

Expresión de células CD11b-positivas en mucosa rectal de conejos sensibilizados y desafiados con ovoalbúmina

Norberto Bassan, Miguel Vinuesa, Stella Roma*

Acta Gastroenterol Latinoam 2005;35:7-12

Resumen

El receptor MAC-1 de conejo, homólogo al CD11b humano, es una proteína presente en los macrófagos. El objetivo del presente trabajo es establecer las modificaciones cuantitativas y distributivas de células CD11b-positivas participantes en la respuesta inmune a nivel de la mucosa rectal, en un modelo animal de inmunidad mucosa. Se estudiaron conejos neocelandeses divididos en tres grupos: G1: control, G2: sensibilizado con ovoalbúmina (OVA) y G3: sensibilizado y desafiado por vía rectal con OVA. Los conejos de los grupos 2 y 3 fueron sensibilizados por vía subcutánea en dos oportunidades, con 2 ml de una suspensión de 70 µg de OVA en 30 mg de hidróxido de aluminio/ml. El desafío rectal se realizó con una solución de 50 mg OVA en 5 ml de solución salina. La prueba de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) fue positiva en G2 y G3 a una dilución de 1/160. En el grupo sensibilizado y desafiado se observó edema mucoso parcheado, imágenes de linfangiectasias e infiltración de eosinófilos. Las células se contaron como número de células por campo de mayor aumento. G1: 9.64 (ES 0.22); G2: 18.10 (ES 0.09) y G3: 23.60 (ES 0.29). (G2 vs G1 $p < 0.001$; G3 vs G1 $p < 0.001$; G3 vs G2 $p < 0.001$). Concluimos que existe una relación directa entre el ingreso del antígeno alimentario OVA y el aumento en mucosa rectal del número de células CD11b-positivas, que podría corresponder al influjo de células al sitio de inflamación por la acción de factores quimiotácticos liberados luego del

desafío.

Summary

Rabbit MAC-1 receptor, homologue to human CD11b is present in macrophages. The aim of the study was to determine quantitative and distributive modifications of CD11b-positive cells that participate in immune response at rectal mucosa, in an animal model of mucosal immunity. New Zealand rabbits were divided into three groups. G1: control; G2: ovalbumin (OVA) sensitized; G3: OVA-sensitized and rectal challenged. Animals were subcutaneously sensitized twice with 70 µg OVA and 30 ml aluminium hydroxide in 2 ml saline solution. Rectal challenge was developed with a solution of 50 mg OVA in 5 ml saline solution. Sensitized groups (G2 and G3) showed a positive PCA (Passive Cutaneous Anaphylaxis) at 1/160 fold dilutions. In G3 we observed a patchy mucosal edema, lymphangiectasis and eosinophil leucocyte infiltration. Cells were counted as the number of cells per high power field. G1: 9.64 (SE 0.22); G2: 18.10 (SE 0.09) and G3: 23.60 (SE 0.29). (G2 vs G1 $p < 0.001$; G3 vs G1 $p < 0.001$; G3 vs G2 $p < 0.001$). We conclude that there is a close relationship between the food antigen OVA penetration (after challenge) and the increase of CD11b positive cells in rectal mucosa. This fact could be due to the cellular influx to the inflammatory site by the action of chemotactic factors released after challenge.

Index (palabras claves): rabbit, ovalbumin, CD11b, rectal mucosa.

* Cátedra de Histología, Citología y Embriología
Facultad de Medicina de Rosario
Universidad Abierta Interamericana
Rosario. Argentina

Correspondencia: Norberto Bassan
Muniagurria 534 - 2000 Rosario - Argentina
E-mail: norbassan@sinectis.com.ar
Fax: 0341-4216866

Introducción

El receptor MAC-1 de conejo, homólogo al CD11b humano, es una proteína de 95 kDa presente en macrófagos y granulocitos.¹ La utilización del anticuerpo monoclonal específico en inmunohistoquímica muestra una clara tinción de macrófagos.² Éstos se originan en la médula ósea, circulan en la sangre, maduran y se activan en varios tejidos. El

primer tipo celular que ingresa a la sangre periférica está incompletamente diferenciado y se denomina monocito. Una vez en los tejidos, estas células maduran y pasan a denominarse macrófagos. Los macrófagos pueden asumir diferentes formas, incluyendo células epitelioides y gigantes multinucleadas.^{3,4} A diferencia de los neutrófilos, los macrófagos son esterasa positiva, pobres en glicógeno y usualmente peroxidasa negativa.⁵

Estas células intervienen como células accesorias en el reconocimiento y activación de las respuestas inmunes adaptativas. La fase inductora de la inmunorrespuesta a nivel rectal, involucra el procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos T y/o B mucosos. Los macrófagos fueron las (Células Presentadoras de Antígeno) APC profesionales primeramente estudiadas y son además elementos críticos de la fase efectora de las respuestas inmunes, así como un elemento esencial de la inmunidad natural.^{3,4} Están normalmente presentes en el tracto gastrointestinal, sobre todo a nivel de la lámina propia, cercanos a las regiones linfoides especializadas e íntimamente asociados con una rica red de capilares linfáticos y terminales nerviosas.

Existe información contradictoria en cuanto a la función de los macrófagos en el sistema inmune de las mucosas. En algunas condiciones podrían estar relacionados con fenómenos de tolerancia de la respuesta inmune, generando un menor acceso de antígeno a las células dendríticas, y, por otro lado, en ciertas enfermedades crónicas del tubo digestivo, pueden estar activados y asumir un importante rol en condiciones de inflamación intestinal.

En el tubo digestivo los antígenos alimentarios pueden ser incorporados mediante una entrada apropiada de moléculas y producir una respuesta de tolerancia⁶ o pueden ingresar en forma inapropiada (barrera mucosa alterada), produciendo sensibilización con altos niveles de IgE específica que se une a mastocitos y basófilos.⁷⁻¹¹

Un nuevo contacto del antígeno a nivel del intestino en el individuo sensibilizado, desencadena una cascada de hechos que conducen a la generación de una reacción inflamatoria aguda anafiláctica local.¹²⁻¹⁴ Esta reacción presenta modificaciones cualitativas de la mucosa y cuantitativas de las células participantes en la referida respuesta inmune.

El conejo, por producir altos niveles de IgE ante la sensibilización y realizar la cecotrofia en su fisiología digestiva,¹⁵⁻¹⁹ resulta un modelo biológico muy útil para el estudio de la inmunidad mucosa y la alergia

alimentaria.²⁰ El recto pertenece al sistema inmune mucoso común (SIMC), lo cual determina que los procesos de sensibilización y desafío posterior con antígenos alimentarios generen modificaciones histopatológicas e inmunológicas capaces de ser evaluadas en su mucosa.²¹⁻²³

A partir de la información existente, obtenida en trabajos anteriores de nuestro grupo, inferimos que podría haber un aumento de los macrófagos en la mucosa en animales sensibilizados y desafiados, a partir del fenómeno de activación de células inmunes post sensibilización y desafío local.

Esta información nos permitiría profundizar en el conocimiento del papel de los macrófagos en la inmunidad mucosa en relación a los fenómenos de tolerancia e hipersensibilidad alimentaria en el tubo digestivo.

El objetivo del presente trabajo es establecer las modificaciones cuantitativas y distributivas de células CD11b-positivas participantes en la respuesta inmune a nivel de la mucosa rectal, en un modelo animal de inmunidad mucosa y alergia alimentaria.

Materiales y métodos

Animales. Se estudiaron 27 conejos neocelandeses machos de entre 2.5 y 3 kilos de peso, adultos jóvenes, los que se mantuvieron en jaulas individuales en el bioterio de la Cátedra de Citología, Histología y Embriología, con alimento balanceado comercial (17% de proteína como máximo y 12% de fibra como mínimo, libre de albúmina) y agua ad-libitum hasta su sacrificio. Las condiciones de los animales fueron aprobadas por el Comité de Ética de la Facultad. Los conejos se dividieron en tres grupos: Grupo 1 (n=9): Control normal; Grupo 2 (n=9): sensibilizado con ovoalbúmina (OVA) por vía subcutánea y Grupo 3 (n=9): sensibilizado por vía subcutánea con OVA y desafiado por vía rectal con OVA.

Sensibilización y desafío. Los conejos de los grupos 2 y 3 fueron sensibilizados por vía subcutánea en dos oportunidades, con un intervalo de 15 días, con 2 ml de una suspensión de 70 µg de OVA en 30 mg de hidróxido de aluminio/ml (ALUM) como adyuvante.

Quince días después de la última sensibilización, previo ayuno de 24 horas, los animales del grupo 3 fueron desafiados por vía rectal con una solución de 50 mg OVA en 5 ml de solución salina.²⁰

Todos los animales se sacrificaron por sobredosis

de éter sulfúrico. Los conejos del grupo 3 se sacrificaron 4 horas después del desafío rectal y los de los restantes grupos un mes después del inicio del estudio.

Obtención de las muestras y fijación de los tejidos. Las muestras de recto de los distintos grupos experimentales para emplearse en las técnicas de inmunohistoquímica se sumergieron en medio líquido protector para congelación rápida (OCT) y se congelaron en nitrógeno líquido, se almacenaron a -20°C y se cortaron a $8\text{ }\mu\text{m}$ con crióstato. El material para histología convencional se incluyó en parafina y cortó a $6\text{ }\mu\text{m}$.

Histología convencional. Los preparados fueron teñidos con hematoxilina-eosina, para la evaluación de la histología normal y las modificaciones histopatológicas halladas.

Inmunohistoquímica. Se utilizó una técnica de inmunohistoquímica para la visualización de macrófagos en la mucosa rectal. Los cortes por congelación, se fijaron en acetona a 4°C durante 10 minutos, se bloquearon con suero no inmune al 2 % en solución tampón TRIS salina (TBS) para evitar tinciones inespecíficas y se incubaron durante 60 minutos a 37°C con el anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo monoclonal utilizado fue: Ratón anti-conejo CD11b (MAC-1, BALB/c IgG 1, BIOSOURCE, Camarillo, California, EE.UU.).

Para la visualización de las células positivas y su revelado se empleó ABC-AP *Kit mouse* IgG- AK 5002, basado en la utilización de un complejo de avidina- biotina y fosfatasa alcalina que aumenta la sensibilidad de la técnica. El agregado de sustrato enzimático y el cromógeno produce un precipitado coloreado en el sitio de localización del antígeno que es visualizable con el microscopio óptico.

Cuantificación de Células. Las células positivas fueron contadas en 200 campos microscópicos de $400\times$ en cada grupo y expresadas como la media aritmética por campo microscópico.

Análisis Estadístico. Los resultados se expresaron como medias y las dispersiones de los datos como errores estándar. La comparación entre las variables para los distintos grupos experimentales se efectuaron por medio del análisis de variancia por rangos de Kruskal -Wallis o de la prueba U de Mann-Whitney, utilizando el programa estadístico Medcalc 3.6.

Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA). Para semicuantificar los niveles de IgE específica sérica anti

OVA en los distintos grupos de conejos, se utilizó la prueba de PCA. Para ello, ratas Wistar de 8 semanas de vida se inyectaron por vía subcutánea en el lomo, con $0,05\text{ ml}$ de suero diluido en PBS: $1/40$, $1/80$, $1/160$ y $1/320$, en dos zonas paralelas a ambos lados de la línea media dorsal. El suero empleado correspondió a tres conejos elegidos al azar por cada grupo experimental. Después de 30 minutos, las ratas se inocularon por vía endovenosa con una solución de 1 mg de OVA en $0,5\text{ ml}$ de PBS conteniendo 1% de Azul de Evan.

Las zonas previamente inyectadas con los sueros de conejo que mostraron coloración azul fueron consideradas positivas sólo cuando median 5 mm o más de diámetro.²⁴

Resultados

La PCA demostró niveles detectables de IgE anti-OVA (IgE anti-OVA) en los grupos sensibilizados (G2 y G3) a una dilución de $1/160$. Los sueros de los animales del grupo control, no mostraron positividad para esta prueba en ningún caso, demostrando ausencia de anticuerpos IgE anti-OVA específicos.

Al realizar la tinción convencional de los preparados obtenidos a partir de cortes de recto, sólo en el grupo de conejos sometido a sensibilización subcutánea y desafío rectal con OVA, pudo observarse edema mucoso, imágenes de linfangiectasia e infiltración de eosinófilos. Los animales control y los sensibilizados, no mostraron ningún signo histopatológico de edema o inflamación. El número de eosinófilos aumentó significativamente en los preparados provenientes de animales sensibilizados vía subcutánea y posteriormente desafiados con OVA, cuando se los comparó con aquellos obtenidos de conejos pertenecientes a los demás grupos experimentales. Estas células se localizan fundamentalmente alrededor de los vasos sanguíneos de la mucosa rectal.

En los animales del grupo sensibilizado (G2) y los sensibilizados y desafiados (G3) se observó marcada presencia de células CD11b positivas en la mucosa rectal. Estas células se distribuyeron en dos zonas distintas: en la región subepitelial, conformando una suerte de red en proximidades del epitelio superficial, y agregados de células positivas en mucosa superficial y profunda. (Figuras 1, 2, 3 y 4) La distribución de las células CD11b positivas en los dos grupos que mostraron un incremento en su nú-

mero (G2 y G3) fue similar, siendo la única diferencia el número de células positivas entre los dos grupos experimentales.

Los resultados de la cuantificación de las poblaciones celulares CD11b positivas en los diferentes grupos se presentan en la tabla 1.

Discusin

La OVA es un antígeno soluble que, administrado en forma subcutánea, genera sensibilización con anticuerpos IgE específicos. El desafío posterior en individuos sensibilizados con el antígeno en cuestión produce una respuesta alérgica anafiláctica en el órgano digestivo sometido a desafío.

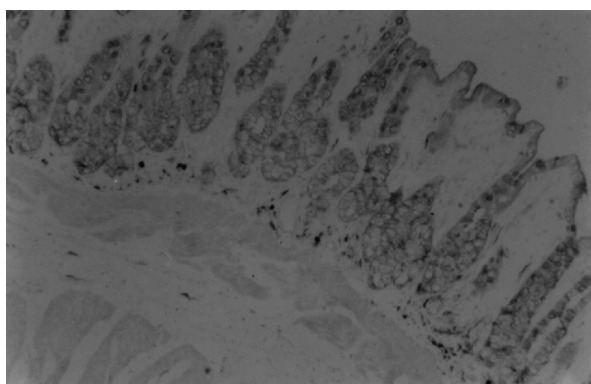


Figura 1. Células CD11b positivas en mucosa rectal de conejo del grupo control.

Se observan células CD11b positivas en mucosa sólo en proximidades de la submucosa, siendo completamente negativa en la región subepitelial. Aumento 100x.

En nuestro estudio demostramos signos de inflamación alérgica en mucosa rectal de los conejos sensibilizados por vía subcutánea y desafiados por vía local (G 3). Observamos infiltración de eosinófilos, congestión vascular y linfangiectasias, signos éstos que se manifiestan 4 horas después del desafío con el antígeno OVA.

En G 3 la utilización del anticuerpo monoclonal anti-CD11b demostró tres resultados bien definidos: aumento en el número de macrófagos en mucosa, marcada aparición de estas células en región subepitelial y agregados de células positivas en mucosa. (Figura 2)

Los macrófagos están normalmente presentes, en

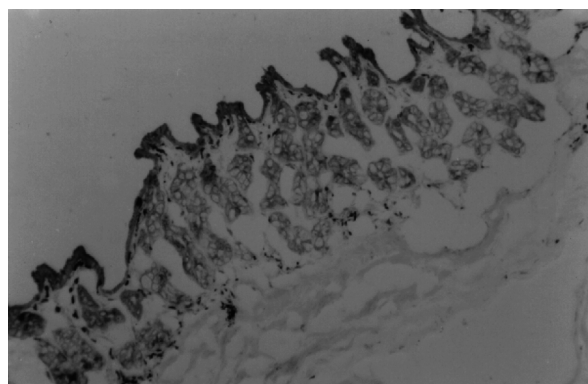


Figura 2. Células CD11b positivas en mucosa rectal de conejo sensibilizado y desafiado.

Se observa una distribución homogénea de células CD11b positivas, tanto en región superficial subepitelial como en las regiones profundas. Aumento 100x.

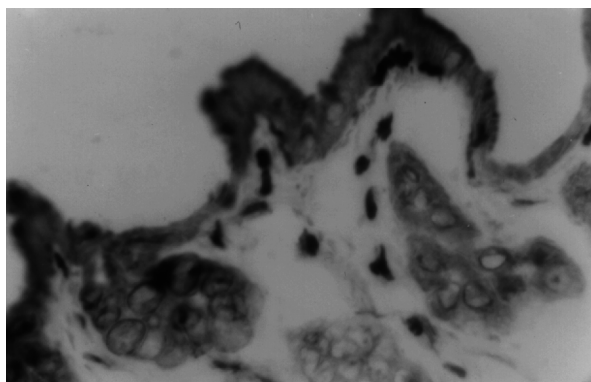


Figura 3. Células CD11b positivas en mucosa rectal de conejo sensibilizado y desafiado.

Detalle de células CD11b positivas en región subepitelial en conejos ensibilizados y desafiados. Aumento 400x.

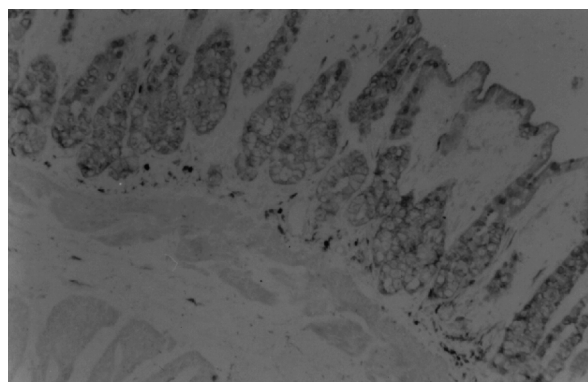


Figura 4. Células CD11b positivas en mucosa rectal de conejos sensibilizados.

Se observa una distribución homogénea de células CD11b positivas, (similar al grupo3) tanto en región superficial subepitelial como en las regiones profundas. Aumento 100x.

Tabla 1. Células CD11b positivas por campo de 400x en mucosa rectal de conejo

Grupos	G1 (n = 200)	G2 (n = 200)	G3 (n = 200)
Células CD11b+ (media aritmética ± ES)	9.64 ± 0,22	18.10 ± 0,09	23.60 ± 0,29

G2 vs. G1 p<0.001 G3 vs. G1 p<0.001 G3 vs. G2 p<0.001.

G1 = normal G 2 = sensibilizado G 3 = sensibilizado y desafiado

un número importante, en el tracto gastrointestinal, sobre todo a nivel de la lámina propia, cercanos a las regiones linfoides especializadas, separados del epitelio por la membrana basal e íntimamente asociados con una rica red de capilares, terminales nerviosas y linfáticos. Están involucrados en la fagocitosis y presentación de antígenos. Podrían también estar relacionados con algunos fenómenos de tolerancia de la respuesta inmune y no puede dejar de mencionarse que los macrófagos intestinales pueden estar activados y asumir un importante rol en condiciones de inflamación intestinal.

Se ha demostrado en enfermedades inflamatorias intestinales crónicas como la de Crohn, un incremento en el número de macrófagos en mucosa intestinal.²⁵ Si bien nuestro modelo está referido a fenómenos agudos (cuatro horas post desafío) es evidente el influjo de células CD11b al sitio de inflamación alérgica, a partir de la liberación de distintos mediadores, luego del ingreso del antígeno a nivel rectal.

Es de destacar que el marcado aumento de células CD11b en la zona subepitelial del recto en los animales desafiados, está relacionado con el ingreso vía luminal de la OVA. Este aumento podría corresponder al lugar de mayor concentración de antígeno luego de su ingreso, y, por lo tanto, mayor concentración de mediadores liberados.

Se desconoce la causa de la formación de focos celulares aislados, como ocurre en el modelo desarrollado.

En el estudio actual, la sensibilización produjo un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de macrófagos, probablemente a partir de un mayor reclutamiento de monocitos sanguíneos hacia la mucosa rectal. Dicho proceso estaría inducido por mediadores químicos y demostraría la participación de los macrófagos en la respuesta inmune local y sistémica.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Mahida y col²⁶ utilizando anticuerpos monoclonales. En otros trabajos, el mismo autor, usan-

do biopsias de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, observa un incremento de la población mucosa de macrófagos derivada de monocitos circulantes.

Son dos las conclusiones que aporta nuestro trabajo en relación a los resultados hallados. Por un lado, es evidente el marcado aumento del número de macrófagos en los animales sometidos a sensibilización y posteriormente desafiados, con todas las consecuencias histopatológicas inflamatorias descritas, confirmando la participación de los macrófagos en un fenómeno inflamatorio agudo como el generado en nuestro modelo.

El segundo aporte se refiere al incremento hallado en los animales sensibilizados y no desafiados, con un aumento significativo del número de macrófagos no relacionado con la inflamación sino con el sutil y específico fenómeno de sensibilización. Es evidente que, en dicho grupo, los macrófagos son reclutados a partir de monocitos sanguíneos por factores quimiotácticos liberados a partir de la sensibilización. Ésta se realizó utilizando ALUM que es un adyuvante que facilita una mejor producción de anticuerpos IgE.

En base a los resultados obtenidos concluimos que existe una relación funcional directa entre el número y distribución de células CD11b positivas de la mucosa rectal del conejo y el ingreso del antígeno, dependiente de las condiciones inmunológicas del animal, que podría corresponder al influjo de células por la acción de factores quimiotácticos liberados luego del desafío.

Referencias

- 1- Smet E, Smet W, Brys L, et al. Mab 198: a monoclonal antibody recognizing the complement type 3 receptor in rabbit. *Immunology* 1986;59:419-425.
- 2- Wilkinson J, McDonald S, Smith S, et al. Immunohistochemical identification of leukocyte populations in normal and inflamed synovium of rabbit. *J Pathol* 1993;170:315-320.
- 3- Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Cellular and Molecular Immunology -fourth edition-*. EE.UU. Saunders, 2000.
- 4- McGee J, Isaacson P, Wright N. *Oxford Textbook of Patho-*

- logy. UK. Oxford University Press, 1992.
- 5- Afonso A, Lousada S, Silva J, et al. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms(DAO)* 1998;34:27-37.
- 6- Holt PG. Mucosal immunity in relation to the development of oral tolerance/ sensitization. *Allergy* 1998;53:16-9.
- 7- Mayer L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:4-11.
- 8- Brandtzaeg P. The human intestinal immune system: Basic cellular and humoral mechanisms. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996;10:1-24.
- 9- Strober W, James SP. The immunologic basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1986;6:415-32.
- 10- Van Ree R, Akkerdaas J, Van Leeuwen A, et al. New perspectives for the diagnosis of food allergy. *Allergy Clin Immunol Int* 1998;12:7-12.
- 11- Sampson HA. Food allergy. *JAMA* 1997;278:1888-1894.
- 12- Placenti G, Bertolini A, Spezia E, et al. Ability of new infants formula prepared from partially hydrolysed whey to induce anaphylactic sensitization: evaluation in guinea pig model. *Allergy* 1994;49:361-364.
- 13- Miller K, Laugee J, Meredith C. The monitoring of effects of food components on immunoreactivity in experimental animals. *Allergy* 1998;53:35-37.
- 14- Vinuesa M, Tanaka Y, Hakugawa J, et al. 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;46:243-247.
- 15- Mage RG. Immunology of lagomorphs. En: *Handbook of Vertebrate Immunology*, P Pastoret, P Griebel, H Bazin and A Govaerts, eds. Academic Press, San Diego; 1998, pp 223-260.
- 16- Costa-Batlloiri P, Marzo I. Influencia de la nutrición en la patología cunicula. XVI Symposium Nacional de Cunicultura 1991;41-53 Castellón. España.
- 17- 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.
- 18- Hollyster AG. 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.
- 19- Fekete S. Recent finding and future perspectives of rabbit's digestive physiology. *Cuni-Sciences* 1987;4:1-9.
- 20- Bassan N, Vinuesa M, Roma S, et al. Biological model for detection of food antigens. *Arch Latinoam Nutr* 2002; 52:249-256.
- 21- Cellier C, Cervoni JP, Leborgne M, et al. Gluten-free diet induces regression of T-cell activation in the rectal mucosa of patients with celiac disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:1527-1530.
- 22- Ensari A, Marsh M, Loft D, et al. Morphometric analysis of intestinal mucosa. V-Quantitative histologic and immunocytochemical studies of rectal mucosa in gluten-sensitivity. *Gut* 1993;34:1225-1229.
- 23- Troncone R, Mazzarella G, Leone N, et al. Gliadin activates mucosal cell mediated immunity in cultured rectal mucosa from celiac patients and a subset of their siblings. *Gut* 1998;43:484-489.
- 24- Bassan N, Vinuesa M, Pérez F, et al. Mastocitos Azul Alciano positivos en la mucosa del ciego de conejos normales y esplenectomizados, sensibilizados y desafiados con ovoalbúmina. *Analecta Veterinaria* 1998;18:15-20.
- 25- Choy M, Walker-Smith J, Williams C, et al. Differential expression of CD25 (interleukin-2 receptor) on lamina propria T cells and macrophages in the intestinal lesions in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1990;31:1365-1370.
- 26- Mahida Y, Patel P, Gionchetti P, et al. Macrophage subpopulations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum. *Gut* 1989;30:826-834.