 1987; 216B: 887.
32. Challacombe S.J. and Tomasi Jr. T.B. Systemic tolerance

and secretory immunity after oral immunization. *J. Exp. Med.*; 1980; 152: 1459 - 1472.

33. Challacombe S.J., Krco C.J., David C.S. and Tomasi Jr., T.B. Defective antigen presentation by Ia positive adherent cells from murine Peyer's patch. *Fed. Proc.*; 1981; 40: 1077.

34. Chandra R.K. Antibody formation in first and second generation offspring of nutritionally deprived rats. *Science*; 1975; 190: 289-290.

35. Chandra R.K. Mucosal immunity in nutritional deficiency. In *The mucosal immune system in health and disease* (Ed) P.L. Ogra and J. Bienestock. 81st Ross conference on pediatric research. Columbus Ohio.; 1981.

36. Chandra R.K. Numerical and functional deficiency in T helper cell in protein energy malnutrition. *Clin. Exp. Immunol.*; 1983; 51: 126.

37. Chandra R.K. and Newberne P.M. Nutrition, immunity and infection: Mechanisms of interactions. Plenum, New York; 1977.

38. Chandra, R.K. Mucosal immune responses in malnutrition. *Ann. N.Y Acad. Sci.*; 1983; 409: 345.

39. Chandra, R.K. Protein-Energy Malnutrition and Immunological Responses. *Journal of Nutrition*; March 1992; 122: 597-600.

40. Chen K.-S. and Strober W. Cholera holotoxin and its B subunit enhance Peyer's patch B cell responses induced by orally administered influenza virus: disproportionate cholera toxin enhancement of IgA B cell response. *Eur. J. Immunol.*; 1990; 20: 433.

41. Chen S.S., and Li Q.,. Transforming growth factor beta (TGF-beta1) is a bifunctional immune regulator for mucosal IgA responses. *Cell. Immunol.*; 1990; 128: 353.

42. Chin, Y.H.; Cai, J.P.; Xu, X.M. Transforming Growth Factor-beta 1 and IL-4 Regulate the Adhesiveness of Peyer's Patch High Endothelial Venule Cells for Lymphocytes. *Journal of Immunology*; 1992; 148: 1106-1112.

43. Christadoss P., Talal N., Lindstrom J. and Fernandes G. Suppression of cellular and humoral immunity to T dependent antigens by calorie restriction. *Cell. Immunol.*; 1984; 88: 1.

44. Coffman Robert L., Shrader B., Cary J., Mosmann T. R. and Bond Martha W. A mouse T cell product that preferentially

- enhances IgA production. I. Biologic Characterization. *J. Immunol.*; 1987; 139: 3685 - 3690.
45. Cohen, M.B.; Nogueira, J.; Laney, D.W.; Conti, T.R. The Jejunal Secretory Response to Escherichia-Coli Heat-Stable Enterotoxin Is Prolonged in Malnourished Rats. *Pediatric Research*; 1992; 31: 228-233.
46. Conley M.E. and Delacroix D.L. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separates but related systems of immune defense? *Ann int. Med.*; 1987; 106: 892-899.
47. Cooper G. and Turner K. Immunological responses in rats following antigenic stimulation of Peyer's patches. I. Characteristics of primary response. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*; 1967; 45: 363.
48. Crago S.S., Kutteh W.H., Moro I. Distribution of IgA1-, IgA2- and J chain-containing cells in human tissues. *J. Immunol.*; 1984; 132: 16.
49. Crago S.S., Prince S.J., Pretlow T.G., McGhee J.R. and Mestecky J. Human colostral cells. I. Separation and characterization. *Clin. Exp. Immunol.*; 1979; 38: 585-597.
50. Craig S.W., and Cebra J.J. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.*; 1971; 134: 18.
51. Crawford J.M. and Goldchneider I. Thy-1 antigen and B lymphocyte differentiation in the rat. *J. Immunol.*; 1980; 124: 969.
52. Cummins A., Steele T., LaBrooy J. and Shearman D. Maturation of small intestine of the rat at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora and mucosal immune activity. *Gut*; 1988; 29: 1672 - 1679.
53. Cummins A.G., Thompson F.M. and Mayrhofer G. A flow cytometric study of activation of lymph node cells at weaning in the rat. *Advances in Mucosal Immunology* (McDonald T.T; Challacombe S.J.; Bland P.W.; Stokes C.R.; Heatley R.V.; Mowat A.M. editors) Kluwer Academic Publishers London; 1990: 477 - 478.
54. Cummins A.G., Thompson F.M., Spargo L., and Mayrhofer G. Maturation of the small intestine at weaning in the nude hypothyroid rat. *Advances in Mucosal Immunology* (McDonald T.T; Challacombe S.J. Bland P.W.; Stokes C.R.; Heatley R.V.; Mowat A.M. editors) Kluwer Academic Publishers London; 1990: 481 - 482.

55. Czerkinsky C., Russell M.W., Lycke N., Lindblad M. and Holmgren J. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun.*; 1989; 57: 1072-1077.
56. Dallman M.J., Thomas M.L., and Green J.R. MRC OX-19: A monoclonal antibody that label rat T lymphocytes and augments in vitro proliferative responses. *Eur. J. Immunol.*; 1984; 14: 260.
57. De Aizpurua H.J. and Russell-Jones G.J. Oral vaccination: identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J. Exp. Med.*; 1988; 167: 440-451.
58. DeGeus B., Van Den Enden M., Coolen C. Phenotype of intrapithelial lymphocytes in euthymic and athymic mice: Implications for differentiation of cells bearing CD3-associated T cell receptor. *Eur. J. Immunol.*; 1990; 20: 291-298.
59. Delacroix D.L. and Vaerman J.P. Function of the human liver in IgA homeostasis in plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 1983; 409: 383.
60. Diaz-Juanen E. and Williams R.C. T- and B-lymphocytes in human colostrum. *Cli. Immunol. Immunopathol.*; 1974; 3: 248-255.
61. Douglas S.D. and Schopfer K. Phagocyte function in protein calorie malnutrition. *Clin. Exp. Immunol.*; 1974; 17: 121.
62. Dunkley M.L. and Husband A.J. The induction and migration of antigen-specific helper cells for IgA responses in the intestine. *Immunology*; 1986; 57: 379-385.
63. Dunkley M, and Husband J. Distribution and functional characteristics of antigen-specific helper T cells arising after Peyer's patch immunization. *Immunology*; 1987; 61: 475-482.
64. Dvorak, B.; Stepankova, R. Effects of Dietary Essential Fatty Acid Deficiency on the Development of the Rat Thymus and Immune System. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids; 1992; 46: 183-190.
65. Eckmann, L.; Morzyckawroblewska, E.; Smith, J.R.; Kagnoff, M.F. Cytokine-Induced Differentiation of IgA B-Cells - Studies Using an IgA Expressing B-Cell Lymphoma. *Immunology*; 1992; 76: 235-241.

66. Ehrhardt, R.O.; Strober, W.; Harriman, G.R. Effect of Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1 on IgA Isotype Expression - TGF- $\beta$ 1 Induces a Small Increase in sIgA+ B-Cells Regardless of the Method of B-Cell Activation. *Journal of Immunology*; 1992; 148: 3830-3836.
67. Elson, C.O. Cholera Toxin as a Mucosal Adjuvant - Effects of H-2 Major Histocompatibility Complex and Igs Genes. *Infection and Immunity*; 1992; 60: 2874-2879.
68. Elson C.O. and Ealding W. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J. Immunol.*; 1984; 133: 2892.
69. Elson Charles O. and Ealding Wendy. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J. Immunol.*; 1984; 132: 2736 - 2741.
70. Elson C.O. and Ealding W. Genetic control of the murine immune response to cholera toxin. *J. Immunol.*; 1985; 135: 930-932.
71. Elson C.O. and Ealding W. Ir gene control of the murine secretory IgA response to cholera toxin. *Eur. J. Immunol.*; 1987; 17: 425.
72. Elson Charles O., Ealding W. and Lefkowitz Jerry. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. *J. Immunol. Methods*; 1984; 67: 101 - 108.
73. Enders G.A., Balhaus S., and Brendel W. The influence of Peyer's patches on the organ specific distribution of IgA plasma cells. *Immunology*; 1988; 63: 411.
74. Ermak T.H. and Owen R.L. Differential distribution of lymphocytes and accessory cells in mouse Peyer's patches. *Anat. Res.*; 1986; 215: 144-152.
75. Ernst P.B. Befus A.D. and Bienenstock J. Leukocytes in the epithelium: an unusual immunological compartment. *Immunol. Today*; 1985; 6: 50-55.
76. Francis, M.L.; Ryan, J.; Jobling, M.G.; Holmes, R.K.; Moss, J.; Mond, J.J. Cyclic AMP-Independent Effects of Cholera Toxin on B-Cell Activation .2. Binding of Ganglioside-GM1 Induces B-Cell Activation. *Journal of Immunology*; 1992; 148: 1999-2005.
77. Frangakis M.V., Koopman W.J., Kiyono H., Michalek S.M. and McGhee J.R. An enzymatic method for preparation of

dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. *J. Immunol. Methods*; 1982; 48: 33.

78. Fujihashi, K.; Kono, Y.; Kiyono, H. Effects of IL6 on B-Cells in Mucosal Immune Response and Inflammation. *Research in Immunology*; 1992; 143: 744-749.

79. Gearhart P.J., and Cebra J.J. Differentiated B Lymphocytes. *J. Exp. Med.*; 1979; 149: 216 - 227.

80. Gilbert J.V., Plaut A.G., Longmaid B., and Lamm M.E. Inhibition of microbial IgA proteases by human secretory IgA and serum. *Mol. Immunol.*; 1983; 20: 1039 - 1049.

81. Goldblum R.M., Attlstedt S., Carlsson B., Hanson L.A., Jodal U., Lindin-Janson G. and Sohl-Akerlund. Antibody-forming cells in human colostrum after oral immunization. *Nature (London)*; 1975; 257: 797.

82. Goldschneider I., Metcalf D., Battye F., Mandel T. and Bollum F.J. Analysis of rat hemopoietic cells on the fluorescence activated cell sorter. I. Isolation of pluripotent hemopoietic stem cells and granulocyte-macrophage progenitor cells. *J. Exp. Med.*; 1980; 152: 419.

83. Goldschneider I. Ontogeny of terminal deoxynucleotidyl transferase containing lymphocytes in rats and mice. In: "Terminal transferase in immunobiology and leukemia". (Bertazzoni U. and Bollum F.J. Eds) New York and London, Plenum Press; 1982: 115.

84. Gonzalez Ariki, S., Lopez, M.C. and Roux, M.E. IgA B lymphocytes and subpopulations of T lymphocytes in the intestinal villi of immunodeficient Wistar rats. *Reg. Immunol.*; 1992; 4: 41 - 45.

85. Guy Grand D., Cerf-Bensussan N., Malissen B., Malassis Seris M., Briottet C. and Vassalli P. Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte population with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.*; 1991; 173: 471-481.

86. Hale M.L., Greiner D.L., and McCarthy K.F. Characterization of rat prothymocyte with monoclonal antibodies recognizing rat lymphocyte membrane antigenic determinants. *Cell. Immunol.*; 1987; 107: 188 - 200.

87. Halstead T.E. and Hall J.G. The homing of lymph-borne immunoblast to the small gut of neonatal rats. *Transplantation (Baltimore)*; 1972; 14: 339.

88. Hanson D.G. Ontogeny of orally induced tolerance to

soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns. *J. Immunol.*; 1981; 127: 1518.

89. Harriman Gregory R., Kunimoto D. Y., Elliott J. F., Paetkau V. and Strober Warren. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J. Immunol.*; 1988; 140: 3033 - 3039.

90. Heatley R.V., Stark J.M., Horsewood P., Bandhouvast E., Cole F., and Bienenstock J. The effect of surgical removal of Peyer's patches in the rat on systemic antibody responses to intestinal antigen. *Immunology*; 1981; 44: 543.

91. Henry C., Faulk P., Kihn L., Yoffey J.M and Fudenberg H.J. Peyer's patches: immunologic studies. *J. Exp. Med.*; 1970; 131: 1200.

92. Hirabayashi, Y.; Tamura, S.I.; Shimada, K.; Kurata, T. Involvement of Antigen-Presenting Cells in the Enhancement of the In vitro Antibody Responses by Cholera Toxin-B Subunit. *Immunology*; 1992; 75: 493-498.

93. Hitoshi Y., Yamaguchi N., Mita S., Sonoda E., Takaki S., Tominaga A., and Takatsu K. Distribution of IL-5 receptor-positive B cells: Expression of IL-5 receptor on Ly-1 (CD5)+ B cells. *J. Immunol.*; 1990; 144: 4218.

94. Holmgren J., Lindholm L. and Lonnroth I. Interaction of cholera toxin and toxin derivatives with lymphocytes. I. Binding properties and interference with lectin-induced cellular stimulation. *J. Exp. Med.*; 1974; 139: 801.

95. Holmgren J., Svennerholm A.M., Lönroth I., Fall-Persson M. Markman B. and Lundbeck H. Development of improved cholera vaccine based on subunit toxoid. *Nature*; 1977; 269: 602-604.

96. Hörnqvist E., Goldschmidt T.J., Holmdahl R., and Lycke N. Host defense against cholera toxin is strongly CD4+ T cell dependent. *Infect. Immun.*; 1991; 59: 3630 - 3638.

97. Hunt S.V. The presence of thy-1 on the surface of rat lymphoid stem cells and colony forming units. *Eur. J. Immunol.*; 1979; 9: 853.

98. Hunt S.V., Mason D.W. and Williams A.F. In rat bone marrow thy-1 antigen is present on cells with membrane immunoglobulin and precursors of peripheral B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*; 1977; 7: 817.

99. Husband A.J. and Dunkley M.L. Lack of site origin effects on distribution of IgA antibody-containing cells. *Immunology*; 1985; 54: 215-221.

100. Husband A.J. and Dunkley M.L. Migrations of the effector cells: role of antigen and tissue specificity. In Migration and homing of Lymphoid Cells. (Ed.) A.J. Husband; 1989 CRC Press, Boca Raton, Fl.; II: 35-51.
101. Husband A.J. and Gowans J.L. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J. Exp. Med.*; 1978; 148: 1146 - 1160.
102. Husband A.J., Cripps A.W. and Clancy R.L. Generation and migration patterns of intestinal T and B lymphocytes in response to local antigen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 1983; 409: 828.
103. Issekutz T.B. The response of gut-associated T lymphocytes to intestinal viral immunization. *J. Immunol.*; 1984; 133: 2955.
104. Jackson, G.D.F.; Hansen, P.G.C.; Underdown, B.J. Further Evidence That Hepatic Sources Confer Biliary Antibody in the Rat. *Immunology*; 1992; 76: 397-401.
105. James S.P., Kwan W.C., and Sneller M.C. T cells in inductive and effector compartments of the intestinal mucosal immune system of nonhuman primates differ in lymphokine mRNA expression, lymphokine utilization, and regulatory function. *J. Immunol.*; 1990; 144: 1251.
106. Jertborn, M.; Svennerholm, A.M.; Holmgren, J. Safety and Immunogenicity of an Oral Recombinant Cholera B-Subunit - Whole Cell Vaccine in Swedish Volunteers. *Vaccine*; 1992; 10: 130-132.
107. Jin B., Scott J.L., Vadas M.A. and Burns G.F. *Immunology*; 1989; 66: 570.
108. Kagnoff M.F. and Campbell S. Functional characteristics of Peyer's patch lymphoid cells. *J. Exp. Med.*; 1974; 139: 398.
109. Kanwar S.S., Ganguly N.K., Walia B.N.S. Direct and antibody dependent cell mediated cytotoxicity against *Giardia lamblia* by splenic and intestinal lymphoid cells in mice. *Gut*; 1986; 27: 73- 77.
110. Katz M. and Stiehm E.R. Host defense in malnutrition. *Pediatrics*; 1977; 59: 490.
111. Kawanishi H. and Strober W. T cell regulation of IgA immunoglobulin production in gut-associated lymphoid tissues. *Mol. Immunol.*; 1983; 20: 917-930.

112. Kawanishi H., Saltzman L.E. and Strober W. Characteristics and regulatory function of murine Con A-induced, cloned T cells obtained from Peyer's patches and spleen. *J. Immunol.*; 1982; 129: 475.
113. Kawanishi Hidenori, Saltzman L. E. and Strober Warren. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. *J. Exp. Med.*; 1983; 157: 433 - 450.
114. Kherl H. Jhon, Roberts A. B., Wakefield L. M., Jakowlew S., Sporn M. B. and Fauci Anthony S. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.*; 1986; 137: 3855 - 3860.
115. Kherl J.H., Wakefield L.M., Roberts A.B., Jakowlew S., Alvarez-Mon M., Derynck R., Sporn M.B. and Fauci A.S. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cells growth. *J Exp. Med.*; 1986; 163: 1037.
116. Kiyono Hiroshi, Cooper M. D., Kearney J. F., Mosteller M. L., Suzanne M. M., Koopman J. W. and McGhee Jerry R. Isotype specificity of helper T cell clones. *J. Exp. Med.*; 1984; 159: 798 - 811.
117. Kiyono H., McGhee J.R., Wannemuehler M.J., Frangakis M.V., Spalding D.M., Michalek S.M. and Koopman W.H. In vitro immune responses to a T cell-dependent antigen by cultures of disassociated murine Peyer's patch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1982; 79: 596.
118. Kiyono H., Mosteller L.M., Eldridge J.H. Michalek S.M. and McGhee J.R. IgA responses in xid mice: Oral antigens primes Peyer's patch cells for in vitro immune responses and secretory antibody production. *J. Immunol.*; 1983; 131: 2616-2622.
119. Kiyono H., Mosteller-Barnum L.M., Pitts A.M., Williamson S.I., Michalek S.M., and McGhee J.R. Isotype-specific immunoregulation. *J. Exp. Med.*; 1985; 161: 731 - 747.
120. Kroese F.G., Butcher E.C., Stall A.M., Lalor P.A., S. Adams and L. A. Herzenberg. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int. Immunol.*; 1989; 1: 75-84.
121. Kulapongs P., Edelman R., Suskind R. and Olson R.E. Defective local leukocyte mobilization in children with kwashiorkor. *Am. J. Clin. Nutr.*; 1977; 30: 367.

122. Kunimoto D.Y. Transforming growth factor-beta in a model of IgA switching. *Immunol. Res.*; 1991; 10.
123. Kunimoto D. Y., Nordan R. P. and Strober W.,. IL-6 is a potent cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. *J. Immunol.*; 1989; 143: 2230.
124. Kurstak E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bulletin of the World Health Organization*; 1985; 63: 793-811.
125. Lange S., and Holmgren J. Protective antitoxic cholera immunity in mice: influence of route and number of immunizations and mode of action of protective antibodies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect.*; 1978; C 86.
126. Lebman Deborah A. and Coffman Robert L. The effect of IL-4 and IL-5 on the IgA response by murine peyer's patch B cell subpopulations. *J. Immunol.*; 1988; 141: 2050 - 2056.
127. Lebman A. Deborah, Griffin P. M., and Cebra Jhon J.. Relationship between expression of IgA by peyer's patch cells and functional IgA memory cells. *J. Exp. Med.*; 1987; 166: 1405 -1418.
128. Lebman D.A., Lee F.D., and Coffman R.L. Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of Iga exprexion in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J. Immunol.*; 1990; 144: 952-959.
129. Lee G., Ellingsworth L.R., Gillis S., Wall R., and Kincade P.W. Beta transforming growth factors are potential regulators of B lymphopoiesis. *J. Exp. Med.*; 1987; 166: 1290-1299.
130. Lemaitre-Coelho, I., Jackson G.D.F. and Vaerman J.P. Relevance of biliary IgA antibodies in rat intestinal immunity. *Scand. J. Immunol.*; 1978; 8: 459.
131. Lemaitre-Coelho I., Jackson G.D.F and Vaerman J.P. High levels of secretory IgA and free secretory component in the serum of rats with bile duct obstruction. *J. Exp. Med.*; 1978; 147: 934 - 939.
132. Liang X., Lamm M.E. and Nedrud J.G. Oral administration of cholera toxin-sendai virus conjugate potentiates gut and respiratory immunity against sendai virus. *J. Immunol.*; 1988; 141: 1495-1501.
133. Lichtman A.H., Chin J., Schmidt J.A. and Abbas A.K. Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1988; 85: 9699.

134. Lim T.S., Messhia N., and Watson R.R. Immune components of the intestinal mucosae of aging and protein deficient mice. *Immunology*; 1981; 43: 401.
135. London S.D., Rubin D.H., and Cebra J.J. Gut mucosal immunization with reovirus serotype I/L stimulates virus-specific cytotoxic T cells precursors as well as IgA memory cells in Peyer's patches. *J. Exp. Med.*; 1987; 165: 830.
136. Lopez, M.C. and Roux, Maria Estela. Impaired differentiation of IgA-B cell precursors in the payer's patches of protein depleted rats. *Devel. Comp. Immunol.*; 1989; 13: 253-262.
137. Lopez M.C., Roux M.E., Langini S.H., Rio M.E. and Sanahuja J.C. Effect of severe protein deficiency and refeeding on precursor IgA-cells if Teyer's patches of growing rats. *Nutr. Rep. Int.*; 1985; 32.
138. Luckey T.D., Mende T.J. and Pleasants J. The physical and chemical characterization of rat's milk. *J. Nutr.*; 1954; 54: 345.
139. Lycke, N., Lindhom, L. and Holmgren, J. Cholera antibody production in vitro by peripheral blood lymphocytes following oral immunization of humans and mice. *Clin. Exp. Immunol.*; 1985; 62: 39.
140. Lycke N. and Strober W. Cholera Toxin promotes B cells isotype differentiation. *J. Immunol.*; 1989; 142: 3781-3787.
141. Lycke N. and Holmgren J. Intestinal mucosal memory and presence of memory cells in lamina propria and peyer's patches in mice 2 years after oral immunization with cholera toxin. *Scand. J. Immunol.*; 1986; 23: 611 - 616.
142. Lycke N. and Holmgren J. Long-term cholera antitoxin memory in the gut can be triggered to antibody formation associated with protection within hours of an oral challenge immunization. *Scand. J. Immunol.*; 1987; 25: 407 - 412.
143. Lycke N. and Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology*; 1986; 59: 301 - 308.
144. Lycke N., Bromander A. and Holmgren J. Role of local IgA anti-toxin-producing cells for intestinal protection against cholera toxin challenge. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*; 1989; 88: 273-279.
145. Lycke N., Eriksen L. and Holmgren J. Protection against

cholera toxin after oral immunization is thymus-dependent and associated with intestinal production of neutralizing IgA antitoxin. *Scand. J. Immunol.*; 1987; 25: 413 - 419.

146. Lycke N., Severinson E. and Strober W. Cholera toxin acts synergistically with IL-4 to promote IgG1 switch differentiation. *J. Immunol.*; 1990; 145: 3316-3324.

147. Lyscom N., and Brueton M.J. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology*; 1982; 45: 775.

148. Maghazachi, A.A. Cholera Toxin Inhibits Interleukin-2-Induced, But Enhances Pertussis Toxin-Induced T-Cell Proliferation - Regulation by Cyclic Nucleotides. *Immunology*; 1992; 75: 103-107.

149. Manning L.S. and Parmely M.J. Cellular determinants of mammary cell mediated immunity in the rat. I. The migration of radioisotopically labeled T lymphocytes. *J. Immunol.*; 1980; 125: 2508.

150. Mason S. Some aspects of gastric function in the newborn. *Arch. Dis. Child.*; 1962; 37: 387.

151. Mayrhofer G., and Fisher R. IgA containing plasma cells in the lamina propria of the gut: Failure of the thoracic duct fistula to deplete the numbers in rat small intestine. *Eur. J. Immunol.*; 1979; 9: 85.

152. Mayrhofer G., Pugh C.W. and Barclay A.N. The distribution, ontogeny and origin in the rat of Ia-positive cells with dendritic morphology and og Ia antigen in epithelia with special reference to the intestine. *Eur. J. Immunol.*; 1983; 13: 112-122.

153. Mayrhofer G., Spargo L.D.J., Davidson G.P. and Huang Z.H. Ultrastructural dsitribution of Class II MHC molecules in mucosal antigen presenting cells and their relationship to antigen uptake and processing. *Advances in Mucosal Immunology* (Ed.) T.MacDonald, S.Challacombe, P.Bland, C.Stokes, R.Heatley, A.Mowat; 1990: 29.

154. McDermott M.R. and Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B Immunoblast into intestinal, respiratory and genital tissues. *J. Immunol.*; 1979; 122: 1892 - 1898.

155. McDermott M.R., Mark D.A., Befus A.D. Baliga B.S., Suskind R.M. and Bienenstock J. Impaired intestinal

localization of mesenteric lymphoblasts associated with vitamin A deficiency and protein-caloric malnutrition. *Immunology*; 1982; 45: 1-5.

156. McGee, D.W.; Aicher, W.K.; Eldridge, J.H.; Peppard, J.V.; Mestecky, J.; McGhee, J.R. Transforming Growth Factor-beta Enhances Secretory Component and Major Histocompatibility Complex Class-I Antigen Expression on Rat IEC-6 Intestinal Epithelial Cells. *Cytokine*; 1991; 3: 543-550.

157. McGee D.W. and McMurray D.N. The effect of protein malnutrition on the IgA immune response in mice. *Immunology*; 1988; 63: 25 - 29.

158. McGhee D.W., Beagley K.W. and McGhee J.R. Recombinant murine IL-5 enhances IgA production by rat splenic B cells. *Advances in Mucosal Immunology*, (Ed.) T. MacDonald, S.J. Challacombe, P.W. Bland, C.R. Stokes, R.V. Heatley and A. Mcl.Mowat; 1990: 124-125.

159. McGhee, J.R.; Mestecky, J.; Dertzbaugh, M.T.; Eldridge, J.H.; Hirasawa, M.; Kiyono, H. The Mucosal Immune System - From Fundamental Concepts to Vaccine Development. *Vaccine*; 1992; 10: 75-88.

160. McKenzie S.J. and Halsey J. Cholera toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response. *J. Immunol.*; 1984; 133: 1818-1824.

161. McMurray D.N., Humberto Rey M.D., Casazza L.J., and Watson R.R. Effect of moderate malnutrition on concentrations of immunoglobulins and enzymes in tears and salival of young Colombian children. *Am. J. Clin. Nutr.*; 1977; 30: 1944-1948.

162. McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M. and Lamm M.E. Mesenteric lymph node B lymphoblasts wich home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J. Exp. Med.*; 1977; 145: 866 - 875.

163. McWilliams M., Lamm M.E. and Phillips-Quagliata J.M. Surface and intracellular markers of mouse mesenteric and peripheral lymph node and Peyer'a patche cells. *J. Immunol.*; 1974; 113: 1326 - 1333.

164. McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M. and Lamm M.F. Characteristics of mesenteric lymph node cells homing to gut-associated lymphoid tissue in syngeneic mice. *J. Immunol.*; 1975; 115: 54.

165. Melton E. and Roux M.E. Detection of TdT-positive cells

in the mesenteric lymph nodes of immunodeficient rats: study of their antigenic phenotype. *Reg. Immunol.*; 1989; 2: 408-413.

166. Melton E., Slobodianik N.H. and Roux M.E. Effect of severe protein deficiency and refeeding on the early expression of thymic lymphocyte differentiation markers. *Nutr. Rep. Int.*; 1989; 40: 359-366.

167. Mengheri, E.; Nobili, F.; Crocchioni, G.; Lewis, J.A. Protein Starvation Impairs the Ability of Activated Lymphocytes to Produce Interferon-gamma. *Journal of Interferon Research*; 1992; 12: 17-21.

168. Mestecky J. and McGhee J.R. Immunoglobulin A (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. in Immunol.*; 1987; 40: 153 - 245.

169. Meyer L., Becker S. and Eisenhardt D. Antigen handling in the intestine mediated by normal enterocytes. In *Advances in mucosal immunology* (Ed.) MacDonald T, Chalacombe S, Bland P., Stokes C., Heatley R., Mowat A. Kluwer Academic Publishers, London; 1990: 23-29.

170. Mosmann T.R. and Coffman R.L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*; 1989; 7: 145.

171. Mosmann T.R. and Coffman R.L. Two types of mouse helper T-cell clone: Implication for immune regulation. *Immunol. Today*; 1987; 8: 223.

172. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A. and Coffman R.L. Two types of mouse helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*; 1986; 136: 2348.

173. Mowat A.M. The regulation of the immune responses to dietary protein antigens. *Immunol. Today*; 1987; 8: 93-98.

174. Munoz E., Zubiaga A.M., Merrow M., Sauter N.P., and Huber T.B. Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cells receptor-mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.*; 1990; 172: 95 - 103.

175. Murray P.D., McKenzie D.T., Swain S.L., and Kagnoff M.F. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.*; 1987; 139: 2669.

176. Na, H.R.; Hiserodt, J.C.; Seelig, L.L. Distribution of

- Lymphocyte Subsets in Rat Milk from Normal and *Trichinella-Spiralis*-Infected Rats. *Journal of Reproductive Immunology*; 1992; 22: 269-279.
177. Nagura H., Smith P.D. and Nakane P.K. IgA in human bile and liver. *J. Immunol.*; 1981; 126: 587.
178. Neutra M.R., Phillips T.L. Mayer E.L. and Fishkind D.J. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell. Tissue Res.*; 1987; 247: 537-546.
179. Newmann C.G., Lawlor G.J., Stiehm E.R., Swendseid M.E., Newton C., Herbert J., Ammann A.J. and Jacob M. Immunologic responses in malnourished children. *Am. J. Clin. Nutr.*; 1975; 28: 89.
180. Nimmanwudipong, T.; Cheadle, W.G.; Appel, S.H.; Polk, H.C. Effect of Protein Malnutrition and Immunomodulation on Immune Cell Populations. *Journal of Surgical Research*; 1992; 52: 233-238.
181. Opstelten D., Deenen G.J., Rozing J., Hunt S.V. B lymphocyte associated antigens on terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells and pre-B cells in bone marrow of the rat. *J. Immunol.*; 1986; 137: 76.
182. Opstelten D., Deenen G.J., Jaarsma T., Rozing J., Hunt S.V.,. Pre-B cells in rat bone marrow: identification, surface markers and isolation. *Adv. Exp. Med. Biol.*; 1985; 186: 9.
183. Orland E., Peppard J., Reynolds J. Rapid active transport of immunoglobulin A from blood to bile. *J. Exp. Med.*; 1978; 147: 588.
184. Orlans E., Peppard V.J., Payne A.W.R., Fitzharris B.M., Mullock B.M., Hinton R.H. and Hall J.G. Comparative aspects of the hepatobiliary transport of IgA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 1983; 409: 411.
185. Orlans E., Peppard J., Fry J.F. Secretory component as the receptor for polymeric IgA on rat hepatocytes. *J. Exp. Med.*; 1979; 150: 1577.
186. Ortiz R. and Bentancourt M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *J. Nutr.*; 1984; 114: 472-476.
187. Owen R.L. And now pathophysiology of M cells-good news and bad news from Peyer's patches. *Gastroenterology*; 1983; 85: 468.

188. Owen R.L. and Bhalla D.K. Cytochemical analysis of alkaline phosphatase and esterase activities and of lectin-binding and anionic sites in rats and mouse Peyer's patch M cells. *Am. J. Anat.*; 1983; 168: 199-212.
189. Pappo J., Steger H.J. and Owen R.L. Differential adherence of epithelium overlying gut-associated lymphoid tissue. An ultrastructural study. *Lab Invest.*; 1988; 58: 692-697.
190. Parmely M. and Manning L.S. Cellular determinants of mammary cell-mediated immunity in the rat: kinetics of lymphocyte subset accumulation in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 1983; 409: 517-533.
191. Parmely M.J., Beer A.E. and Billingham R.E. In vitro studies on the T-lymphocyte population of human milk. *J. Exp. Med.*; 1976; 144: 358-370.
192. Parrot Delphine M. V. and Ferguson Anne. Selective migration of lymphocytes within the mouse small intestine. *Immunology*; 1974; 26: 571 - 588.
193. Phillips-Quagliata J.M. and Lamm M.E. Migration of lymphocytes in the mucosal immune system. In *Migration and homing of lymphoid cells* (Ed. Husband A.J.); 1989 CRC Press, Boca Raton, Fl; II: 53.
194. Pierce Nathaniel F. and Gowans James L. Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats. *J. Exp. Med.*; 1975; 142: 1550 - 1563.
195. Pierce N.F. and Cray W.C.Jr. Determinants of the localization, magnitude and duration of a specific mucosal IgA plasma cell response in enterically immunized rats. *J. Immunol.*; 1982; 128: 1311.
196. Pierce Nathaniel. Induction of optimal mucosal antibody responses: effect of age, immunization route(s), and dosing schedule in rats. *Infect. Immun.*; 1984; 43: 341 - 346.
197. Pierce Nathaniel. The role of antigen form and function in the primary and secondary intestinal immune responses to cholera toxin and toxoid in rats. *J. Exp. Med.*; 1978; 148: 195- 206.
198. Pierce Nathaniel F., Cray William C., Jr. and Engel Pamela F. Antitoxic immunity to cholera in dogs immunized orally with cholera toxin. *Infect. Immun.*; 1980; 27: 632 - 637.

199. Pierce N., Cray W.C. and Sacci J.B. Oral immunization against experimental cholera: the role of antigen form and antigen combinations in evoking protection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 1983; 409: 724-732.
200. Pierre P. G., Sobreux P. and Vaerman J. P. Protection of rat gut against cholera toxin obtained with only biliary or intestinal secretory IgA antibodies. *Advances in mucosal immunology*; 1990.
201. Pockley, A.G.; Montgomery, P.C. Regulatory Role of Interleukin-5 and Interleukin-6 on Immunoglobulin Production in Cultured Rat Salivary Glands. *Immunological Investigations*; 1992; 21: 103-110.
202. Porstmann T. and Kiessig S.T. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J. Immunol. Methods*; 1992; 150: 5-21.
203. Que J.U., Cryz S.J. Ballou R., Fürer E., Gross M., Young J. et al. Effect of carrier selection on immunogenicity of protein conjugate vaccine against *Plasmodium falciparum* circumsporozoites. *Infect. Immun.*; 1988; 56: 2645.
204. Ritter M.A., Gordon L.K. and Goldchneider I. Distribution and identity of Thy-1-bearing cells during ontogeny in rat hemopoietic and lymphoid tissues. *J. Immunol.*; 1978; 121: 2463-2470.
205. Rosen E.U., Geefhuysen J., Anderson R., Joffe M., and Rabson A.R. Leukocyte function in children with kwashiorkor. *Arch. Dis. Child.*; 1975; 50: 220.
206. Roux M.E., McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M. and Lamm M.E. Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cell. Immunol.*; 1981; 61: 141 - 153.
207. Roux M.E., McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M, Weisz-Carrington P. and Lamm M.E. Origin of IgA plasma cells in the mammary gland. *J. Exp. Med.*; 1977; 146: 1311 - 1322.
208. Roux Maria E. and Lopez M.C. Impairment of IgA expression and cell mediated immunity observed on Peyer's patch of protein-depleted rats at weaning and then fed on 20% casein. *Rescent Adv. Exp. Med. Biol.*; 1987; 216A: 847 - 855.
209. Rudzik R., Clancy R.L., Perey D.E., Day R.P. and Bienestock J. Repopulation with IgA-containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous Peyer's patches and bronchial lymphocytes. *J. Immunol.*; 1975; 114: 1599.

210. Russell, M.W.; Lue, C.; Bake, A.W.L.V.; Moldoveanu, Z.; Mestecky, J. Molecular Heterogeneity of Human IgA Antibodies During an Immune Response. *Clinical and Experimental Immunology*; 1992; 87: 1-6.
211. Schmucker D.L., Daniels C.K., Wang R.K. and Smith K. Mucosal immune response to cholera toxin in ageing rats. I. Antibody and antibody -containing cell response. *Immunology*; 1988; 64: 691-695.
212. Schopfer K. and Douglas S.D. Neutrophil function in children with kwashiorkor. *J. Lab. Clin. Med.*; 1976; 88: 450.
213. Scicchitano R., Stainsz A., Ernst P., and Bienenstock J. A common mucosal immune system. in *Migration and Homing of Lymphoid Cells* (Ed.) A.J. Husband; 1989 CRC Press, Boca Raton, Fl.; II: 1-34.
214. Selvaraj R.J., and Bhat K.S. Phagocytosis and leukocyte enzymes in protein-calorie malnutrition. *Biochem. J.*; 1972; 127: 255.
215. Serizawa H., Miura S., Tashiro H., Makino H., Tanaka S., Yoshioka M., Ohara M., Hibi T. and Tsuchiya M. Effect of Peyer's patch excision on intestinal immune response to cholera toxin in rats. *Advances in Mucosal Immunology* (Ed) T.MacDonald, S.Challacombe, P.Bland, C.Stokes, Heatley, A.Mcl. Mowat; 1990: 280-282.
216. Shockett, P.; Stavnezer, J. Effect of Cytokines on Switching to IgA and alpha-Germline Transcripts in the B-Lymphoma I.29mu Transforming Growth Factor-beta Activates Transcription of the Unrearranged Calpha-Gene. *Journal of Immunology*; 1991; 147: 4374-4383.
217. Sirisinha S., Suskind R.M. and Edelman R. Secretory and serum IgA in children with protein-calorie malnutrition. *Pediatrics*; 1975; 55: 166-170.
218. Slobodianik, H.N., Pallaro, A.N., Fernandez, I., Roux, M. and Rios, M.E. Malnutrition induced during the suckling period: partial reversion of effects on thymus, after weaning. *Com. Biol.*; 1991; 9: 313 - 319.
219. Smith C.W. and Goldman A.S. The cells of human calostrum. I. In vitro studies of morphology and function. *Pediatr. Res.*; 1968; 2: 103-109.
220. Sneller M.C. and Strober W. M cells and host defense. *J. Infect. Dis.*; 1986; 154: 737.
221. Sonoda, E.; Hitoshi, Y.; Yamaguchi, N.; Ishii, T.;

Tominaga, A.; Araki, S.; Takatsu, K. Differential Regulation of IgA Production by TGF-beta and IL-5 - TGF-beta Induces Surface IgA-Positive Cells Bearing IL-5 Receptor, Whereas IL-5 Promotes Their Survival and Maturation into IgA-Secreting Cells. *Cellular Immunology*; 1992; 140: 158-172.

222. Spalding D.M. and Griffin A.J. Different pathways of differentiation of pre-B cell lines are induced by dendritic cells and T cells from different lymphoid tissues. *Cell*; 1986; 44: 507-515.

223. Spalding D.M., Koopman W.J., Eldridge J.H., McGhee J.R. and Steinman R.M. Accessory cells in murine Peyer's patch. I. Identification and enrichment of a functional dendritic cell. *J. Exp. Med.*; 1983; 157: 1646-1659.

224. Spencer J., Finn T. and Isaacson P.G. Expression of HLA-DR antigens on epithelium associated with lymphoid tissue in the human gastrointestinal tract. *Gut*; 1986; 27: 153-157.

225. Spencer J., Finn T. and Isaacson P.G. Human Peyer's patches: an immunohistochemical study. *Gut*; 1986; 27: 405-410.

226. Stokes C.R., Swarbrick E.T. and Soothill J.F. Genetic differences in immune exclusion and partial tolerance to ingested antigens. *Clin. Exp. Immunol.*; 1983; 52: 678.

227. Suskind R.M. *Malnutrition and the immune response*. Raven Press, N.Y.; 1977.

228. Taguchi T. McGhee J.R., Coffman R.L., Beagley K.W., Eldridge J.H., Takatsu K., and Kiyono H. Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J. Immunol. Methods*; 1990; 128: 65.

229. Taguchi T., McGhee J.R., Coffman R.L., Beagley K.W., Eldridge J.H., Takatsu K. and Kiyono H. Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4+ and CD8+ T cells that secrete IFN-gamma and IL-5. *J. Immunol.*; 1990; 145: 68.

230. Tamaru T., and Brown W.R. IgA antibodies in rat bile inhibit cholera toxin-induced secretion in ileal loops in situ. *Immunology*; 1985; 55: 579 - 583.

231. Tarkowski A., Moldovenau Z., Koopman W.J. Radl. J., Haaijman J.J. and Mestecky J. Cellular origins of human polymeric and monomeric IgA: enumeration of single cells secreting polymeric IgA1 and IgA2 in peripheral blood, bone marrow, spleen, gingiva, and synovial tissue. *Clin. Exp.*

Immunol.; 1991; 85: 341-348.

232. Taylor H.P. and Dimmock N.J. Mechanism of neutralization of influenza-virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J. Exp. Med.*; 1985; 161: 198.

233. Taylor H.P., Amstrong S.J. and Dimmock N.J. Quantitative relationships between an influenza virus and neutralizing antibody. *Virology*; 1987; 159: 288.

234. Tejada C., Argueta V., Sanchez M. and Albertazzi G. Phagocytic and alkaline phosphatase activity of leukocytes in kwashiorkor. *J. Pediatr.*; 1964; 64: 753.

235. Tomasi T.B. Oral tolerance. A review. *Transplantation*; 1980; 29: 353.

236. Trentin J.J., Gallaher M.T. and Priest E.L. Failure of functional transfer of maternal lymphocytes to F1 hybrid mice. *Transplant. Proc.*; 1977; 9: 1473-1475.

237. Tsuji M. and Reen D.J. Influence of altered Elisa antigen-antibody reaction kinetics on measurement of IgA2 subclass levels in biologicals fluids. *Advances in Mucosal Immunology* (McDonald T.T; Challacombe S.J.; Bland P.W.; Stoke C.R.; Heatley R.V.; Mowat A.M. editors) Kluwer Academic Publishers London; 1990: 904 - 905.

238. Vaerman J.P., Lemaitre-Coelho I. and Jackson G.D.F. Role of the liver in the rat intestinal S-IgA system. *Adv. Exp. Med. Biol.*; 1978; 107: 233.

239. Vajdy, M.; Lycke, N.Y. Cholera Toxin Adjuvant Promotes Long-Term Immunological Memory in the Gut Mucosa to Unrelated Immunogens After Oral Immunization. *Immunology*; 1992; 75: 488-492.

240. Van Damme, M.; Sory, M.P.; Biot, T.; Vaerman, J.P.; Cornelis, G.R. Oral Immunization Against Cholera Toxin with a Live *Yersinia-enterocolitica* Carrier in Mice. *Gastroenterology*; 1992; 103: 520-531.

241. Van der Heijden P.L., Bianchi A.T.J., Stok W., and Bokhout B.A. Background (spontaneous) immunoglobulin production in the murine small intestine as a function of age. *Immunology*; 1988; 65: 243 - 248.

242. van der Heijden P.J., Bianchi A.T.J., Stok W., and Bokhout B.A. Influence of the time of weaning on the spontaneous (background) immunoglobulin production in the murine small intestine. *Advances of Mucosal Immunology* (McDonald T.T; Challacombe S.j.; Bland P.W.; Stokes C.R.;

Heatley R.V.; Mowar M.A. editors) Kluwer Academic Publishers London; 1990: 479-480.

243. Van Der Heijden P.J., Bianchi A.T., Dol M., Pals J.W., Stok J.W. and Bokhout B.A. Manipulation of intestinal immune responses against ovoalbumin by cholera toxin and its B subunit in mice. *Immunology*; 1991; 72: 89-93.

244. Van Heyningen S. The interaction of cholera toxin with gangliosides and the cell membrane. *Curr. Top. Memb. Transp.*; 1983; 18: 445.

245. van Rees, E.P., Dijkstra C.D., and Sminia T. Ontogeny of the rat immune system: an immunohistochemical approach. *Dev. Comp. Immunol.*; 1990; 14: 9-18.

246. Van Rees E.P., Dijkstra C.D. Van der Ende M.B. and Sminia T. The ontogenic development of macrophage subpopulations and Ia-positive-non lymphoid cells in gut-associated lymphoid tissue of rat. *Immunology*; 1988; 63: 79-85.

247. van Vlasselaer P., Punnoen J. and de Vries J. Transforming growth factor beta directs IgA switching in human B cells. *J. Immunol.*; 1992; 148: 2062-2067.

248. van Vliet E., Melis M. and van Ewijk W. Dexamethasone treatment on the lymphoid and stromal composition of the mouse thymus: a flowcytometric and immunohistological analysis. *Cell. Immunol.*; 1986; 103: 229.

249. Villalon L., Tuchweber B., Yousef I.M. Effect of low protein diet on bile flow and composition rats. *J. Nutr.*; 1987; 117: 678-683.

250. Vives J., Parks D.E. and Weigle W.O. Immunologic unresponsiveness after gastric administration of human  $\gamma$ -globulin: antigen requirements and cellular parameters. *J. Immunol.*; 1980; 125: 1811.

251. Watson R.R. and McMurray D.N. The effects of malnutrition on secretory and cellular immune processes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 1979; 12: 113-159.

252. Watson R.R., McMurray D.N., Marco P.M. and Reyes M.A. Effect of age, malnutrition and renutrition on free secretory component and IgA in secretions. *Am. J. Clin. Nutr.*; 1985; 42: 281-288.

253. Watts T. Thymus weights in malnourished children. *J. Trop. Pediatr.*; 1969; 15: 155.

254. Weiler I.J. and Sprenger R. Maternal influence on the expression of immunoglobulins in young mice. *Am. J. Reprod. Immunol.*; 1981; 1: 226-230.
255. Weiler I., Hicklen W. and Sprenger R. Demonstration that milk cells invade the suckling neonatal mouse. *Am. J. Reprod. Immunol.*; 1983; 4: 95-98.
256. Weinstein, P.D.; Cebra, J.J. The Preference for Switching to IgA Expression by Peyer's Patch Germinal Center B-Cells Is Likely Due to the Intrinsic Influence of Their Microenvironment. *Journal of Immunology*; 1991; 147: 4126-4135.
257. Weisz-Carrington P, Roux M.E., McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M and Lamm M.E. Hormonal induction of the secretory immune system in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1978; 75: 2928.
258. Weisz-Carrington P., Roux M.E., McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M., and Lamm M. Organ and isotype distribution of plasma cells producing specific antibody after oral immunization: Evidence for a generalized secretory immune system. *J. Immunol.*; 1979; 123: 1705 - 1708.
259. Weisz-Carrington P., Roux M.E., and Lamm M. Plasma cells and epithelial immunoglobulins in the mouse mammary gland during pregnancy and lactation. *J. Immunol.*; 1977; 119: 1306 - 1309.
260. Wetzel G. Interleukin 5 regulation of peritoneal Ly-1 B lymphocyte proliferation, differentiation and autoantibody secretion. *Eur. J. Immunol.*; 1989; 19: 1701.
261. Williams A.F. and Gowans J.L. The presence of IgA on the surface of the rats thoracic duct lymphocytes wich contain internal IgA. *J. Exp. Med.*; 1975; 141: 335.
262. Williams A.F., Galfre G. and Milstein C. Analysis of cell surface by xenogenic myeloma-hybrid antibodies. Differentiation antigens of rat lymphocyte. *Cell*; 1977; 12: 663-673.
263. Williams, N.A.; Wilson, A.D.; Bailey, M.; Bland, P.W.; Stokes, C.R. Primary Antigen-Specific T-Cell Proliferative Responses Following Presentation of Soluble Protein Antigen by Cells from the Murine Small Intestine. *Immunology*; 1992; 75: 608-613.
264. Winick, M. and Noble, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.*; 1966; 89: 300-306.

265. Wolf J.L. and Bye W.A. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu. Rev. Med.*; 1984; 35: 95.
266. Woogen S.D., Ealding W. and Elson Charles O. Inhibition of murine lymphocytes proliferation by the B subunit. of cholera toxin; 1987; 139: 3764 - 3770.
267. Woolverton, C.J.; Holt, L.C.; Mitchell, D.; Sartor, R.B. Identification and Characterization of Rat Intestinal Lamina Propria Cells - Consequences of Microbial Colonization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 1992; 34: 127-138.
268. Xu-Amano, J.C.; Aicher, W.K.; Taguchi, T.; Kiyono, H.; Mcghee, J.R. Selective Induction of Th2 Cells in Murine Peyer's Patches by Oral Immunization. *International Immunology*; 1992; 4: 433-445.
269. Zeitz M., Green W.C. Peffer N.J.,. Lymphocytes isolated from the intestinal lamina propria of normal non-human primates have increased expression of genes associated with T cell activation. *Gastroenterology*; 1988; 94: 647.

## **ABREVIATURAS**

<b>GM</b>	<b>Ganglio Mesntérico</b>
<b>PP</b>	<b>Placas de Peyer</b>
<b>TC</b>	<b>Toxina colérica</b>
<b>IgAm</b>	<b>IgA monomérica</b>
<b>IgAp</b>	<b>IgA polimérica</b>
<b>IgA-S</b>	<b>IgA secretoria</b>
<b>ID</b>	<b>Intestino delgado</b>
<b>DL</b>	<b>Ducto linfático</b>
<b>DM</b>	<b>Ducto mesentérico</b>