

Modificaciones morfológicas en las expresiones del tejido linforeticular asociado a intestino (galt) en ratones tratados con leche fermentada bio

Minella, Kirian*; Costamagna, Alicia*; Fuentes, Marta*; Giugni, María C.*; Theiller, Elvira** Reus, Verónica*; Benmelej, Adriana*; Cabagna, Mariana*; Alby, Juan C.*; Moreira, Matilde*

Colaboración técnica: Gallo, J. E.*

* Cátedra de Morfología Normal

** Departamento de Bioquímica Clínica. Área Inmunología.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. U.N.L. C.C. 242. Ciudad Universitaria. Paraje "El Pozo" (3000) Santa Fe. (Pcia. Santa Fe). Argentina - E-mail: kminella@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Son numerosos los efectos benéficos atribuidos a los probióticos. Más aún, bacterias lácticas administradas oralmente a ratones, aumentan la respuesta inmune específica e inespecífica.

Nos propusimos estudiar modificaciones morfológicas del GALT en ratones, por efecto de la leche probiótica Bio (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*).

Analizamos el tejido linfoides folicular y difuso, tanto del compartimiento intraepitelial (LIE), como de la lámina propia, con técnicas de coloraciones específicas.

Los resultados muestran un incremento progresivo en la cantidad de linfocitos en lámina propia y la presencia de extensas placas de Peyer en ratones tratados, con profusa irrigación e importante cantidad de macrófagos y células dendríticas.

Los LIE se encuentran en cantidad significativamente mayor en el epitelio de las vellosidades de ratones del lote experimental (LE: $\bar{x}=4,33$; LC: $\bar{x}=1,67$); así como mayor área total ocupada por placas de Peyer (LE: 12,27 mm²; LC: 3,02 mm²) a siete días de tratamiento.

Palabras claves: leche probiótica - placa de Peyer - linfocito intraepitelial - macrófago.

SUMMARY: Tissue (galt) in mice treated with milk fermented with probiotics. Minella, K.*; Costamagna, A.*; Fuentes, M.*; Giugni, M.C.*; Theiller, E.** Reus, V.*; Benmelej, A.*; Cabagna, M.*; Alby, J. C.*; Moreira, M.* There exist numerous beneficial effects attributed to probiotics. Moreover, lactic bacteria orally administered to mice increase the specific and non-specific immune response.

Our aim was to study morphologic alterations of GALT in mice under the effect of probiotic milk Bio (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*).

We analysed the follicular and diffuse lymphoid tissue of the intraepithelial lymphocytes (IEL) and of the lamina propria, using specific staining techniques.

Results showed a progressive increase of the amount of lymphocytes in the lamina propria and the presence of large Peyer's patches in mice treated, with abundant irrigation and a significant quantity of macrophages and dendritic cells.

The IEL are found in greater quantities in the villus epithelia of mice from the experimental group (LE: $\bar{x}=4,33$; LC: $\bar{x}=1,67$) as well as a larger total area occupied by Peyer's patches (LE: 12,27 mm²; LC: 3,02 mm²) after seven days of treatment.

Key words: probiotic milk - Peyer patches - intraepithelial lymphocytes - macrophages.

Introducción

Se ha definido a los probióticos como un "suplemento alimentario bacteriano vivo que beneficia la salud de quien lo consume". Son numerosos los efectos benéficos atribuidos a estos microorganismos, no sólo por favorecer la digestión/absorción de los nutrientes, sino también por los efectos terapéuticos a nivel intestinal. Particularmente, leche con

agregado de *Lactobacillus acidophilus* (L.a.) y *Lactobacillus casei* (L.c.) en una concentración de 10^9 microorganismos por mililitro, seleccionados y tipificados de flora normal de intestino de niños sanos, ha sido utilizada para tratamiento y prevención de diarreas crónicas con resultados altamente significativos (1,2).

Investigaciones con animales de experimentación demuestran que determinadas bacterias lácticas asociadas a la mucosa intestinal pueden influenciar los niveles de activación de las células inmunes presentes en GALT (Gut Associated Lymphoreticular Tissue) (3).

En ratones, las bacterias lácticas introducidas por vía oral, aumentan la respuesta inmune sistémica, por incremento en la respuesta específica y no específica del huésped, del mismo modo que cuando aquellas son inoculadas por vía intraperitoneal. A su vez, no se encontraron diferencias significativas entre células viables y no viables cuando pasan a través del tracto intestinal (4).

Los resultados publicados se refieren a pruebas funcionales que demuestran una activación del sistema fagocítico mononuclear por incremento de la actividad fagocítica *in vitro* (5).

Asimismo se han publicado estudios vinculados con la acción de bacterias lácticas sobre inmunidad en mucosa gastrointestinal en relación al incremento de la síntesis de IgA secretoria (IgA-S) y a la capacidad protectora contra infecciones entéricas, concluyéndose que la protección frente a enteropatógenos está más relacionada al incremento en la síntesis de IgA-S que a la capacidad de producir sustancias antimicrobianas *in vivo* (6).

Ante evidencias de la fuerte actividad adyuvante, responsable del aumento de la respuesta inmune del huésped ejercida por la administración oral de lactobacilos (7), es esperable la modificación cuali y cuantitativa de elementos celulares involucrados en la respuesta inmune del intestino delgado.

El presente trabajo se propone poner de manifiesto aspectos morfológicos relacionados al soporte estructural del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal, desde un punto de vista dinámico, estudiando el efecto de la administración oral de leche fermentada con *L. a.* y *L. c.* en ratones, por períodos progresivos de tiempo. Dichos aspectos podrían aportar conocimientos para dilucidar los mecanismos involucrados en el incremento de la respuesta inmunológica, tanto específica como inespecífica.

Materiales y métodos

Animales

Ratones de la cepa BALB/c sin discriminación de sexo, provenientes de la Academia de Medicina, y reproducidos por endocria en nuestro bioterio, fueron separados de sus progenitores a los 21 días de vida y distribuidos aleatoriamente en dos lotes: control (LC) y experimental (LE), de 12 animales cada uno. Los animales fueron alojados en cajas de poliuretano y mantenidos libres de contaminación, en número de cuatro por cada jaula.

Procedimiento de alimentación

Al lote control se le suministró alimento balanceado comercial y agua de canilla, en tanto el experimental recibió la misma dieta, reemplazando el agua de bebida con leche probiótica diluida al 20% SanCor Bio. Este producto comercial, desarrollado conjuntamente con el CERELA - CONICET, es adicionado con microorganismos (*L. Acidophilus* CRL 730 y *L. Casei* CRL 431) (8).

Todos los animales recibieron comida y bebida *ad libitum*, siendo esta última renovada diariamente.

Técnica histológica

Cuatro animales de cada lote fueron sacrificados, previa anestesia, a los dos, cinco y siete días de comenzar el ensayo, a fin de disecar el intestino delgado en su totalidad, para realizar estudios histológicos.

Diez trozos secuenciales de un centímetro de longitud para cada animal, se fijaron en formol tamponado y se procesaron según la técnica histológica habitual con inclusión en parafina, obteniéndose cortes longitudinales de los mismos, de 5μ de espesor (9).

Todos los cortes fueron sometidos a las siguientes coloraciones: (10,11).

Hematoxilina - Eosina (H-E)

P.A.S.

Giemsa.

Impregnación argéntica de Del Río Hortega - Polak.

Microscopía óptica

Los preparados fueron analizados cuali y cuantitativamente, según la técnica de doble ciego, considerando particularmente aspectos referidos al tejido linfático asociado a mucosas. Así, se tuvieron en cuenta:

- Cantidad de linfocitos en lámina propia, en cortes teñidos con H-E y Giemsa, utilizando como criterio de semi-cuantificación la adjudicación de 1 a 4 cruces.

- Cantidad de linfocitos en el epitelio de las vellosidades intestinales (LIE), teñidos con Giemsa.

- Cuantificación de LIE: se consideró el número total de linfocitos intraepiteliales presentes, contados en un total de 10 vellosidades intestinales en cortes transversales de diámetros equivalentes, para cada preparado histológico de ambos lotes de ratones.

- Área ocupada por nódulos linfáticos aislados y/o confluyentes, conformando placas de Peyer, mediante evaluación morfométrica.

Morfometría

El análisis morfométrico se realizó en forma manual, ante la imposibilidad de contar con digitalizador de imágenes. Existiendo en la superficie a medir una cantidad de células muy alta, se recurrió a una cuadrícula de superficie conocida y se procedió a cuantificar el área ocupada por tejido linfático. Se consideró como unidad de superficie un cuadrado de 0,1 mm de lado ($\text{Sup. } 10^{-2} \text{ mm}^2$), utilizando ocular y objetivo de 10 aumentos.

El área cuantificada es representativa de la cantidad de tejido linfático respecto al área tisular total ocupada por 10 cortes del intestino de los cuatro animales de cada lote.

- Características morfológicas y tintoriales de células del sistema mononuclear fagocítico (macrófagos y células dendríticas) de las placas de Peyer en cortes coloreados con H-E, P.A.S. e impregnación argéntica (12).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en la cuantificación de linfocitos intraepiteliales, como así también las áreas ocupadas por tejido linfático, fue realizado con test de comparación de medias para muestras independientes, utilizando el Software SPSS 10.0.

Resultados y discusión

Análisis cualitativo y semi-cuantitativo

Respecto a la presencia de linfocitos en lámina propia, se observa un incremento progresivo en la

cantidad de los mismos que va de dos cruces (+ +) para las 48 hs., tres cruces (+ + +) para el día 5; y hasta cuatro cruces (+ + + +) en el día 7, tomando como referencia una cruz (+) para el lote control. En el lote experimental sacrificado el séptimo día se aprecia un mayor incremento de linfocitos en la lámina propia interglandular respecto al corion de las vellosidades.

Los animales que fueron alimentados durante siete días con dieta experimental, muestran extensas placas de Peyer en diferentes tramos de su intestino delgado.

Debido probablemente a su importante extensión, las placas de Peyer del grupo experimental presentan en su seno una intensa irrigación, así como conglomerados celulares en los que predominan los polimorfonucleares. Se advierte la presencia de células mononucleares de citoplasma acidófilo a la H-E y granulaciones irregulares intra y extracelulares, que manifiestan positividad a la reacción de P.A.S. (Fig. 1).

En el área del domo, la placa de Peyer se encuentra revestida de células de citoplasma eosinófilo, de altura menor al enterocito. Adyacente a las mismas y distribuidas en la placa, se evidencia una importante cantidad de macrófagos y/o células dendríticas, identificadas con impregnación argéntica (Fig. 2).

Análisis cuantitativo

– Cuantificación de LIE

Los valores de linfocitos intraepiteliales contados en el epitelio de las vellosidades muestran diferencias significativas entre ambos lotes solamente a los siete días de tratamiento con el probiótico ($t = 12,550$; $p < 10^{-4}$)

La Tabla 1 expresa los valores promedio para cada animal, de dichas células. Las mismas pueden observarse en la microfotografía (Fig. 3).

– Morfometría

En la Tabla 2 se expresan las sumatorias de los valores del área ocupada por nódulos aislados y placas de Peyer de todos los tramos de intestino analizados (10 por animal), para el lote control y el lote experimental, correspondientes a los dos, cinco y siete días de tratamiento.

Si bien, como puede apreciarse, las áreas totales muestran diferencias importantes en la cantidad de tejido linfático que expresa el LE respecto al LC, para los tres lapsos de tiempo estudiados, el trata-

miento estadístico revela diferencia significativa sólo para el lote sacrificado a los siete días de tratamiento con leche probiótica ($t= 4,995$; $p < 10^{-2}$)

La respuesta inmune local y la homeostasis de mucosa dependen de un tráfico coordinado de linfocitos B y T de memoria y efectores. La extravasación de tales células primarias a sitios efectores secretorios, parece ser conducida, al menos en parte, por muchos sets dinámicamente coordinados de moléculas de adhesión endoteliales y leucocitarias que interactúan de manera definida para producir eventos combinatorios múltiples (13).

Esta regulación de la migración celular a través de sitios titulares linfoides inductores organizados, como el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), y de sitios efectores secretorios expuestos a antígenos, como la mucosa regional y las glándulas exócrinas, es la base para la integración y aparente regionalización del sistema inmune de mucosas.

Estructuras hísticas de importancia inmunofisiológica, como las placas de Peyer, incrementadas en forma significativa a los siete días del tratamiento con probióticos, pueden constituir un elemento de interpretación de posibles vías de circulación activadas por acción de estos antígenos.

En esas extensas placas de Peyer, que presentan un incremento en su capilarización, se denota la presencia tanto de células polimorfonucleares como monomorfonucleares, evidenciada por la P.A.S. positividad. Esta observación da un soporte morfológico a los hallazgos funcionales relacionados con el incremento de la actividad inmunológica.

La presencia de abundantes centros germinales, sugiriendo un incremento de células B, podrían explicar publicaciones previas que señalan un incremento de la concentración de IgA-S en animales tratados e inoculados con *Salmonella typhimurium* (14).

La presencia, evidenciada con coloración argéntica, de células del sistema fagocítico en la zona próxima al epitelio del área del domo, permite inferir la actividad de captación del antígeno proteínico que, emergiendo de las células M, pasaría luego a ser presentado a las células T de la placa de Peyer,

provocando su proliferación y producción de citocinas. Este hallazgo constituye un nuevo aporte morfológico para la fundamentación del conocido incremento de la inmunidad local y sistémica.

La lámina propia intestinal, por su parte, presenta normalmente una celularidad muy compleja, con células T, células B, macrófagos, células dendríticas y precursores de células cebadas; y a la vez dinámica, ya que la misma depende del ambiente antigénico que soporta. Nuestros hallazgos expresan un incremento en la proporción de linfocitos, que se acentúa a medida que transcurre el tiempo de exposición al antígeno administrado oralmente, alcanzando su máxima expresión en el día 7 de tratamiento con la combinación de probióticos (*L.c* y *L. a.*).

Otros investigadores han demostrado un incremento en la infiltración linfocítica de la lámina propia de intestino a los cinco días de tratamiento con *Lactobacillus casei*, con un descenso en el día séptimo (15), no habiéndose encontrado otras referencias de aspectos morfológicos relacionados.

Entre estos linfocitos, la población de células T exhibe un marcador relacionado con células de memoria, y tiene pobre respuesta a estímulos proliferativos, pero puede responder produciendo cantidades importantes de linfocinas. (16).

Siendo los LIE una población fenotípicamente diferente de las poblaciones celulares de la lámina propia, ya que provienen de médula ósea y se especializan en el entorno del epitelio intestinal, es presumible que la diferenciación acaecida ocurra de alguna manera asociada a los antígenos encontrados en dicho ambiente.

Estas células, al estimularse, proliferan escasamente; no obstante, nuestros resultados denotan un incremento significativo al finalizar los siete días de tratamiento. El hallazgo adquiere importancia si se tiene en cuenta que los LIE producen cantidades abundantes de variadas citoquinas y median en la función citotóxica. Esto sugiere que actúan como células efectoras citolíticas. De esta forma pueden disminuir la capacidad de los patógenos para colonizar la mucosa, siendo el blanco las células epiteliales a las que aquellos pretenden invadir.

Figura 1: Irrigación en placa de Peyer. Gránulos P.A.S. positivos, leucocitos en la luz. Lote Experimental. P.A.S. (1000X).

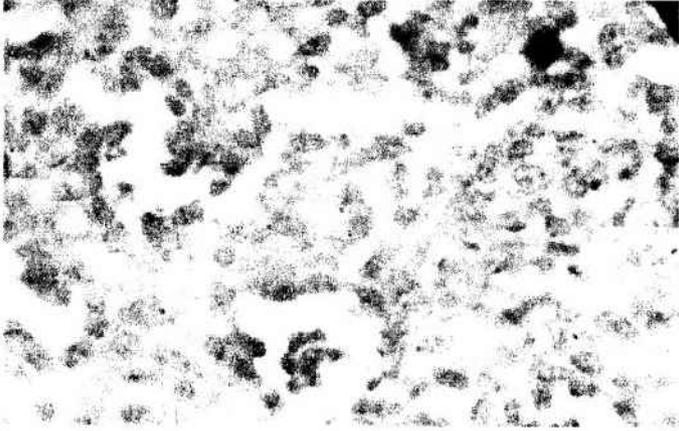


Figura 2: Placa de Peyer. Gran densidad de células dendríticas y macrófagos bajo el epitelio del domo. Lote experimental. Del Río Hortega – Polak. (100X).

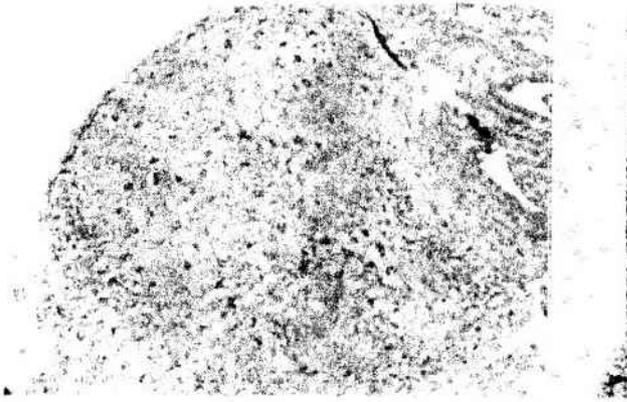


Figura 3: Linfocitos intraepiteliales (LIE) Lote Experimental. Giemsa. (1000X).

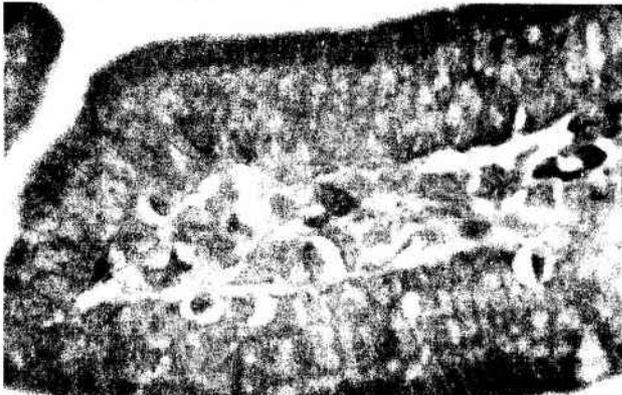


Tabla 1: Valores promedio de linfocitos intraepiteliales para cada animal, a los siete días de tratamiento

| | Ratones | Promedio LIE |
|----------------------------|---------|------------------------------------|
| Lote Control | Nº 1 | $\bar{x}=1.5$ |
| | Nº 2 | $\bar{x}=1.7$ |
| | Nº 3 | $\bar{x}=1.7$ |
| | Nº 4 | $\bar{x}=1.8$ |
| Promedio Lote Control | | $\bar{x}=1.675$ $\sigma=0.1258$ |
| Lote Experimental | Nº 1 | $\bar{x}=4.9$ |
| | Nº 2 | $\bar{x}=4.3$ |
| | Nº 3 | $\bar{x}=4.1$ |
| | Nº 4 | $\bar{x}=4.0$ |
| Promedio Lote Experimental | | $\bar{x}=4.325$ $\sigma=0.4031$ |

Tabla 2: Área ocupada por nódulos aislados y confluyentes en 10 tramos de intestino delgado, para cada animal de ambos lotes, según los días de tratamiento

| | Tiempo de tratamiento Ratones | Dos días Área linfática (mm ²) | Cinco días Área linfática (mm ²) | Siete días Área linfática (mm ²) |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Lote Control | Nº 1 | 0.81 | 1.04 | 0.78 |
| | Nº 2 | 1.22 | 0.79 | 0.39 |
| | Nº 3 | 1.10 | 0.11 | 0.86 |
| | Nº 4 | 0.70 | 0.58 | 0.99 |
| Área Total | | 3.83 | 2.52 | 3.02 |
| Área Promedio | | $\bar{x}=0.9575$ $\sigma=0.2431$ | $\bar{x}=0.6300$ $\sigma=0.3944$ | $\bar{x}=0.7550$ $\sigma=0.2583$ |
| Lote Experimental | Nº 1 | 2.49 | 0.89 | 1.88 |
| | Nº 2 | 1.14 | 0.48 | 3.55 |
| | Nº 3 | 0.94 | 2.29 | 3.91 |
| | Nº 4 | 0.84 | 1.03 | 2.93 |
| Área Total | | 5.44 | 4.69 | 12.27 |
| Área Promedio | | $\bar{x}=1.3525$ $\sigma=0.7685$ | $\bar{x}=1.1725$ $\sigma=0.7807$ | $\bar{x}=3.0675$ $\sigma=0.8891$ |

Conclusiones

Nuestros estudios morfológicos muestran un aumento y una redistribución regional de las células del sistema inmune a nivel de intestino, como resultado de la administración oral del probiótico. Los mismos refuerzan los hallazgos funcionales previos que no cuentan hasta el momento con un soporte estructural que los complemente.

Los hallazgos potencian las expectativas de efectividad respecto al uso de probióticos en la prevención de infecciones entéricas, inmunomodulación, inhibición de crecimiento tumoral, disminución de la respuesta inflamatoria, adyuvante de vacuna oral y bacterioterapia oral.

Agradecimientos

Al Dr. Osvaldo Garroco, por su asesoramiento y colaboración en referencia a la cepa de ratones.

Al Dr. Julio Piva, por su aporte en los diagnósticos histopatológicos.

A los profesionales del Centro de Referencia para Lactobacilos "Dr. Ernesto Padilla" (CERELA), por transmitir su experiencia en el tratamiento con lactobacilos.

A la MSc Emilce Méndez por su contribución en el área bacteriológica.

Bibliografía

- 1- Perdígón, G.; Nader de Macías, M.E.; Álvarez, S.; Oliver, G. and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1990: Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *L. casei* and *L. acidophilus*. J. of Dairy Research, 57: 255-264.
- 2- González, S.; Albarracín, G.; Locascio de Ruiz Pesce, M.; Male, M.; Apella, M.C.; Pesce de Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. 1990: Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk. M.A.N. 8: 349-354
- 3- Perdígón, G.; Nader de Macías, M.E.; Álvarez, S.; Médici, M.; Oliver, G. and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1986: Actividad inmunopotenciadora de bacterias lácticas administradas por vía oral. Medicina. 46: 751-754.
- 4- Perdígón, G.; Nader de Macías, M.E.; Álvarez, S.; Oliver, G. and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1986: Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. Infection and Immunity. 53 (2): 404-410.
- 5- Perdígón, G.; Nader de Macías, M.E.; Álvarez, S.; Médici, M.; Oliver, G. and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1986: Effect of mixture of *L. casei* and *L. acidophilus* administered orally on the immune system in mice. J. of Food Protection. 49 (12): 986-989.
- 6- Perdígón, G.; Álvarez, S.; Médici, M. 1990: Efecto de bacterias lácticas sobre inmunidad en mucosas. Relación entre los niveles de IgA-S y capacidad antimicrobiana en la protección frente a enteropatógenos. In Proceedings of the XXIII International Dairy Congress. Montreal-Canadá. p.p 1247-1254.
- 7- Perdígón, G.; Álvarez, S.; Nader de Macías, M.E.; Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1988: Actividad adyuvante de bacterias lácticas: perspectivas para su uso en vacunas orales. Revista Argentina de Microbiología. 20: 141-146.
- 8- González, S.; Cardozo, R.; Apella, M. y Oliver, G. 1995: Biotherapeutic role of fermented milk. Biotherapy 8: 129-134.
- 9- García del Moral R. 1993: Laboratorio de anatomía patológica. Madrid, Ed Interamericana Mc Graw Hill.
- 10- Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sabin LH. 1993: Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP).
- 11- Piva, J. R.; Cejas, H.; Cejas, A. 1981. Introducción a las Técnicas de Impregnación Argentica. Asociación Argentina de Patología. Cuaderno 1.
- 12- Martínez, M.; Rodríguez, A.; Cejas, H., 2001. Las células del sistema inmune accesorio. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba. 1,58:9-28.
- 13- Brandtzaeg, P.; Farstad, I. N. and Haraldsen, G. 1999: Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. Immunology Today. 20 (6): 267-273.
- 14- Perdígón, G.; Álvarez, S.; Médici, M.; Pesce de Ruiz Holgado, A. A. 1993: Influence of the Use of *Lactobacillus casei* As An Oral Adjuvant on the Levels of Secretory Immunoglobulin A During an Infection with *Salmonella typhimurium*. Food and Agricultural Immunology. 5: 27-37.
- 15- Perdígón, G.; Álvarez, S.; Pesce de Ruiz Holgado, A.; 1991. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. J. of Dairy Research 58: 485-496.
- 16- Stallmach, A.; Strober, W.; MacDonald, T.; Lochs, H.; Zeitz, M. 1998. Induction and modulation of gastrointestinal inflammation. Immunology Today. 19 (10): 438-441.