

# Células productoras de anticuerpos en placas de Peyer, ganglios y bazo, de ratones Balb/c inmunizados con LPS, CT y células enteras de *Vibrio cholerae*

Lastre Miriam, Cedré Bárbara, García Luis y Pérez Oliver

Instituto Finlay, Cuba

## Introducción

El ELISPOT es una técnica útil para la detección de células productoras de anticuerpos (CFA) (1). Esta permite una gran versatilidad, por la posibilidad de evaluación de linfocitos B y T, sobre todo en el estudio de la respuesta mucosa de candidatos vacunales, entre los que se encuentra *Vibrio cholerae* (2), en el que se pudiera, conociendo la cinética de recirculación, evaluar a nivel periférico eventos que ocurren a nivel mucoso.

A nivel del intestino, las placas de Peyer han sido identificadas como las estructuras fundamentales en la inducción de respuesta inmune, la que se amplifica a nivel de ganglio y bazo (órganos secundarios), mientras que la rama efectora está diseminada a través de todo el tractus (3-5).

En la protección contra *Vibrio cholerae* desempeña un papel determinante la estimulación de los linfocitos T auxiliares de tipo 2 (Th<sub>2</sub>), que además son los que predominan a nivel de las placas de Peyer (6). Estos son importantes en la ayuda a los linfocitos B, para la respuesta de anticuerpos y en la producción de linfocinas para el cambio de isotipo de inmunoglobulinas de IgG a IgA. La IgA en el proceso de secreción adquiere resistencia a la degradación enzimática, lo que permite que esta clase de anticuerpo juegue un papel importante en la protección contra *Vibrio* y sea de interés su evaluación frente a preparados vacunales en animales y humanos (6).

Teniendo en cuenta la previa introducción del ELISPOT en inmunizaciones con VA-MENGOC-BC<sup>1</sup> (7), que el interés en las vacunas orales está tomando auge y que contamos con inmunógenos de Cólera, fue de interés evaluar la presencia de CFA en diferentes órganos frente a los principales antígenos de este microorganismo.

## Material y Método

### Inmunización

Se emplearon ratones Balb/c adultos jóvenes de 20 ± 2 g al inicio del trabajo, en grupos de tres animales. En el primer experimento diseñado para la determinación de CFA de clase IgG en bazo, se inmunizaron dos grupos con células enteras inactivadas por calor y LPS (lipopolisacárido) y un tercero con CT (toxina completa de *Vibrio cholerae*) sola. Los dos grupos con LPS fueron previamente inmunizados con dos dosis espaciadas en 15 días, por vía subcutánea con 1,5 x 10<sup>9</sup> células, de la cepa E7946 El Tor Ogawa (O) o la 569B Inaba (I), en adyuvante completo y luego incompleto de Freund. A los 25 y 35 días se les desafió por vía endovenosa con 200 µg de LPS purificado uno del serotipo correspondiente.

El tercer grupo, inmunizado con toxina recibió *per os* 10 µg de CT en 2 dosis con 10 días de separación. La IgG total se determinó en los dos grupos que recibieron células enteras asumiéndolos como un grupo. Existió como control un grupo no inmunizado. Todos los animales fueron sacrificados a los 7 días de la última dosis.

En el segundo experimento con vistas a determinar las CFA de clase IgA y la cinética de IgG en diferentes órganos, se inocularon los ratones por vía intragástrica, tres veces (0, 2 y 4 días), con ayuda de una cánula y anestesia. Se les administró 300 µl de Cimetidina con Bicarbonato de Sodio al 5%, éste último se repitió a los 15 min., para neutralizar la acidez gástrica. Quince minutos después se les administró 10<sup>9</sup> células vivas de la cepa C7258 El Tor Ogawa en PBS. Los animales fueron mantenidos sin agua durante 2 horas. Los ratones en grupos de tres fueron sacrificados a los 4, 6 y 7 días de la inmunización.

**ELISPOT**

Para la evaluación de las CFA se utilizaron placas de 96 pozos según descrito (7). En el primer experimento se empleó en el recubrimiento 3 nmol/mL de GM<sub>1</sub>, 3 µg/mL de CT, 25 µg/mL de LPS O o I, 10 µg/mL de anti-IgG de ratón y PBS como control. En el segundo el recubrimiento fue CT. Los antígenos fueron mantenidos a 4 °C durante toda la noche, se bloqueó y se añadieron 0.5 x 10<sup>6</sup> células de bazo por pozo en el primer experimento y de placas de Peyer, ganglio o bazo en el segundo, durante 4 horas a 37 °C. Se añadió el conjugado (anti-IgG o IgA) marcado con peroxidasa y se reveló con DAB. Los resultados fueron procesados y expresados como CFA x 10<sup>6</sup> ó 10<sup>7</sup> células.

**Resultados y Discusión**

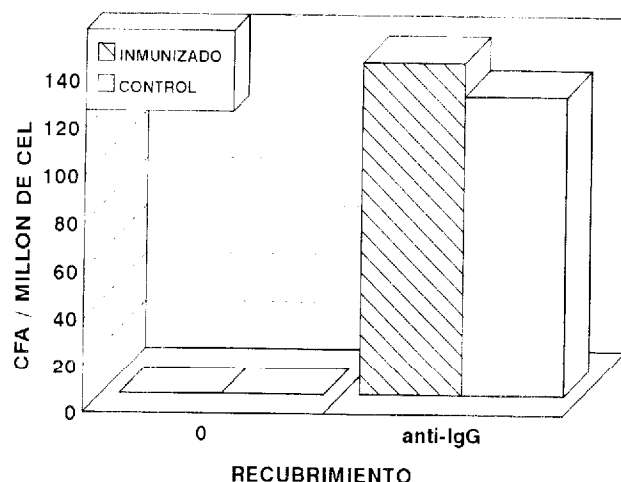
La importante inaccesibilidad mucosa para la evaluación de la respuesta efectora a ese nivel, hace que se tenga que buscar alternativas periféricas para determinar la inducción de respuesta en inmunizaciones activas o naturales por vía oral. La técnica Vibriocida (8) en suero de humanos es uno de estos casos, encontrándose cierta correlación entre la presencia de estos anticuerpos de clase IgG y la protección (9). El ELISPOT es otra alternativa con la desventaja de ser su positividad periférica transitoria y con la ventaja de poderse determinar clases y subclases de IgG, IgM e IgA. Esta última refleja mejor la protección mucosa al pensarse que son los anticuerpos de clase IgA los que protegen esencialmente las mucosas contra la adhesión y/o colonización de *Vibrio* al intestino, así como neutralizan el efecto de la toxina a ese nivel mediante la inactivación de CTB impidiendo su unión al gangliósido GM<sub>1</sub>. La determinación de anticuerpos por ELISA en suero es una técnica ampliamente utilizada; pero la IgA a nivel mucoso conlleva a extraer por sondas o por lavados el contenido intestinal, lo que hace esta evaluación impracticable cuando se trata de un número elevado de voluntarios o en una prueba de campo. Por último no existen reportes sobre Cólera a nuestro alcance que correlacionen la IgA sérica con la producida a nivel mucosa y sí la evaluada por ELISPOT (10).

Por estas razones la elección del ELISPOT era aconsejable y ha sido recomendada para la evaluación de cualquier inmunógeno de Cólera. En el presente trabajo se exponen los primeros resultados de la evaluación de esta técnica en animales inmunizados: por diferentes vías; con varios inmunógenos y

determinando la respuesta en varios órganos y de diferentes clases de anticuerpos.

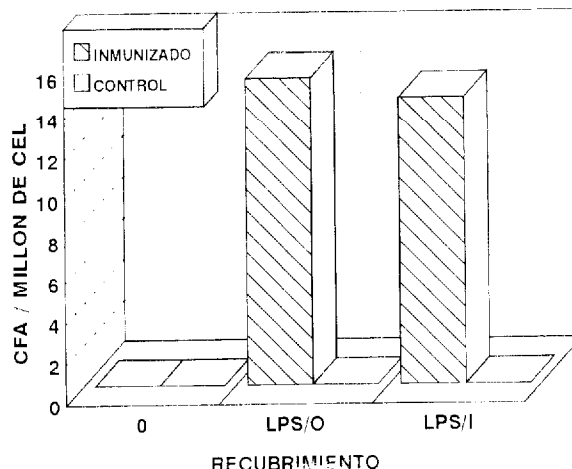
La presencia de linfocitos B fue determinada empleando como recubrimiento anti-IgG de ratón y como puede observarse la presencia de CFA IgG totales se encontró, no sólo en los animales inmunizados, sino también en los controles (p > 0.05). Esto es de esperar por referirse a todas las células B que portan IgG de superficie (Fig.1).

Fig. 1. Células Formadoras de Anticuerpos IgG totales de bazo de Balb/c controles e inmunizados con células enteras de Cólera



La respuesta obtenida frente a los LPS de los dos serotipos Ogawa e Inaba fue semejante (Fig.2).

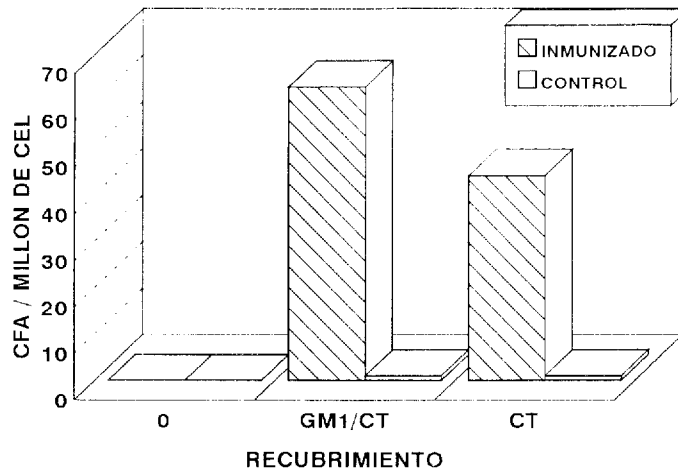
Fig. 2. Células Formadoras de Anticuerpos IgG en bazo de Balb/c después de 7 días de inmunizados con células enteras y Lipopolisacáridos



La respuesta anti-CT fue significativa ( $p < 0.05$ ) entre los inmunizados y los controles y el previo recubrimiento con GM<sub>1</sub>, si bien incrementa la respuesta, no es imprescindible, es decir el CT se fija

adecuadamente al soporte empleado, no obstante tanto para el ELISA como el ELISPOT se prefiere recubrir con GM<sub>1</sub>, que es más barato que el CT o CTB (Fig.3).

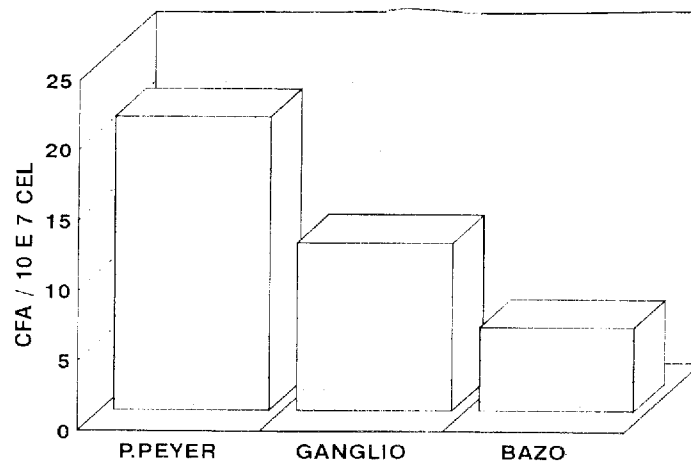
Fig. 3. Células Formadoras de Anticuerpos IgG en bazo de Balb/c después de 7 días de inmunizados con Toxina de Cólera



La evaluación a nivel de las Placas de Peyer es importante, por ser este el órgano aferente de la respuesta a nivel del intestino. Algunos reportes señalan que los linfocitos inducidos allí pudieran también proteger a otros niveles mucosos, como el

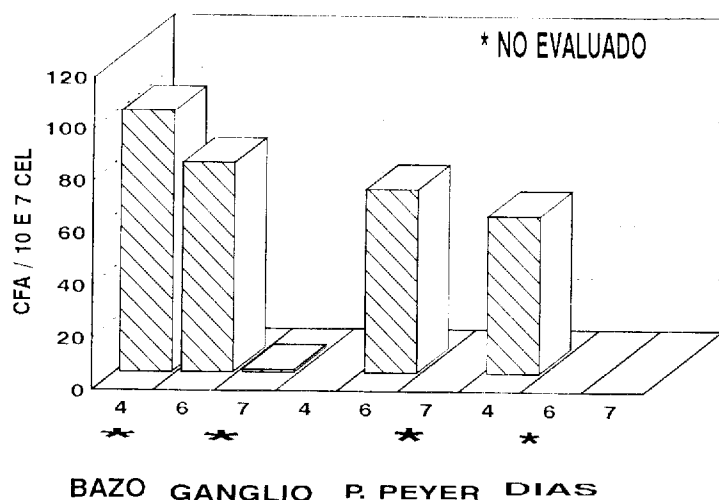
respiratorio (11). Por ello este órgano fue diana de nuestro interés, demostrándose que la respuesta de IgA, a los siete días de inmunizados, es detectable en ellas, así como en ganglio y bazo (Fig.4).

Fig. 4. Células Formadoras de Anticuerpos (IgA) en órganos de Balb/c inmunizados con tres dosis de Cólera, cepa C72258, frente a CT



El estudio cinético de la respuesta IgG, evaluado completamente en bazo, muestra un mayor número de CFA a los 4 y 6 días en comparación con los 7 días ( $p < 0.05$ ). Las IgG también estaban presentes en ganglios y placas de Peyer (Fig. 5).

Fig. 5. Cinética de Células Formadoras de Anticuerpos (IgG) en órganos de Balb/c, inmunizados con tres dosis de Cólera, cepa C7258



Estos resultados evidencian que CT es más inmunogénica que el LPS, al menos en el esquema, vía y dosis empleados. Los mismos confirman lo reportado en la literatura en el sentido de que la toxina de Cólera es un buen inmunógeno tanto por vía oral como parenteral y además con reconocido poder adyuvante oral (12-14). La respuesta de CFA obtenida por células enteras muertas fue superior a las de la inmunización con células vivas, no obstante es aconsejable realizar un ensayo en iguales condiciones (vías, adyuvantes, dosis, etc.) para evaluar la capacidad inmunogénica de las células vivas y muertas de *V. cholerae*.

### Referencias

1. Czerkinsky C, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlohy O and Tarkonski A. A solid phase enzyme linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody secreting cells. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65, 109.
2. Hornquist E, Goldschmidt T J, Holmdahl R and Lycke N. Host Defense against Cholera toxin is strongly CD4+ T cell dependent. *Infection and Immunity*. 1991; 59, 393.
3. Ernst P B, Underdown B J and Bienenstock J. Immunity in the mucosal tissues. In: *Basic and Clinical Immunology*. Eds. Stites D P, Stobo J D and Wells J V, California 1987.
4. Bienenstock J and Befus A D. Mucosal immunology - review. *Immunology* 1980, 41: 249 Tomasi T B. Mechanisms of immune regulation at mucosal surfaces. *Rev. Infect. Dis*. 1983, 5: S784
5. Hornquist E. T cell regulation of intestinal immunity. Experimental studies using cholera toxin as a mucosal adjuvant. Doctoral these 1994, Departement of Medical Microbiology and Immunology, University of Goteborg, Sweden.
6. Lastre M, Batista A, Sierra G y Pérez O. Cuantificación de Células Formadoras de IgG Totales y Específicas por ELISPOT en Balb/c durante la respuesta primaria de VA-MENGOC-BC. *VacciMonitor*, 1995, (7):2
7. Benenson A S, Saad A and Mosley W H. Serological studies in Cholera. The vibriocidal antibody response of Cholera patients determined by a microtechnique. *Bull. Wld. Hlth. Org*. 1968, 38: 267
8. Wasserman S S, Losonsky G A, Noriega F, Tacket C O, Castañeda E and Levine M M. Kinetics of the vibriocidal antibody response to live oral Cholera vaccines. *Vaccine*, 1994, 12 (11):1000.
9. Jertborn M Svennerholm A-M and Holmgren. Intestinal and systemic immune response in human after oral immunization with a bivalent B subunit-01/0139 whole cell cholera vaccine, in preparation.
10. Dunkley M and Cripps A. An important role for intestinally derived T cells in respiratory defence. *Imm. Today*, 1995, 16:231.
11. Hirabayashi, S. I. Tamura, K. Shimada and T. Kurata. Involvement of antigen-presenting cells in the enhancement of the *in vitro* antibody responses by cholera toxin B subunit. *Immunology*. 1992, 75; 493-498.
12. Vajdy and N.Y. Lycke. Cholera toxin adjuvant promotes long-term immunological memory in the gut mucosa to unrelated immunogens after oral immunization *Immunology*. 1992, 75: 488-492.
13. Charlotta Bergquist, Teresa Lagergård, Marianne Lindblad and Jan Holmgren. Local and systemic antibody responses to Dextran-Cholera Toxin B subunit Conjugates. *Infection and Immunity*. May 1995, 2021-2025.