

MASTOCITOS AZUL ALCIANO POSITIVOS EN LA MUCOSA DEL CIEGO DE CONEJOS NORMALES Y ESPLENECTOMIZADOS, SENSIBILIZADOS Y DESAFIADOS CON OVOALBÚMINA

N. Bassan¹, M. Vinuesa¹, F. Perez¹, S. Roma¹,
S. Bernardi², M. Lagrutta¹

¹Cátedra de Histología y Embriología . Facultad de Ciencias Médicas. Rosario.

²Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Casilda.

RESUMEN: La sensibilización por vía intraperitoneal produce síntesis de IgE que se une a mastocitos. Los mastocitos mucosos, cuya proliferación depende de linfoquinas de células T, permanecen sensibilizados hasta 12 semanas. Un segundo contacto con el antígeno libera mediadores de hipersensibilidad local. La esplenectomía disminuye las inmunoglobulinas circulantes y modifica la respuesta inmunitaria. Por la cecotrofia, llegan al ciego moléculas en diferentes etapas de degradación, posibilitando el contacto de antígenos con la barrera mucosa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cantidad de mastocitos mucosos detectables con azul alciano (AB) en el ciego de conejo normales y esplenectomizados, sensibilizados con Ovoalbúmina (OVA) y desafiados por vía oral. Conejos neozelandeses se dividieron en Grupo 1 (n=10) control no sensibilizado, Grupo 2 (n=10) sensibilizado intraperitonealmente en dos oportunidades con 2 ml de una solución de 70 µg de OVA y 30 mg de hidróxido de aluminio (ALUM)/ml, Grupo 3 (n=10) esplenectomizados y sensibilizados como el grupo 2. Los títulos de IgE específica anti-OVA fueron determinados por el test de anafilaxia cutánea pasiva. Los conejos de los grupos 2 y 3 fueron desafiados, previo ayuno de 24 horas, por instilación con sonda intragástrica, con 150 mg de OVA en 20 ml de PBS. Muestras de ciego, obtenidas 24 horas post desafío y fijadas en Carnoy se colorearon con AB pH < 1. Los mastocitos AB + se contaron en 20 campos en cada animal a 400X. El grupo 1 mostró $1,33 \pm 0,82$ mastocitos por campo. El grupo 2: $12,88 \pm 2,17$ ($p < 0,05$) y el grupo 3: $11,67 \pm 2,37$ ($p < 0,05$). Los resultados muestran un marcado incremento de mastocitos mucosos en animales sensibilizados y desafiados que indicaría liberación de factores mediadores determinantes del reclutamiento mastocitario y que la esplenectomía no afectó el incremento mastocitario a nivel del ciego, con un comportamiento similar al del grupo no esplenectomizado.

PALABRAS CLAVE: Conejo, Mastocitos mucosos, Ciego, Esplenectomía, Sensibilización

MUCOSAL ALCIAN BLUE POSITIVE MAST CELLS IN CECUM FROM NORMAL AND SPLENECTOMIZED RABBITS SENSITIZED AND CHALLENGED WITH OVA

ABSTRACT: The intraperitoneal sensitization induces IgE synthesis which binds to mast cells. Mucosal mast cells proliferation depends on lymphokines from T cells and remains sensitized up to 12 weeks after contact with antigen. A second interaction with antigen produces the delivery of mediators which generate a local anaphylactic reaction. Splenectomy in rabbits determines a significant decrease in seric immunoglobulins as well as modification in the immune response. Cecotrophy is a particular mechanism of rabbit digestive physiology which allows the entire antigenic molecules to be in close contact with cecal mucosal barrier. The aim of the present work was to evaluate the number of Alcian Blue (AB)-positive mast cells in cecum from both normal and splenectomized rabbits, sensitized with OVA and oral challenge. New Zealand rabbits were divided into 3 groups: Group 1 (n=10) not sensitized control. Group 2 (n=10) was twice sensitized intraperitoneally with 2 ml of a 70 micrograms OVA and 30 mg aluminium hydroxide (ALUM)/ml PBS solution. Group 3 (n=10) was splenectomized and sensitized as group 2. Anti-OVA IgE titers were determinate by Passive Cutaneous Anaphylaxis Test (PCA). Rabbits from groups 2 and 3 were challenged with 150 mg OVA in 20 ml PBS by instillation with an intragastric canula. Samples from cecum were fixed in Carnoy and stained with AB pH<1 24 hours after challenge. AB- positive mast cells were counted in 20 fields per animal at X400. Group 1 showed $1.33 + 0.82$ mast cell per field; group 2: $12.88 + 2.17$ ($p < 0.05$); Group 3: $11.67 + 2.37$ ($p < 0.05$). Results showed, firstly, an important increase in the number of mucosal mast cell in sensitized and challenged groups which indicates the delivery of chemoattractants for recruitment of mast cell and secondly, that splenectomy induces no modifications in such mast cell increase, as seen in the not-splenectomized group.

KEY WORDS: Rabbit, Mucosal mast cell, Cecum, Splenectomy, Sensitization.

Dirección para correspondencia: N. Bassan Facultad de Ciencias Médicas. U.N.R. Santa Fe 3100. (2000) Rosario. ARGENTINA.

INTRODUCCIÓN

En intestino, los antígenos penetran en las placas de Peyer a través de las células M que los transportan envueltos en membrana y los liberan en el espacio látero basal. (Costa-Batllori et al. 1991; Gebert, A. et al., 1992; Gebert, A. et al. 1993). En ese espacio se encuentran linfocitos intraepiteliales T y B. De acuerdo a las particularidades del antígeno, éste puede interactuar con linfocitos T supresores, que inhiben la respuesta, o estimular a linfocitos B sensibles al antígeno (Ermak, T. et al. 1994) que pasan al folículo, donde se activan. Luego éstos drenan a los ganglios linfáticos mesentéricos donde proliferan y maduran, algunos a linfocitos B memoria y la mayoría a plasmoblastos (MC Ghee, J. et al. 1989). Por vía linfática pasan al torrente sanguíneo, luego a la lámina propia, a las placas de Peyer del intestino y al tejido linfático de otras mucosas, proliferan y se diferencian a plasmocitos formadores de IgA, primordialmente secretoria (MC Kay, D. et al. 1993; Xu-Amano, J. 1993).

En determinadas condiciones experimentales o patológicas se sintetiza IgE que se adhiere a la superficie mastocitaria (Perdure, M. et al. 1976). En roedores, la administración por vía intraperitoneal de OVA en dosis adecuadas genera elevados niveles de IgE anti-OVA (Tomoe, S. 1992). Un nuevo contacto del antígeno, a nivel del intestino, con células inmuno-competentes (linfocitos y mastocitos sensibilizados) desencadenan una cascada de hechos que conduce a la generación de una reacción inflamatoria aguda anafiláctica, con liberación de mediadores, edema e infiltración de eosinófilos (Ogra, P. 1996; Vinuesa, M. et al. 1997).

Los mastocitos provienen de células multipotenciales hematopoyéticas, abandonan la médula ósea como precursores mastocitarios (no morfológicamente reconocibles como tales) y adquieren su diferenciación definitiva en los tejidos colonizados (Kitamura, Y. et al. 1995).

Se diferencian dos variedades de mastocitos. Los conectivos, de ubicación preferentemente peritoneal y subcutánea, que muestran una vida media mayor de 40 días, dependen de factores liberados por fibroblastos, contienen abundante heparina e histamina, sintetizan escasos leucotrienos y tienen pocos receptores para IgE en su membrana plasmática. Los mastocitos mucosos, que predominan en intestino y pulmón, son T dependientes, su proliferación depende de linfoquinas de células T, su vida media es menor de 40 días, contienen condroitín sulfato, poca histamina, sintetizan leucotrienos C4 y B4, presentan abundantes receptores de membrana para IgE y permanecen sensibilizados hasta 12 semanas después del contac-

to con el antígeno (De Crescenzo, G. et al. 1997; Kitamura, Y. et al. 1993; Kitamura, Y. et al. 1995; Wagelie-steffen, A. et al. 1997).

La esplenectomía realizada en forma experimental en animales, o en humanos por traumatismos abdominales, produce modificaciones en los parámetros inmunológicos. En distintas especies existe disminución de IgG e IgM, de la respuesta primaria a los antígenos y de los linfocitos T (Aaberge, I. et al. 1990; Bassan, N. et al. 1997; Demeter, J. et al. 1990; Holdsworth, R.J. et al. 1990).

Es de importancia remarcar que la esplenectomía en conejos no produce, al menos en tiempo relativamente breve, hipertrofia compensadora de órganos linfáticos, como ocurre en otras especies.

En la fisiología digestiva del conejo la cecotrofia es un mecanismo típico con una influencia decisiva tanto en sus características nutricionales como en los procesos patológicos que se relacionan con la misma, siendo el ciego el órgano central de este proceso.

Los nutrientes ingeridos por el conejo son sometidos a una digestión enzimática fundamentalmente a nivel del intestino delgado y luego pasan al ciego donde se realiza la digestión bacteriana. Allí, macromoléculas en distintas etapas de degradación y potencialmente antigénicas, permanecen en contacto con la mucosa cecal entre dos y doce horas.

Si el producto de la digestión cecal abandona dicho órgano en las primeras horas de la mañana, recibe una envoltura de moco colónico, constituyendo los cecotrofos. Estos salen por el ano y son ingeridos por el animal reiniciándose el ciclo digestivo, que puede repetirse dos o tres veces (Costa-Batllori, P. et al. 1991; Fekete, s. et al. 1985; Fekete, s. 1987; Hollyster, A. et al. 1989).

Este mecanismo hace que el ciego se comporte, desde el punto de vista de la digestión, como el rumen de los poligástricos.

El ciego de conejo, donde moléculas en diferentes grado de digestión y con potencialidad antigénica permanecen en contacto con la mucosa un tiempo prolongado, constituye un modelo de sumo interés para el análisis de la reacción local de hipersensibilidad en el tubo digestivo.

En trabajos anteriores (Bassan, N. et al. 1997; Bassan et al. 1997) mostramos que en conejos sensibilizados y desafiados por vía oral con OVA se produce a nivel del ciego edema, linfangiectasia, aumento de la cantidad de eosinófilos, indicativos del pasaje de OVA a través de la barrera mucosa y su interacción con mastocitos con IgE anti-OVA. A través de la inmunomarcación con anticuerpos monoclonales se visualizaron los linfocitos intraepiteliales CD4+

que expresaron marcadores de activación MHC II R-DQ lo cual indicó: a) la penetración del antígeno (macromolécula intacta) a la mucosa intestinal; b) su contacto con células inmunes; c) el posterior desencadenamiento de anafilaxia local.

En conejos no sensibilizados, la administración de antígenos (OVA) por vía oral, no generó reacciones inflamatorias. Esto se debería a la activación de mecanismos supresores, a partir de linfocitos intraepiteliales que generan tolerancia antigénica (Bassan, N. et al.1997; Bassan, N.et al.1997).

La administración de antígenos por vía digestiva, en intestino sin alteraciones, no produce sensibilización debido a una supresión mediada por linfocitos T, mientras que si la administración es por vía intraperitoneal o subcutánea, se logra una sensibilización importante. Estos hechos nos llevaron a analizar el posible rol del bazo.

A partir de que la esplenectomía reciente produce una caída de IgM e IgG, de la respuesta primaria a los antígenos y de los linfocitos T, hipotetizamos que este hecho favorecería la tolerancia al antígeno ingresado por vía intraperitoneal. En esta etapa evaluamos la capacidad de reclutamiento mastocitario en el ciego dependiente de linfoquinas producidas por linfocitos T, contando los mastocitos de la mucosa detec-

tables con azul alciano (AB) a $\text{pH} < 1$ en el ciego de conejos normales y esplenectomizados, sensibilizados con OVA y desafiados por vía oral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejos neozelandeses adultos divididos en tres grupos. Grupo 1: (n=10) se tomó como control no sensibilizado. Grupo 2: (n=10) sensibilizado por vía intraperitoneal en dos oportunidades con 2 ml de una solución de 70 μmg de OVA y 30 mg de ALUM/ml Grupo 3: (n=10) esplenectomizados y sensibilizados de la misma forma que el grupo 2.

Los títulos de IgE específica anti-OVA fueron determinados por el test de anafilaxia cutánea pasiva (PCA).

Los conejos de los grupos 2 y 3 fueron desafiados, previo ayuno de 24 horas, por instilación con sonda intragástrica, de 150 mg de OVA en 20 ml de PBS. Las muestras de ciego, obtenidas 24 horas post desafío, se fijaron en Carnoy y se colorearon con AB $\text{pH} < 1$. Los mastocitos AB+ se contaron en 20 campos de 400X por cada animal.

Los resultados cuantificados se expresan como valores promedio y se analizaron estadísticamente con el test de "t student".

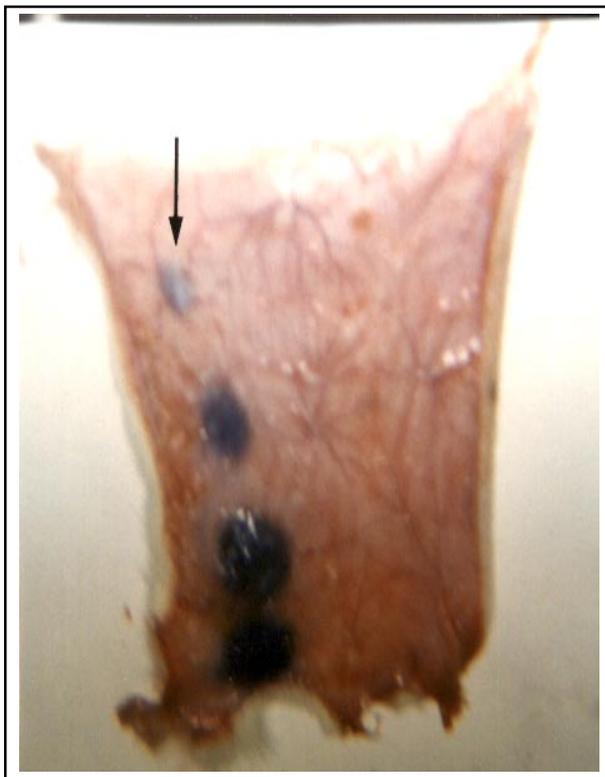


Foto N°I. Test de PCA. Positivo 1/640 para grupo 2 y 3.

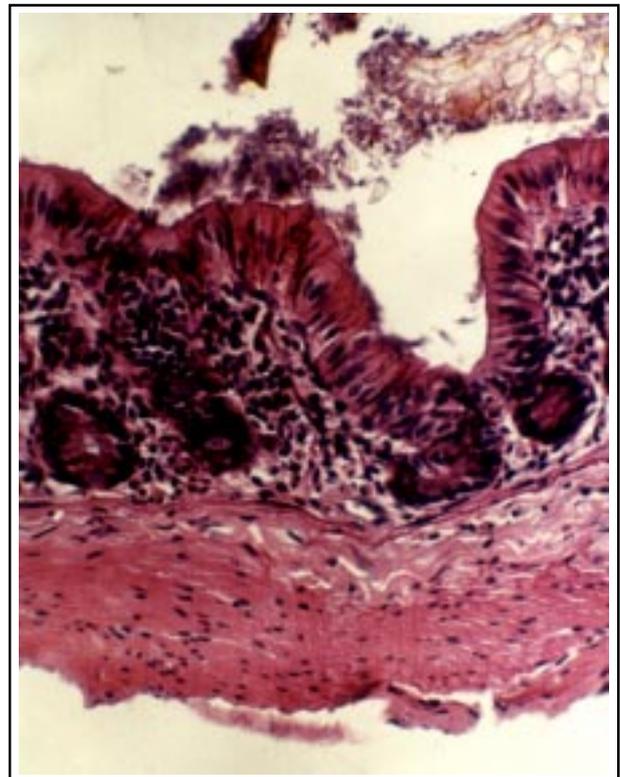


Foto N°II. Mucosa normal de ciego de conejo. HE. Aumento: 100 X.

RESULTADOS

El test de PCA fue negativo para el grupo control y positivo a la dilución 1/640 para los grupos 2 y 3 (Foto N° I).

En los grupos experimentales se observó, histopatológicamente, un intenso edema focalizado tanto en mucosa como en submucosa, con marcadas linfangiectasias y cúmulos de eosinófilos próximos al epitelio (Fotos II y III). No se detectaron diferencias entre los esplenectomizados y no esplenectomizados. El grupo 1 (control no sensibilizado) mostró $1,33 \pm 0,82$ mastocitos por campo. El grupo 2 (no esplenectomizado, sensibilizado y desafiado) $12,88 \pm 2,17$ ($p < 0,05$ en relación al grupo control) y el Grupo 3 (esplenectomizado, sensibilizado y desafiado) $11,67 \pm 2,37$ ($p < 0,05$ en relación al grupo control). No hubo diferencias significativas entre los grupos 2 y 3. (Fotos N° IV, V y VI) Tabla N°1.

Tabla N°1 Media de Mastocitos AB+ por campo 400X en ciego de conejo

GRUPOS	MASTOCITOS
GRUPO	$1,33 \pm 0,82$
GRUPO	$212,88 \pm 2,17$
GRUPO	$311,67 \pm 2,37$
Grupo 2 vs. Grupo 1 $p < 0,05$	
Grupo 3 vs. Grupo 1 $p < 0,05$	
Grupo 3 vs. Grupo 2 no significativo	

DISCUSIÓN

La dificultad para estudiar alergia alimentaria en el humano, hace necesario el desarrollo de modelos animales alternativos donde simular las condiciones capaces de producir reacciones inflamatorias de hipersensibilidad a nivel intestinal.

El conejo, por las características particulares en su fisiología digestiva, es especialmente adecuado (Fekete, S. et al. 1985; Fekete, S. et al. 1987) para su utilización como modelo en el estudio de inmunidad e hipersensibilidad mucosa. Mediante la cecotrofia realiza una primera digestión enzimática parcial a nivel del estómago e intestino delgado. Los alimentos, en distintas etapas de degradación, llegan al ciego donde continúan su digestión mediante la acción enzimática y de la flora local. Esta condición especial de la fisiología digestiva determina que macromoléculas enteras o parcialmente digeridas entren en contacto con la barrera mucosa del intestino delgado, particularmente a nivel del íleon terminal, en donde las placas de Peyer son el sitio de generación de la respuesta inmune mucosa. La permanencia en el ciego de las moléculas potencialmente antigé-

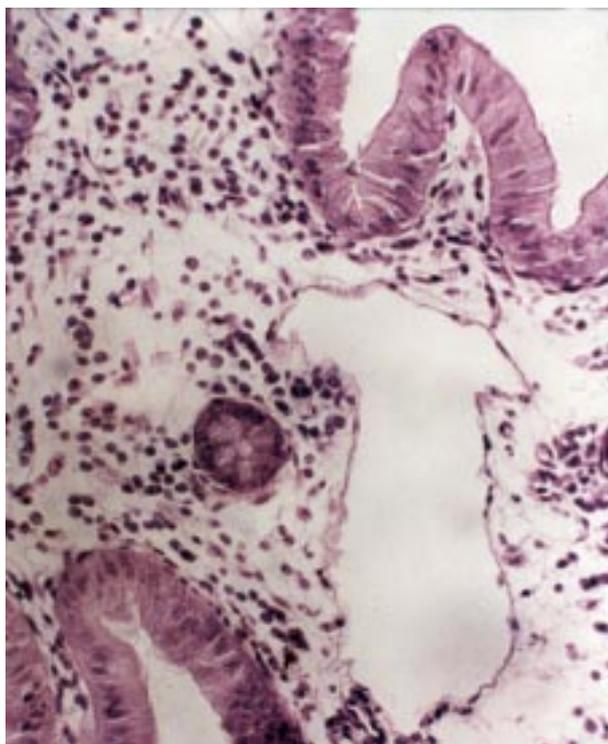


Foto N°III. Mucosa cecal de conejo sensibilizado y desafiado. Marcado edema y linfangiectasias. HE. Aumento: 200X.

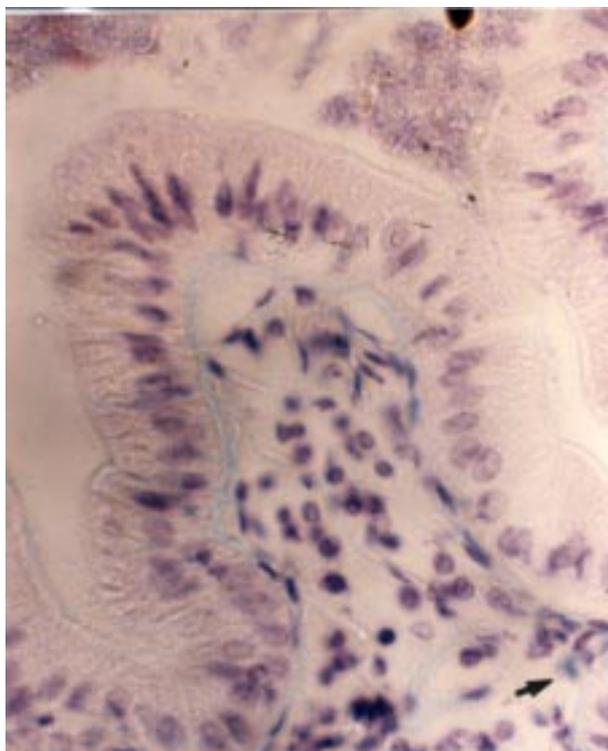


Foto N°IV. Mucosa cecal de conejo no sensibilizado. Se observaron escasos mastocitos. AB pH < 1. Aumento: 400X.

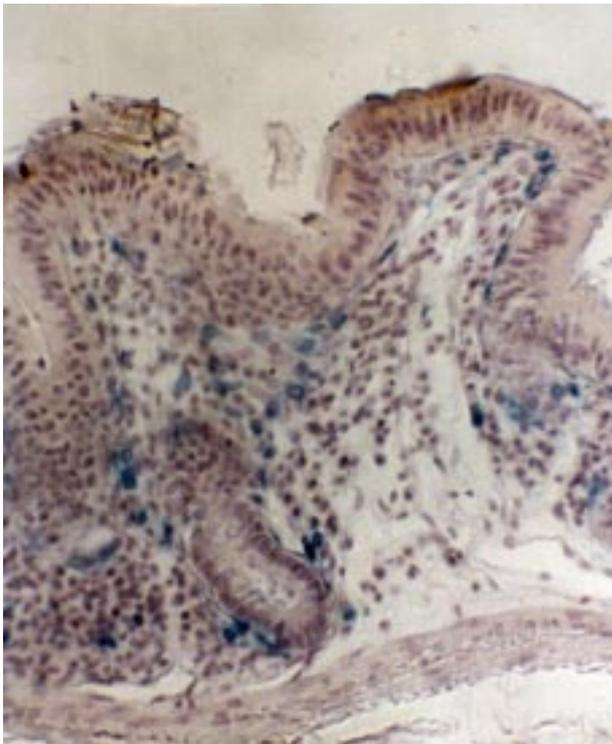


Foto N°V. Mucosa cecal de conejo sensibilizado y desafiado. Se observan abundantes mastocitos. AB pH < 1. Aumento: 200X.

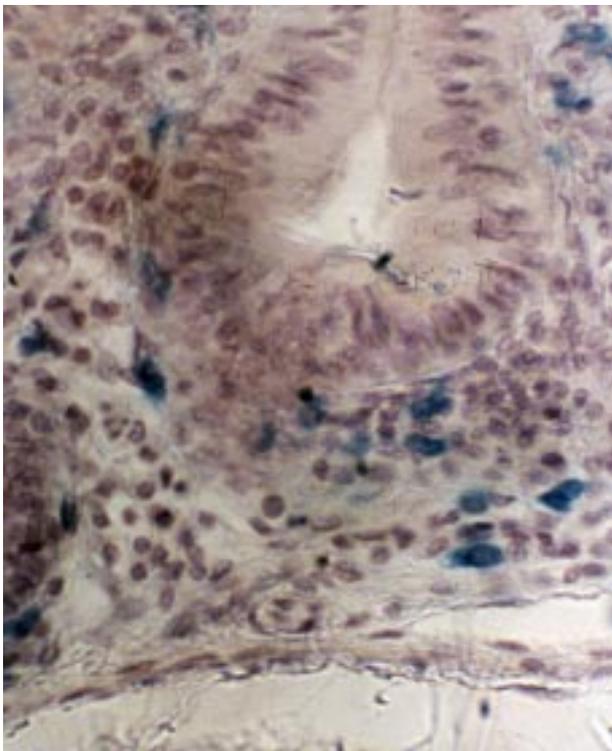


Foto N°VI. Mucosa cecal de conejo esplenectomizado, sensibilizado y desafiado. Se observan abundantes mastocitos. AB pH < 1. Aumento: 400X.

nicas por un tiempo prolongado, posibilita una respuesta anafiláctica local a nivel de la mucosa de dicho órgano. Los hechos mencionados, característicos del conejo, presentan similitud con algunas condiciones patológicas del humano, donde en individuos con alteraciones de digestibilidad o de la barrera mucosa intestinal, ingresan a nivel del íleon, macromoléculas potencialmente antigénicas.

En nuestro estudio demostramos en los animales sensibilizados, mediante el test de anafilaxia cutánea pasiva (PCA), elevado nivel de IgE anti-OVA, lo cual permite inferir la presencia en las mucosas, de mastocitos con moléculas de IgE anti-OVA adheridas a su membrana.

En los animales sensibilizados y desafiados, la liberación de factores vasoactivos se detecta por el edema, la dilatación vascular y el aumento de eosinófilos a nivel de la mucosa cecal, lo cual es indicativo del pasaje de OVA a través de la barrera mucosa y su interacción con los mastocitos con IgE anti-OVA.

El aumento de mastocitos se debería a la producción de IgE e IgG como respuesta a la sensibilización. La IgE actúa sobre el receptor Fc épsilon 1 del mastocito y la IgG lo hace sobre el receptor Fc Gamma 3, estimulando en forma directa la producción de mastocitos. (Male, D. 1991). También lo hacen las interleucinas 3, 4, 9 y 10, la primera en forma directa y las restantes como cofactores para la proliferación mastocitaria (Kitamura, Y et al. 1993).

Los resultados muestran, en primer lugar, un marcado incremento de mastocitos que indicaría liberación de factores mediadores determinantes del reclutamiento mastocitario; y en segundo lugar, que la esplenectomía no afectó el incremento mastocitario a nivel del ciego, con un comportamiento similar al del grupo no esplenectomizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aaberge, Y. et al.. IgG subclasses antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in splenectomized, otherwise normal, individuals. *Scand J Immunol* 1990; 31:711-6.
2. Bassan, N. et al.. Characterization of intraepithelial T cell population in terminal ileum from OVA sensitized New Zealand rabbit. Presentado en el XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Cancún, México, Octubre 19-24. 1997
3. Bassan, N. et al. Ciego de conejos sensibilizados con ovoalbúmina y desafiados por vía oral: histoinmunopatología. Presentado en el XXXIV Congreso Argentino de Patología, Rosario, Argentina. 1997.
4. Bergmann, L. et al. Quantitative and functional restorations and alterations of peripheral lymphocytes in patients with autologous spleen implantation. *Arch Orthop Surg* 1990; 109:102-5.
5. Costa-Batllori, P.; Marzo, Y. Influencia de la nutrición en la patología cunicola. XVI Symposium Nacional de Cunicultura. 41-53. Castellón. España. 1991.
6. De Crescenzo, G. et al. Functional interactions between human mast cells and eosinophils. Proceedings of the XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Cancún. México. 1997.
7. Demeter, J. et al. Immunoglobulin profiles and antibody levels in 50 patients a long time after post-traumatic splenectomy. *J Clin Lab Immunol* 1990; 33:7-9.
8. Ermak, T. et al. Lymphocyte compartments in antigen sampling regions of rabbit mucosal lymphoid organs. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:14-28.
9. Fekete, S.; Bonori, J. The effect of the fiber and protein level of the ration upon the cecotrophy of rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1985; 8: 68-71.
10. Fekete, S. Recent finding and future perspectives of rabbit's digestive physiology. *Cuni-Sciencis* 1987; 4:1-9.
11. Gebert, A. et al. Co-localization of vimentin and cytokeratins in M-cells of rabbit gut-associated lymphoid tissue (GASLT). *Cell Tissue Res* 1992; 269: 331-40.
12. Gebert, A.; Hach, G. Differential binding of lectins to M-cells and enterocytes in the rabbit cecum. *Gastroenterol.* 1993; 105: 1350-61.
13. Holdsworth, R.J. et al. The role of the spleen in the immune response following naturally acquired exposure to encapsulated bacteria. *Int J Pathol* 1990;71: 853-63.
14. Hollyster, A. et al. Effects of water administrated probiotics and acidifiers on growth feed conversion and enteritis mortality of weaning rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1989; 12:143-147.
15. Kitamura, Y. et al. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J med Sciences* 1993; 306:185-191.
16. Kitamura, Y. et al. Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function. New York: Raven Press. 1995.
17. Male, D. "Advanced immunology". Second Edition. Gower Medical Publishing London. 1991 p 2.12-17.5
18. Mc Ghee, J. et al. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 1989; 9: 175-199.
19. Mc Kay, D.; Perdue, M. Intestinal epithelial function: The case for immunophysiological regulation. Cells and mediators. (First of two parts). *Dig Dis and Sciences* 1993; 38:1377-87.
20. Ogra, P. Mucosal immunology: Past, present and future. *Vaccinia, Vaccination and Vaccinology: Jenner, Pasteur and their successors*, 33 - 41. 1996.
21. Perdue, M. et al. Effect of intestinal anaphylaxis in rat as model of food allergy. *Clin Exp Immunol* 1976; 24:352-6.
22. Tomoe S. The in vivo depletion of CD4+ T cells prevents antigen - induced eosinophil infiltration into mouse skin. *Jpn J Allergol* 1992; 18:572-8.
23. Vinuesa. M. et al. I . In - situ expression of interleukin - 4, 5 and 6 in Peyer's Patch from Ovalbumin (OVA) - sensitized BALB/c mice after oral challenge. *International Allergology* 1997; 46:22-8.
24. Wagelie - Steffen. A. ; Metcalfe. D. Molecular mechanisms that regulate mast cell differentiation and survival . Proceeding of the XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Cancún. México. 1997.
25. Xu - Amano. J. Helper T cells subsets for IgA response: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in MALT. *J Exp Med* 1993; 178:1309- 20.