

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



**“ESTUDIOS COMPARATIVOS EN LA RESPUESTA
INMUNOLÓGICA HUMORAL ENTRE POBLACIONES DE CERDO
CRIOLLO MEXICANO Y DE RAZA COMERCIAL COMO
INDICADORES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE CIENCIAS
ZOOTÉCNICAS Y VETERINARIAS**

Presenta:

Q.F.B. KARINA MEJÍA MARTÍNEZ

TUTOR: Dr. Clemente Lemus Flores.

COTUTOR: Dr. José Francisco Zambrano Z.

ASESOR: Dr. Carlos Alejandro González Morteo.

Tepic, Nayarit; Mayo del 2007

DR. ARTURO AGUIRRE HERNÁNDEZ
COORDINADOR DEL CBAP
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO-AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

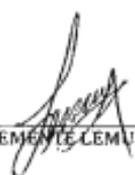
Los suscritos C. Dr. Clemente Lemus Flores, Dr. José Francisco Zambrano Zaragoza, Dr. Carlos Alejandro González Morteo, integrantes del consejo tutelar para revisar, ordenar y asesorar la tesis de Maestría en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológico-Agropecuarias, titulada **"Estudios comparativos en la respuesta inmunológica humoral entre poblaciones de cerdo criollo mexicano y de raza comercial como indicadores de resistencia a enfermedades"**.

Que presenta ante el honorable jurado calificador C. Q. F. B.

KARINA MEJÍA MARTÍNEZ

Comparecemos para manifestar que después de revisar su presentación y contenido no existe inconveniente para continuar con los trámites legales de este proceso de obtención de Maestría en el área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias, por estar de acuerdo en los aspectos de forma y contenido

ATENTAMENTE
CONSEJO TUTELAR


DR. CLEMENTE LEMUS FLORES


DR. J. FRANCISCO ZAMBRANO Z.


DR. CARLOS ALEJANDRO GONZÁLEZ MORTEO

AGRADECIMIENTOS

Siempre hay metas, siempre existen deseos de superación y aún más de realización, siempre queda la enorme satisfacción del objetivo alcanzado, pero también existe la necesidad del eterno agradecimiento a todos aquellos que con su apoyo hicieron posible que mi meta se realizara.

A la Universidad Autónoma de Nayarit

Por ser la institución donde he adquirido mi formación profesional, porque sus aulas hicieron posible realizar mis sueños de preparación y superación, tanto personal como académica.

Al proyecto SAGARPA-CONACYT 2002-CO1-1472

Por su financiamiento que fue fundamental para alcanzar mis metas.

Al COCYTEN

Por las aportaciones recibidas como apoyo para la realización de esta tesis

Al Patronato

Por el apoyo y sin el cual no habría cristalizado mi anhelo

Al Dr. Clemente Lemus Flores

Mi gratitud infinita porque con su lúcida colaboración e inmensa experiencia, guió la confección de la presente tesis, compartiendo sus conocimientos de forma desinteresada con infinita paciencia y dedicación

Al Dr. José Francisco Zambrano Zaragoza

Mi permanente agradecimiento por el gran apoyo brindado para hacer posible la realización del presente trabajo, sin menospreciar la paciencia, esmero y preocupación mostradas a lo largo de su elaboración

Al Dr. Carlos A. González Morteo

Mi especial reconocimiento porque con sus conocimientos aportó valiosas sugerencias que permitieron el enriquecimiento del presente trabajo

A mi esposo e hijos

Con quienes he compartido todas mis alegrías, tristezas, problemas y satisfacciones; gracias por su paciencia y apoyo incondicional que me han brindado en todo momento

A mis padres

A quienes agradezco su amor, consejos y gran confianza que en mi depositaron, apoyaron y fortalecieron mis ideales durante el transcurso no sólo de mi formación sino de mi vida para poder realizar uno de mis más grandes anhelos.

A mi hermano

Con el cariño de siempre por sus palabras de aliento y la unión que siempre nos ha caracterizado

A mis maestros

Por darme la oportunidad de escucharlos y aprender de ellos

A mis compañeros de grupo

Por todos los momentos de angustia y alegría que pasamos juntos

»

A mis amigos

Que han estado siempre cuando más los necesito

A Dios

Por ser la luz siempre encendida en mi camino y hacerme fuerte ante los retos de la vida

A todos aquellos que de manera directa o indirecta participaron de alguna forma para que pudiera culminar esta meta

INDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	iii
RELACIÓN DE FIGURAS	vi
RELACIÓN DE CUADROS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
SUMMARY	xii
I. INTRODUCCION	1
1.1 Hipótesis	4
1.2 Objetivo general	4
1.2.1 Objetivos específicos	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Sistema inmunitario del cerdo.	5
2.1.1 Órganos linfoides	6
2.1.2 Formas celulares	7
2.1.2.1 Línea mieloide	7
a) Monocitos/macrófagos	8
b) Granulocitos	9
c) Células dendríticas	9
2.1.2.2 Línea linfoide	10
a) Linfocitos T	12
a.1) Linfocitos Th 1 y Th 2	13
b) Otros linfocitos	15
c) Linfocitos B	15
c.1) Células plasmáticas	17
c.2) Inmunoglobulinas/anticuerpos	17

2.2 Respuesta inmune	23
2.2.1 Respuesta inmune innata, natural o inespecífica	24
2.2.2 Respuesta inmune adquirida, adaptativa o específica	24
2.2.2.1 Respuesta inmune mediada por células	25
2.2.2.2 Respuesta inmune humoral	25
2.3. Citocinas	27
2.3.1. IL-1	31
2.3.2. IL-4	31
2.3.3. IFN- γ	32
2.3.4. TNF- α	33
2.4. ELISA	34
2.4.1. ELISA indirecto	34
2.4.2. ELISA sandwich	35
III. MATERIALES Y METODOS	36
3.1 Localización	36
3.2 Animales	36
3.3 Obtención de las muestras biológicas	36
3.4 Variables	37
3.5 Determinación cuantitativa de inmunoglobulinas	37
3.6 Cuantificación de citocinas	39
3.7 Análisis estadístico	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Determinación de los niveles de inmunoglobulina IgM anti-Bacterina Comercial antes de la vacunación.	40
4.2. Determinación de los niveles de inmunoglobulinas IgM anti-Bacterina Comercial después de la vacunación.	42
4.3. Diferencias de los niveles de IgM e IgG antes y después de	43

inmunizar.	
4.4. Determinación de los niveles de inmunoglobulina IgG anti-Bacterina Comercial antes de la vacunación.	45
4.5. Determinación de los niveles de inmunoglobulinas IgG anti-Bacterina Comercial después de la vacunación.	47
4.6. Diferencias de los niveles de IgG antes y después de inmunizar.	48
4.7. Determinación de los niveles de citocinas después de la vacunación.	51
4.7.1. Determinación de los niveles de IL-1 β después de la vacunación.	51
4.7.2. Determinación de los niveles de IL-4 después de la vacunación.	53
4.7.3. Determinación de los niveles de IFN- γ después de la vacunación.	56
4.7.4. Determinación de los niveles de TNF- α después de la vacunación.	57
V. CONCLUSIONES	60
VI. LITERATURA CITADA	61

RELACIÓN DE FIGURAS

	Pág.
Figura No. 1. Esquema comparativo del ganglio linfático de cerdo (A) y del humano (B).	5
Figura No. 2. Representación de las dos líneas que forman el sistema inmune.	7
Figura No. 3 Diagrama esquemático del complejo TCR.	13
Figura No. 4 Citocinas y sus funciones.	14
Figura No. 5 Diagrama esquemático del complejo BCR de los linfocitos B.	16
Figura No. 6. Estructura de los dominios de las inmunoglobulinas.	18
Figura No. 7. Estructura de las inmunoglobulinas tipo IgM (A) forma secretada y (B) monómero.	20
Figura No. 8. Representación gráfica de la respuesta primaria y secundaria de IgM e IgG.	21
Figura No. 9. Diagrama esquemático de la molécula IgG secretada.	22
Figura No. 10. Niveles de anticuerpos IgM anti-Bacterina Comercial antes de la vacunación en las diferentes razas de cerdo.	41
Figura No. 11. Niveles de anticuerpos IgM anti-Bacterina Comercial a los 8 días después de la inmunización en las diferentes razas de cerdo.	43
Figura No. 12. Diferencia de los niveles de anticuerpos IgM anti-Bacterina Comercial antes y después de la inmunización en las diferentes razas de cerdo.	44
Figura No. 13. Niveles de anticuerpos IgG anti-Bacterina Comercial antes de la vacunación en las diferentes razas de cerdo.	46

Figura No. 14. Niveles de anticuerpos IgG anti-Bacterina Comercial a los 15 días después de la inmunización en las diferentes razas de cerdo.	48
Figura No. 15. Diferencia de los niveles de anticuerpos IgG anti-Bacterina Comercial antes y después de la inmunización en las diferentes razas de cerdo.	49
Figura No. 16. Niveles de IgM e IgG contra los antígenos de la vacuna bacterina comercial en las diferentes razas de cerdo, antes y después de la vacunación.	50
en las diferentes razas de cerdo.	
Figura No. 17. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de IL-1 β a los siete días después de la vacunación en las diferentes razas de cerdo.	52
Figura No. 18. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de IL-4 a los siete días después de la vacunación en las diferentes razas de cerdo.	54
Figura No. 19. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de INF- γ a los siete días después de la vacunación en las diferentes razas de cerdo.	56
Figura No. 20. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de TNF α , a los siete días después de la vacunación	58

RELACIÓN DE CUADROS

Pág.

Cuadro No. 1 Características que identifican a los linfocitos B y T.	11
Cuadro No. 2. Citocinas de la inmunidad innata.	29
Cuadro No. 3. Citocinas de la inmunidad adaptativa.	30
Cuadro 4. Absorbancias para la variable IgM antes de la vacunación independiente del sexo.	40
Cuadro 5. Absorbancias para la variable IgM después de la vacunación independiente del sexo.	42
Cuadro 6. Diferencia de las absorbancias para la variable IgM independiente del sexo.	44
Cuadro No. 7. Absorbancia para la variable IgG antes de la vacunación independiente del sexo.	46
Cuadro 8. Absorbancia para la variable IgG después de la vacunación independiente del sexo.	47
Cuadro No. 9 Diferencia de las absorbancias para la variable IgG independiente del sexo.	49
Cuadro No. 10. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de IL-1 β a los siete días después de la vacunación, independiente del sexo.	52
Cuadro No. 11. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de IL-4 a los siete días después de la vacunación, independiente del sexo.	54
Cuadro No. 12. Absorbancia para la variable IgM después de la vacunación independiente del sexo.	57
Cuadro No. 13. Absorbancia para la variable IgM después de la vacunación independiente del sexo.	59

ABREVIATURAS

CCM	Cerdo Criollo Mexicano
Ig	Inmunoglobulinas
VH y CH	Dominio variable y dominio constante de la cadena pesada
TNF	Factor de necrosis tumoral
INF	Interferón
IL	Interleucina
ADCC	Del inglés "Antibody-depen cell-mediated citotoxicity"
CPM	Cerdo Pelón Mexicano
CC	Cerdo Cuino
CCO	Cerdo de raza comercial
ELISA	Del inglés "Enzyme-linked immunosorbent assay"
Th	Linfocitos T cooperadores
CPA	Células presentadoras de antígeno
µm	Micrómetros
BCR	del inglés "B cell receptor".
TCR	del inglés "T cell receptor".
CD	del inglés "cluster of differentiation"
TGF	Factor transformador del crecimiento
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
SLA	Antígeno leucocitario porcino
mAb	Anticuerpos monoclonales
NK	del inglés "Natural Killer" células asesinas naturales
VL	Dominio variable en las cadenas ligeras
CL	Dominio constante en las cadenas ligeras
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
Fab	Fracción que une al antígeno
Fc	Fracción cristizable

RESUMEN

El presente estudio nos permitió diferenciar la respuesta inmunológica humoral y de citocinas en los Cerdos Criollos Mexicanos y compararla con los cerdos comerciales (CCO) F1 Yorkshire-Landrace como indicadores de resistencia a enfermedades. Se analizaron 76 animales divididos en tres grupos: 26 cerdos de la raza CCO, 25 de la raza cerdo cuino (CC) y 25 de la raza cerdo pelón mexicano (CPM); todos procedentes de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit. Fueron vacunados a los 45 días de nacidos con Bacterina Comercial que contiene cepas de *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Pasteurella*, como reto para establecer la reacción inmunológica. Se realizaron tres muestreos: antes de la aplicación de la vacuna para determinar niveles séricos de IgM e IgG iniciales, la segunda a los 8 días después, para determinar niveles séricos de IgM y las citocinas interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 4 (IL-4), interferón gama (INF- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el tercer muestreo se realizó a los 15 días después de la vacunación para determinar niveles séricos de IgG (es decir a los 45, 53 y 60 días de edad de los cerdos). La determinación de los niveles de las inmunoglobulinas fue realizada con la técnica de ELISA indirecto y la cuantificación de citocinas en suero se realizó mediante kits comerciales, los cuales emplearon el método de ELISA sándwich. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los niveles de IgM e IgG así como de las concentraciones de citocinas en las diferentes razas de cerdos y la prueba de Wilcoxon para conocer las diferencias entre los distintos pares de razas. Se encontró que los niveles de IgM anti-Bacterina Comercial

fueron mas altos en la raza CPM que en las otras razas antes y después de la vacunación. En el caso de los niveles de IgG antes y después, se encontró que las razas de CC y CPM respondieron mejor que los cerdos de raza comercial. Asimismo, que la producción de IL-1 β e IL-4, fue mayor en los CPM que en las otras razas. No se encontraron diferencias significativas entre la producción INF- γ y TNF- α .

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que los CPM y en menor medida los CC tienen una mayor capacidad de respuesta ante una infección en comparación con los CCO.

SUMMARY

The present study allowed to differ the immunological humoral response and the cytokines on Mexican Creole Pigs in comparison with comercial pigs (CCO) F1 Yorkshire-Landrace as indicators of resistance to sickness. 76 animals were analized and divided in three groups: 26 comercial pigs (CCO) Yorkshire-Landrace, 25 cuino pigs (CC) and 25 Mexican Hairless pigs (CPM); all of them picked up from the Unidad Académica de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nayarit. They were vaccinated 45 days after birth with comercial vaccine that contains *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Pasteurella*, as a challenge to establish the immunologic reaction. Three samples were taken, the first one, before the vaccine application to determine inicial IgM and IgG, serum levels, the second one 8 days later, to detect IgM serum levels and cytokines such as interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 4 (IL-4), gamma interferón (IFN- γ) and tumor necrosis factor alfa (TNF- α), the third one sample was taken 15 days after the vaccine to determine IgG levels (to say 45, 53 and 60 days of the age of the pigs). The measurements of the immunoglobulines levels were made by using indirect ELISA and the cytokines quantitation in serum was realized with a comercial kit by using the ELISA sandwich method. Results were analized with the non-parametric Kruskal-wallis test to compare the IgM and IgG levels and the concentrations of cytokines in the different race of pigs as well. The Wilcoxon test were used to know the differences between pairs of races. We found that the IgM anti-comercial vaccine levels were higher in the race CPM than in the other races before and after vaccination. In the case of the levels of IgG before and after vaccine treatment, the races of CC and the CPM had a better response than the comercial races of pigs. There were no significant differences in the IFN- γ and TNF- α production.

The results from this work, suggest that the CPM and in minor level the CC have a higher capacity to respond to infection as compared to the CCO.



I. INTRODUCCIÓN

Un alto porcentaje de las razas domésticas que proveen de alimento a la humanidad están en peligro de extinción. Las razas indígenas poseen comúnmente rasgos valiosos tales como adaptación a condiciones difíciles, incluyendo tolerancia a enfermedades parasitarias e infecciosas, sequía y calidad alimenticia pobre (CVID, 2003; Sierra, *et al.*, 2003).

Por lo tanto, el rescate y aprovechamiento de recursos genéticos nativos como el cerdo criollo mexicano podría ser un espécimen fructífero de investigación por muchos años. En México, recientemente se le ha dado un impulso importante al estudio de los recursos genéticos animales, toda vez que se ha comprendido la relevancia de las variantes genéticas tan extensas, pero tan pobremente caracterizadas, más aún cuando se trata de poblaciones criollas o nativas (Mariscal, 1998; Sierra, *et al.*, 2005).

El Cerdo Criollo Mexicano (CCM) fue reportado por la FAO como un cerdo en peligro de extinción (FAO, 2000); es una especie poco valorada, se cree que fue introducida en México en tiempos de la conquista, que de forma natural ha sobrevivido a distintas condiciones ecológicas incluyendo factores infecciosos y limitaciones nutricionales. Es fuente de gran diversidad biológica, además de suponerse alta resistencia a enfermedades (Flores, 1992; Lemus, *et al.*, 2003).

La gran importancia agropecuaria del cerdo ha propiciado un notable incremento de las investigaciones dedicadas al sistema inmunológico de este animal. Sin embargo, no se podrá contribuir a una reducción de las enormes pérdidas económicas, sin un mejor conocimiento del sistema inmunológico porcino (Saalmüller, 1998).

La producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas con la participación de los linfocitos B es uno de los mecanismos más efectivos en la respuesta específica ante microorganismos. Las inmunoglobulinas se unen

específicamente a los antígenos poniendo en contacto al patógeno con el fagocito encargado de destruirlo (Sánchez-Vizcaino, 2004; Goldsby, *et al.*, 2004).

IgM es la primera inmunoglobulina que se produce en una respuesta inmune; sin embargo, tiene un tiempo medio de vida corto (aproximadamente 5 días). La IgM es una inmunoglobulina particularmente efectiva frente a un gran número de bacterias Gram negativas y puede neutralizar agentes virales (Abbas y Lichtman, 2004; Rojas, 2004).

IgG es el anticuerpo más importante en la respuesta secundaria, el papel de esta inmunoglobulina en la respuesta humoral es vital, la cantidad de anticuerpos es mayor que en la respuesta primaria e indica que hay memoria inmunológica, tiene mayor afinidad por los antígenos, y es una opsonina. Participa en las reacciones de aglutinación y precipitación. (Tizard, 2002).

El desarrollo de una reacción inmunitaria efectiva incluye células linfoides, inflamatorias y hematopoyéticas. Un grupo de proteínas, que se designan en conjunto como citocinas para indicar su acción en la comunicación intracelular, media las interacciones complejas entre células (Margni, 1996). Las citocinas son un grupo de polipéptidos sintetizados por el huésped en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos. Pueden afectar diferentes funciones celulares y están involucradas en la inmunidad y la respuesta inflamatoria. Estas proteínas regulan tanto el inicio, mantenimiento y determinación del tipo de respuesta inmune y el mecanismo efector de resistencia contra agentes patógenos (Fresno, *et al.*, 1997).

Debido a la presión de selección intensa que se realiza actualmente en las razas de cerdos con alta explotación comercial, se ha propiciado que disminuya notablemente su variabilidad genética; lo que ha ocasionado la fijación de mutaciones genéticas indeseables, así como la disminución de resistencia a enfermedades (Fujii, *et al.*, 1991; O'Brien, *et al.*, 1993).



En estudios moleculares realizados (Lemus, *et al.*, 2001; Canul, *et al.*, 2005, Martínez, *et al.*, 2000, Martínez, *et al.*, 2005) se ha demostrado que los cerdos criollos tienen mayor heterocigocidad, por lo que esto pudiera ser determinante de una posible resistencia a enfermedades.

En Nayarit, México; como en algunos países de América, se dispone de cerdos criollos que han sobrevivido por más de 500 años sin control sistematizado de producción ni salud, lo que hace suponer que cuentan con una alta resistencia a enfermedades. (Benítez y Sánchez, 2001; Lemus y Alonso, 2005).

Por estas razones el presente estudio nos permitirá diferenciar la respuesta inmunológica en los Cerdos Criollos Mexicanos y compararla con los cerdos comerciales F1 Yorkshire-Landrace en la etapa de desarrollo.

1.1 HIPÓTESIS

Existen diferencias en indicadores de resistencia a enfermedades entre poblaciones de cerdo criollo mexicano y de raza comercial.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Establecer las diferencias en la respuesta inmunológica humoral entre poblaciones de cerdo criollo mexicano y de raza comercial.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Determinar y comparar los niveles de anticuerpos IgM e IgG contra la vacuna Bacterina Comercial en cerdos de las razas CCO, CC y CPM.

-Cuantificar las citocinas: (IL-1 β , IL-4, TNF α e INF- γ) en suero de cerdos de las razas CCO, CC y CPM.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

El sistema inmunitario constituye la línea de defensa de los organismos vivos frente a los patógenos. Su función principal consiste en evitar la colonización, multiplicación e invasión de los tejidos por virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos.

2.1 SISTEMA INMUNITARIO DEL CERDO

Al igual que en otras especies de mamíferos domésticos, el sistema inmunitario del cerdo está constituido por células, tejidos, órganos linfoides y factores solubles que le permiten reaccionar frente a agentes extraños, generar memoria inmunológica para una segunda posible infección y preservar sus propias estructuras. Sin embargo, esta especie presenta una serie de diferencias morfológicas y funcionales propias. La estructura invertida (corteza/médula) del nódulo de la linfa del cerdo es peculiar, pero no restringida a los cerdos (Figura No. 1); esta estructura anatómica se encuentra también en el elefante, rinoceronte, delfín, hipopótamo y nódulos de la linfa del jabalí (Binns, 1982; Goldsby, *et al.*, 2004).

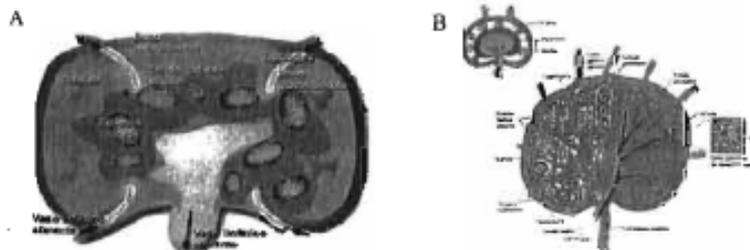


Figura No. 1. Esquema comparativo del ganglio linfático de cerdo (A) y del humano (B). Se puede observar la distribución celular y circulación linfática (Sánchez-Vizcalno, 2004 Goldsby, *et al.*, 2004).

2.1.1. ÓRGANOS LINFOIDES

Los órganos y tejidos linfoides se dividen según su función, en primarios y secundarios. Los primarios (médula ósea y timo) son los sitios principales de producción, regulación y diferenciación de células linfoides. En estos órganos primarios, los linfocitos se diferencian a partir de las células primordiales linfoides, proliferando y madurando hasta convertirse en células funcionales. En los mamíferos las distintas poblaciones de células T maduran en el timo y las células B en el hígado fetal y médula ósea. Los órganos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfáticos, placas de Peyer, amígdalas además de tejidos linfoides existentes en placas de peyer y peribronquial) tienen la función de captación y procesamiento de antígenos ya que en ellos se dan las condiciones para que los linfocitos T y B inmunocompetentes recién formados puedan interactuar entre sí y con los antígenos, pudiéndose generar de esta manera la respuesta inmune (Barret, 1993; Sánchez-Vizcaino, 2004).

Los ganglios linfáticos retienen a los antígenos que puedan llegar a través de los líquidos linfáticos y proceder a su presentación y procesamiento por macrófagos y los linfocitos que lo componen; son órganos encapsulados constituidos por cápsula, corteza y médula; y una zona mal definida que separa a ambas, llamada paracorteza, se encuentran distribuidos por todo el organismo de los mamíferos. En el cerdo, los ganglios presentan características diferentes con respecto a otras especies domésticas al tener estructura invertida (Figura No. 1). La corteza se encuentra en la zona central del ganglio. Por otra parte, la médula se encuentra en la periferia del ganglio, no posee senos linfáticos o estructuras similares y está constituida por un entramado uniforme y difuso de células en vez de cordones y senos (Goldsby, *et al.*, 2004, Sánchez-Vizcaino, 2004).

En la mayoría de las especies animales, la salida de los linfocitos es a través de los vasos linfáticos eferentes, mientras que en el cerdo estos emigran directamente de nuevo a la corriente sanguínea a través de los vasos que irrigan a los ganglios.

Resultando que se encuentren muy pocos linfocitos en la linfa del cerdo (Sánchez-Vizcaino, 2004).

2.1.2. FORMAS CELULARES

Las células que forman el sistema inmune porcino son muy variadas tanto en su estructura como en su función. Todas proceden de una célula madre pluripotencial de la médula ósea, de la que se diferencian dos líneas distintas: La línea mieloide y la línea linfoide (Figura No. 2).

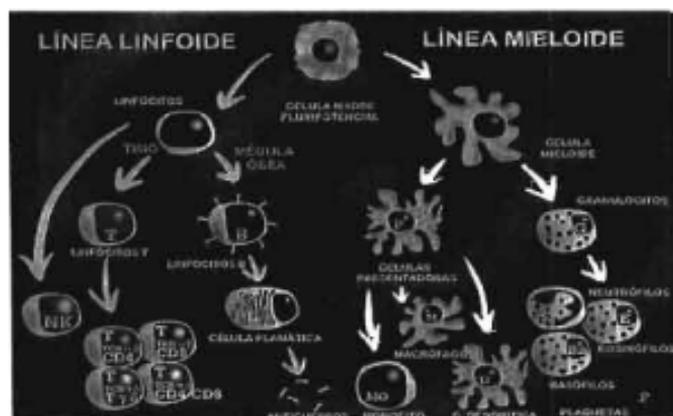


Figura No. 2. Representación de las dos líneas que forman el sistema inmune (Sánchez-Vizcaino, 2004).

2.1.2.1. Línea Mieloide

La línea mieloide; de la que derivan las células denominadas accesorias o presentadoras de antígenos que, aunque no responden por mecanismos de especificidad, forman parte de la inmunidad natural o innata, y juegan un papel

esencial en la iniciación de la inmunidad adquirida. Las células accesorias incluso pueden actuar como células efectoras en algunos mecanismos inmunitarios. Este grupo de células presentadoras de antígeno está formado por: monocitos y macrófagos, granulocitos (eosinófilos, neutrófilos y basófilos) y por células dendríticas (Figura No. 2) (Barret, 1993; Sánchez-Vizcaino, 2004).

a) Monocitos/macrófagos

Presentan el ejemplo más claro de población celular crítica para la inmunidad natural, y necesaria para desempeñar una función central en la inmunidad adquirida específica. Los macrófagos capturan y destruyen partículas extrañas a través de la fagocitosis. El proceso de fagocitosis consta de cuatro fases: quimiotaxis que es la migración dirigida de los macrófagos; adhesión del fagocito al patógeno para su captura; ingestión propiamente dicha y digestión que es la destrucción del patógeno mediante enzimas líticas y la expulsión de los detritus resultantes (Vinay *et al.*, 2005).

Además los macrófagos actúan como células presentadoras de antígeno para los linfocitos T cooperadores (Th). Para responder adecuadamente a los antígenos, las células T necesitan que éstos le sean presentados a través del complejo principal de histocompatibilidad para que sean reconocidos. La presentación de antígeno se realiza a través de las células presentadoras de antígeno (CPA), fundamentalmente células dendríticas y macrófagos, siendo un paso crucial en el inicio de la respuesta inmunitaria. Algunos tipos de células además de su función propia, poseen la capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno (células B). Así mismo, existen células que al ser estimuladas por factores solubles (INF- γ y TNF α) pueden ser capaces de presentar antígenos (astrocitos, células foliculares, endotelio, fibroblastos y otros (Glimcher *et al.*, 2000).

Por otra parte, producen mediadores solubles (citocinas) que participan en forma activa en la modulación de la respuesta inflamatoria e inmune. Los monocitos/macrófagos producen y secretan cinco citocinas principales: IL-1, IL-6, IL-

12, IL-18 y TNF- α , así como una gran variedad de citocinas menores. Su producción es activada por una diversidad de estímulos, como bacterias y sus productos como endotoxinas, leucotrienos, componentes activados del complemento, inmunocomplejos, señalización de linfocitos T, TNF- α , GM-CSF y la propia IL-1. Estas citocinas inducen un efecto pro-inflamatorio, estimulan la secreción de otras citocinas, participan en la activación, proliferación y diferenciación celular así como en el control de la respuesta inmune. Todas estas citocinas tienen funciones parecidas en términos generales (Paul, *et al.*, 1994; Abbas y Lichtman, 2004).

b) Granulocitos

El tipo celular más importante del sistema mieloide es el granulocito neutrófilo polimorfonuclear, que en general recibe el nombre de neutrófilo. Se trata de células que después de formarse en la médula ósea emigran hacia el torrente sanguíneo antes de pasar al interior de los tejidos, su vida total es de pocos días. En la circulación existen dos grupos de neutrófilos, uno circulante y otro cuyas células se encuentran secuestradas en la microvasculatura. Durante las infecciones bacterianas el número de neutrófilos circulante suele incrementarse ya que son liberados los que se encuentran en la médula ósea y de las células que se encuentran secuestradas. Su función es capturar y destruir partículas extrañas como bacterias invasoras, a través de la fagocitosis (Tizard, 2002).

c) Células dendríticas

El procesamiento del antígeno por los macrófagos no resulta eficiente, debido a que una buena parte de él es destruida por proteasas lisosómicas. De hecho, puede considerarse que macrófagos y linfocitos B son células que tienen otras prioridades: los primeros capturan y destruyen invasores, mientras que los segundos producen anticuerpos. Las células presentadoras de antígeno más eficientes son las llamadas células dendríticas. Resultan esenciales para iniciar las inmunorreacciones primarias y regular la actividad de los linfocitos. Monitorean el medio ambiente a nivel de la piel

y de las mucosas en busca de patógenos, a los cuales capturan y procesan para extraer de ellos las moléculas más inmunogénicas y presentarlas a los linfocitos T en los órganos linfoides secundarios, ganglios y bazo. Activan a los linfocitos T, actúan tanto en los mecanismos de inmunidad innata como adquirida, participan en el desarrollo de algún tipo de tolerancia, fagocitan cuerpos apoptóticos, activan a las células asesinas naturales. Capturan y exhiben grandes cantidades de antígeno procesado, y en conjunto forman una red ampliamente distribuida de células presentadoras de antígeno la cual se encuentra en todos los órganos excepto, encéfalo, partes del ojo y testículos. Dicha red es especialmente densa en tejidos como ganglios linfáticos, piel y superficies mucosas (Tizard, 2002; Rojas, 2004).

2.1.2.2. Línea linfoide

Responsable de llevar a cabo las principales funciones que caracterizan al sistema inmune y que le permite reaccionar frente a moléculas extrañas de forma específica, así como recordarlas para una futura posible invasión (memoria) (Figura No. 2).

Los linfocitos son las únicas células inmunocompetentes capaces de reconocer de forma específica los antígenos. Estas células son las responsables de las tres principales características del sistema inmune: Diferenciación de lo propio, especificidad y memoria. Son morfológicamente homogéneas aunque constan de varios subgrupos que realizan funciones diferentes. Los linfocitos son pequeñas células redondeadas que se originan en la médula ósea, maduran en diferentes órganos generadores y se localizan en tejidos linfoides periféricos anatómicamente definidos como timo, ganglios linfáticos y bazo; su tamaño varía entre 7 y 15 μm de diámetro, se encuentran en la sangre y en órganos linfoides como timo, ganglios linfáticos y bazo; su tamaño varía entre 7 y 15 μm de diámetro. (Abbas y Lichtman, 2004).

Los linfocitos porcinos se producen en los órganos linfoides primarios en grandes

proporciones. En la médula ósea se originan los linfocitos B, responsables de la respuesta humoral y en el timo se originan los linfocitos T, responsables de la respuesta celular. Parte de estos linfocitos emigran a los órganos linfoides secundarios para formar las zonas T o B dependientes (Cuadro No. 1). (Sánchez-Vizcaino, 2004).

Cuadro No. 1 Características que identifican a los linfocitos B y T (Tizard, 2002).

PROPIEDAD	LINFOCITOS B	LINFOCITOS T
Sitios de desarrollo	Médula ósea, bolsa Fabricio, placas de Peyer,	Timo
Distribución	Corteza de ganglios linfáticos Foliculos esplénicos.	Paracorteza de ganglios linfáticos Vaina periarteriolar esplénica
Circulación en sangre	No	Sí
Receptores de antígeno	BCR-inmunoglobulina	TCR-heterodímero de proteína
Antígenos de superficie importantes	Inmunoglobulinas	Se relaciona con CD3, CD4 o CD8 CD2, CD3, CD4 o CD8
Mitógenos	Fitolaca, lipopolisacárido	Fitohemaglutinina, concanavalina A, vacuna BCG, fitolaca
Antígenos reconocidos	Proteínas extrañas libres	Proteínas extrañas procesadas, en antígenos MHC
Inducción de tolerancia	Difícil	Fácil
Células de progenie	Células plasmáticas, células de memoria	Linfocitos T efectores, de memoria
Productos secretados	Inmunoglobulinas	Citocinas

a. Linfocitos T

Los linfocitos T juegan un papel fundamental en la respuesta inmune, en los mamíferos los linfocitos T dirigen y regulan la respuesta inmune y se caracterizan por ser capaces de reconocer específicamente antígenos extraños asociados a antígeno leucocitario porcino (SLA) tipo I ó II. Dentro de la población de los linfocitos T, se clasifican varios subtipos definidos por sus características fenotípicas funcionales e incluso por sus distintos procesos de diferenciación. Gracias a la producción de anticuerpos monoclonales (mAb) frente a los linfocitos porcinos, se han podido diferenciar varias subpoblaciones de linfocitos T de cerdo, agrupándose en los denominados "cluster" de diferenciación (CD) en virtud de sus diferencias antigénicas y funcionales (Cuadro No. 1) (Linton *et al.*, 2003; Sánchez-Vizcaino, 2004).

Los receptores de antígeno en los linfocitos T (TCR) (Figura No. 3), se localizan únicamente en la superficie de estas células. Cada linfocito T posee alrededor de 30 000 TCR idénticos. Debido a que todos los TCR presentes en una célula dada son idénticos, cada linfocito T sólo podrá unirse a un péptido antigénico específico y reaccionar con él. Cada TCR consta de dos cadenas polipeptídicas de unión a antígeno vinculadas con un gran número de otras glucoproteínas. Estas amplifican la señal generada al unirse con un antígeno con el TCR, y la transmiten al linfocito. Se han identificado dos tipos de TCR. Estos receptores son: Receptor α - β (TCR α - β) y Receptor γ - δ (TCR γ - δ). El Receptor α - β , representa entre el 40 al 60% de los linfocitos de sangre periférica. Los linfocitos T α β son: Linfocitos T CD4 (Linfocitos T cooperadores) y Linfocitos T CD8 (linfocitos T Citotóxicos). El receptor γ - δ (TCR γ - δ), presente en la mayoría de las células denominadas células nulas se encuentran abundantemente en las mucosas (Tizard, 2002; Sánchez-Vizcaino, 2004).

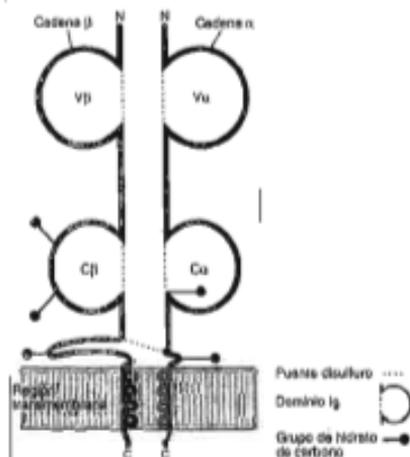


Figura No. 3 Diagrama esquemático del complejo TCR α - β . Formado por sus dominios constantes ($C\alpha$ y $C\beta$) y variables ($V\alpha$ y $V\beta$) (Abbas y Lichtman, 2004).

a.1 Linfocitos Th1 y Th2

Dentro del proceso de la respuesta inmune específica, las células del sistema inmunológico (linfocitos B, fagocitos y otros linfocitos T) interactúan con los linfocitos T para inducir en ellos la activación, división y diferenciación. Esta relación se lleva a cabo de dos maneras: por contacto directo entre moléculas de membrana y mediante la secreción de mediadores solubles (Kidd, 2003).

Tras la presentación de antígenos y por el efecto de ciertas citocinas, los linfocitos CD4 pueden polarizarse en sus acciones, particularmente su producción de citocinas, de tal modo que favorezcan la respuesta inmune celular (Th1) o humoral (Th2). La producción de citocinas por los macrófagos y otros tipos celulares en las primeras fases de la infección define el patrón Th1 o Th2 que se producirá en respuesta a un agente extraño. La liberación de interferón ($INF-\gamma$) e IL-12 inducen la

diferenciación de las células Th a las células Th1, en tanto que la IL-4 e IL-10 inducen la polarización Th2 (Glimcher, *et al.*, 2000; Abbas y Lichtman, 2004).

Los linfocitos T de ayuda producen muchos tipos de citocinas distintos que pertenecen a dos categorías principales: Las generadas por linfocitos Th1 y las elaboradas por linfocitos Th2. En general las citocinas que derivan de las células Th1 tienden a presentar actividades biológicas que se contraponen a las actividades de las citocinas derivadas de las células Th2. Por consiguiente, la generación de Th1 y Th2 es regulada por el equilibrio entre estos dos grupos (Harris, *et al.*, 2000; Glimcher, *et al.*, 2000).

Los linfocitos Th1 y Th2 se distinguen por las citocinas que producen y el tipo de respuesta inmune en la que intervienen. Los linfocitos Th1 producen INF- γ , factor de necrosis tumoral-beta (TNF- β), IL-2 e IL-8, los cuales activan a los linfocitos CD8 y células asesinas naturales. Esta polarización Th1 supondrá un predominio de la respuesta inflamatoria y citotóxica. Por su parte los linfocitos Th2 secretan una mezcla de citocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, entre otras; y por lo general cooperan para que los linfocitos B produzcan inmunoglobulinas. Son coestimuladas por IL-1 para producir estas citocinas (Figura No. 4) (O'Garra, *et al.*, 2004; Kidd, 2003).

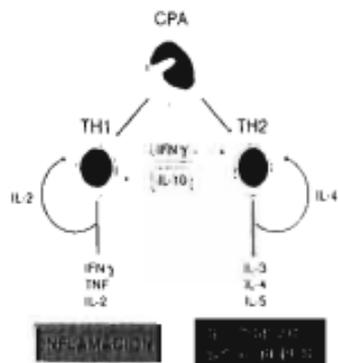


Figura No. 4 Citocinas y sus funciones (Ramírez, 1996).

b. Otros linfocitos

Además de los linfocitos T γ - δ anteriormente denominados células nulas y que realmente son una subclase de los linfocitos T, existen otros linfocitos de gran importancia en la respuesta inmune natural o innata en la especie porcina, conocidos como células NK (Tizard, 2002).

Las células NK presentan una actividad citotóxica frente a células infectadas por virus y células tumorales, aunque no las reconocen por un estímulo antigénico específico (las NK no expresan TCR), ni está restringida por el SLA, como ocurre con los linfocitos T (CD8). Sus mecanismos de activación se inician al reconocer, de forma natural, células que no expresan adecuadamente el SLA, como ocurre en la mayoría de las células infectadas por virus. Por otra parte liberan mediadores solubles (citocinas) tales como TNF e INF- γ lo que permite la estimulación de diferentes mecanismos linfocitarios (Kurita, *et al.*, 2001; Sánchez-Vizcalno, 2004).

c. Linfocitos B

Los llamados linfocitos B (o células B), se originan en la médula ósea, aunque maduran en las placas de Peyer o en la propia médula antes de emigrar a los órganos linfoides secundarios. Se encuentran en la corteza de los ganglios linfáticos, en folículos dentro de placas de Peyer y bazo, y en la zona marginal de la pulpa blanca esplénica (Abbas y Lichtman, 2004). En sangre periférica, los linfocitos B del cerdo suponen entre el 8 al 18% de los linfocitos totales. La membrana de los linfocitos B está formada por un gran número de moléculas, muchas de las cuales se han podido ir estudiando gracias a los mAb. De entre ellas, es importante destacar, la conocida como complejo BCR (B Cell Receptor) (Figura No. 5) receptor de células B (Parslow *et al.*, 2002).

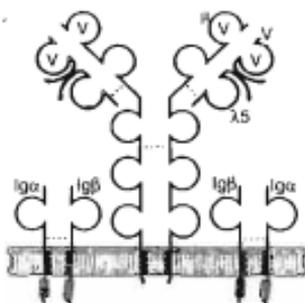


Figura No. 5 Diagrama esquemático del complejo BCR. (Abbas y Lichtman, 2004)

Los linfocitos B actúan como mediadores de la inmunidad humoral específica y producen anticuerpos o inmunoglobulinas. Los anticuerpos se producen en una forma asociada a la membrana y en una forma secretada (anticuerpos). Las inmunoglobulinas de membrana son sintetizadas por las propias células B y quedan insertadas en la superficie de membrana donde actúan como receptores antigénicos específicos. Por su parte, los anticuerpos son proteínas que se encuentran libres en el suero y que se unen específicamente a los antígenos poniendo en contacto el patógeno con el fagocito encargado de destruirlo (Pistoia, 1997; Sánchez-Vizcalno, 2004).

Una vez que se ha llevado a cabo el contacto con el antígeno, las células B se activan proliferan y se diferencian en células plasmáticas o células secretoras de anticuerpos. Una parte de los linfocitos B activados no se diferencian en células plasmáticas, sino que se convierten en células de memoria que serán las responsables de la producción de una respuesta más rápida e intensa en el caso de un nuevo contacto con ese antígeno. Así mismo, las células B pueden producir citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, entre otras), así como responder ante ellas, actuando además como células presentadoras de antígenos a los linfocitos Th (Tizard 2002).

c.1. Células plasmáticas

Las células B productoras de anticuerpos a menudo evolucionan a formas especializadas llamadas células plasmáticas (plasmocitos) se originan de linfocitos B estimulados por antígeno. Las células plasmáticas se encuentran sólo en órganos linfoides y en los lugares de respuesta inmunitaria, y normalmente no circulan por la sangre o la linfa. (Parslow *et al.*, 2002; Abbas y Lichtman, 2004).

Las células plasmáticas son ovoides y tienen de 8 a 9 μm de diámetro el mismo diámetro que su célula B progenitora, tienen un núcleo similar grande y redondeado, el citoplasma abundante contiene un retículo endoplásmico rugoso denso, que es el depósito ribosomal típico de las células con función activa de síntesis de proteínas (las inmunoglobulinas y otras proteínas secretadas y de membrana). A diferencia de las células progenitoras, las células plasmáticas no sólo sintetizan inmunoglobulinas, sino que también las secretan. Sin embargo, una sola célula plasmática no secreta todas las formas estructurales de inmunoglobulinas. El proceso de la conmutación de clase de inmunoglobulina obliga a la célula plasmática a la producción de una sola inmunoglobulina. Se cree que las células plasmáticas son células en su fase final de diferenciación con una capacidad nula o escasa de división mitótica, y son, en esencia, factorías para la síntesis y fabricación de inmunoglobulinas (Tizard 2002; Abbas y Lichtman, 2004).

c.2. Inmunoglobulinas-anticuerpos

La producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B es uno de los mecanismos más efectivos en la respuesta específica ante microorganismos. Cada molécula de Inmunoglobulina, independientemente de su isotipo, esta formada, genéricamente, por dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas pesadas unidas por puentes disulfuro. Dentro de la molécula se pueden reconocer dos regiones, una región variable (Fab), implicada en la unión del antígeno y donde se encuentra la especificidad de la inmunoglobulina, y una región constante (Fc) (Figura No. 6), que

es la mediadora de las funciones efectoras del anticuerpo y determina el tipo y subtipo de inmunoglobulinas que se producirá (Sánchez-Vizcaino, 2004).

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras, están formadas por unas estructuras proteicas conservadas denominadas dominio de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras están formadas por dos dominios, uno variable (VL) y otro constante (CL) y las cadenas pesadas por una parte variable (VH) y tres (IgG e IgA) o cuatro (IgM e IgE) constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4) (Figura No. 6). Los dominios son idénticos en las dos cadenas ligeras entre si y en las dos cadenas pesadas. En las cadenas H también existe una región adicional, que no forma parte de los dominios, denominada región bisagra. La región bisagra está localizada entre los dominios CH1 y CH2 y permite la movilidad a las inmunoglobulinas (Sánchez-Vizcaino, 2004).

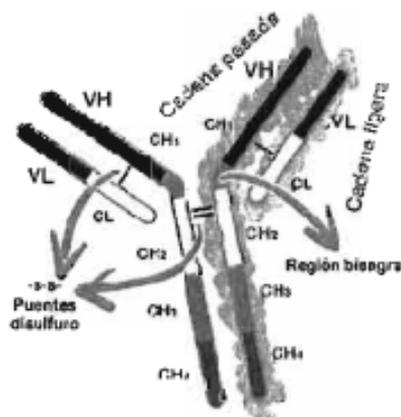


Figura No. 6. Estructura de los dominios de las inmunoglobulinas. En las cadenas ligeras existen dos dominios, uno variable (VL) y otro constante (CL). Las cadenas pesadas presentan un dominio variable (VH) y tres o cuatro constantes (CH) (Sánchez-Vizcaino, 2004).

Los dominios variables (VL y VH) tienen como función la unión al antígeno y por tanto, son los responsables de la especificidad de la inmunoglobulina, mientras que los dominios constantes permiten la diferenciación de los cinco isotipos de cadenas pesadas ($\mu, \gamma, \epsilon, \alpha, \delta$) que formaran las inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgE, IgA e IgD) y de los dos tipos de cadenas ligeras: kappa (K) y lambda (λ). Así como, son los responsables de las funciones efectoras de las inmunoglobulinas (fijación del complemento, receptores celulares, etc.) (Sánchez-Vizcalno, 2004).

En el cerdo se han descrito cuatro isotipos de inmunoglobulinas, IgM, IgG, IgA e IgE y la posible existencia de la IgD porcina que todavía no se ha podido demostrar en forma concluyente (Sánchez-Vizcalno, 2004).

La concentración de las inmunoglobulinas porcinas en la leche materna es: IgG 1.3, IgM 0.3-0.9, IgA 3-7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y en el calostro de 30.70, 2.5-3.2 y 9.5-10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. La IgE que representa sólo el 0.01% se ha podido determinar mediante métodos funcionales, incluso inducida por la presencia de virus como el de la Peste Porcina Africana (Sánchez-Vizcalno, 2004).

En la placenta no existe traslado alguno de inmunoglobulinas maternas por circulación fetal, por consiguiente, el calostro mantiene a los lechones en un ambiente libre de gérmenes por lo que estos son un excelente modelo para diferenciar entre reacciones inmunes innatas y estímulos a los antígenos externos (Taskalowa-Hogenova, *et al.*, 1994).

Como es bien sabido, la producción de calostro dura unas pocas horas, de manera que los anticuerpos así ingeridos serán la única protección frente a microorganismos patógenos, hasta que el sistema inmune del lechón sea capaz de producir sus propios anticuerpos (Durán, 1990).

A partir de la tercera semana de vida, el lechón comienza a ser inmunocompetente, es decir comienza la propia producción de anticuerpos, y no es hasta la sexta u

octava semana de vida cuando ya completo su maduración inmunológica (Buxadé, 1996).

La IgM es la primera inmunoglobulina en producirse tras una respuesta inmune y es el isotipo predominante en la respuesta primaria, es producida y secretada por las células plasmáticas del bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea. Mientras se encuentra en la superficie del linfocito B y actúa como BCR (Figura No. 7A), la IgM es un monómero de inmunoglobulina. Sin embargo, la forma secretada es un polímero y que consta de cinco (a veces seis) subunidades enlazadas en círculo por puentes disulfuro. Un polipéptido pequeño rico en cisteína, denominado cadena J, une dos de las unidades para completar el círculo (Figura No. 7A) (Tizard, 2002).

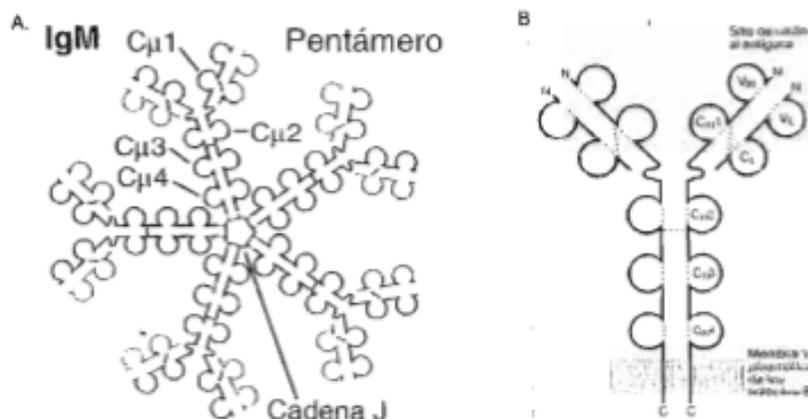


Figura No. 7 (A) Diagrama esquemático de la molécula IgM secretada. (B) Diagrama esquemático de la molécula de IgM unida a la membrana en la superficie de un linfocito B. (Abbas y Lichtman, 2004)

La IgM es la segunda inmunoglobulina en concentración en suero, después de la IgG representando entre 10 y un 12% del total de inmunoglobulinas porcinas ya que la

IgG proporciona el 80% del total, mientras que la IgA el 7.09% y la IgE menos del 0.01%, siendo sólo un componente menor (Sánchez-Vizcaino, 2004).

El papel de la IgM es de gran importancia como primera inmunoglobulina de defensa en la respuesta humoral (Figura No. 8) y aunque su grado de afinidad para reaccionar con el antígeno es inferior al de la IgG, su formación pentamérica le permite unirse de forma múltiple con diferentes antígenos y poder activar el complemento, una sola molécula de IgM pentamérica unida a antígeno es capaz de iniciar la activación del complemento y la fagocitosis, la IgM es una inmunoglobulina particularmente efectiva frente a un gran número de bacterias Gram negativas y puede neutralizar agentes virales, no se han descrito diferentes subclases de IgM en el cerdo, aunque sí se ha podido observar una variante alotípica en algunos animales, debido a su gran tamaño la IgM se encuentra fundamentalmente en el suero sanguíneo (Tizard, 2002).

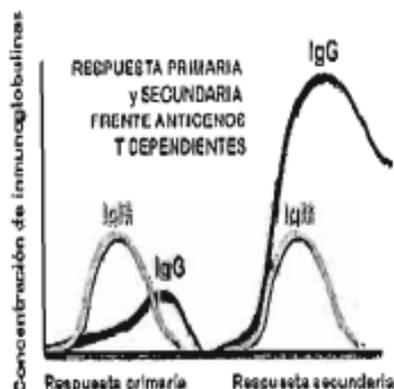


Figura No. 8. Representación gráfica de la respuesta primaria y secundaria de IgM e IgG (Sánchez-Vizcaino, 2004).

La IgA es la más importante en la inmunidad de las mucosas y la principal en la lactancia, se han descrito dos subclases en el cerdo IgA1 e IgA2, la actividad de la IgA en las mucosas actúa a tres niveles diferentes evitando la penetración de los antígenos en la pared del intestino, neutralizando la actividad de algunos virus, dentro de las células epiteliales y fuera de ellas (Tizard, 2002).

La IgG es producida también por células plasmáticas del bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea. Es la inmunoglobulina de mayor concentración en la sangre, por lo cual desempeña la función más importante en los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos. Tiene la estructura típica de un BCR (Figura No. 9), y esta formada por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas gamma. Las cadenas ligeras son de tipo kappa o lambda. Puesto que es la inmunoglobulina más pequeña, la IgG escapa con mayor facilidad que las otras de los vasos sanguíneos, lo cual reviste especial importancia en el tejido inflamado, donde el aumento de la permeabilidad vascular facilita la participación de la IgG en la defensa de los tejidos y las superficies del organismo (Tizard, 2002).

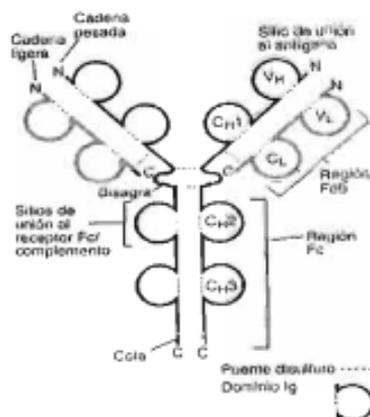


Figura No. 9 Diagrama esquemático de la molécula IgG secretada. (Abbas y Lichtman, 2004).

La IgG es el isotipo principal en el cerdo, es el anticuerpo más importante en la respuesta secundaria, se han descrito al menos, cinco subclases de IgG: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4, sin embargo, el estudio de ADN ha puesto en evidencia que existen ocho genes que codifican la región constante, el papel de esta inmunoglobulina en la respuesta humoral es vital, presenta un elevado índice de afinidad por los antígenos, pudiendo opsonizarlos para facilitar la fagocitosis, aglutinarlos o precipitarlos (Figura No. 8) (Sánchez-Vizcalno, 2004).

Los anticuerpos constituyen además herramientas inestimables en laboratorio. Una de las técnicas que se utilizan para cuantificar antígenos o anticuerpos en solución es el inmunoensayo enzimático, demoninado por su siglas en inglés ELISA (Sánchez-Vizcalno, 2004).

2.2 RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune consiste en el desencadenamiento de los mecanismos destinados a la eliminación de patógenos o material extraño. La realización de esta respuesta está constituida por tres pasos: el reconocimiento de manera inespecífica y específica del agente extraño por parte de los fagocitos, linfocitos T y B y otros tipos celulares; la regulación a través de la interacción de los diferentes elementos del sistema inmunitario para que se activen y regulen, y la respuesta del tipo e intensidad adecuada para la eliminación o inactivación del agente extraño (Pappaterra, 2002).

Los vertebrados poseen diferentes mecanismos para defenderse de la agresión originada por los agentes patógenos. Estos mecanismos pueden ser inespecíficos, siendo los primeros de carácter general, capaces de defenderlo contra cualquier agresor, en tanto que los específicos sólo actúan contra entidades bien definidas. Dentro del proceso de reacción frente a patógenos, la respuesta inmunitaria por parte del hospedador se puede clasificar en dos tipos: innata (natural o inespecífica) y adquirida (adaptativa o específica). Así mismo, la respuesta adquirida se puede llevar

a cabo a través de una respuesta inmune mediada por células o mediante una respuesta de tipo humoral. Todos estos mecanismos inmunes dependerán del tipo de agente, las lesiones que causa y del lugar donde se produzca la infección (Margni, 1996, Tizard, 2002).

2.2.1. RESPUESTA INMUNE INNATA, NATURAL O INESPECÍFICA

Es de dos tipos: a) los constituidos por las barreras naturales y b) los de la inmunidad innata o inespecífica. Se desencadenan al poco tiempo de la entrada del agente al organismo y predominan en las primeras fases de una infección, teniendo una gran importancia en la protección sistémica y local del organismo. Comenzando con las barreras físicas (piel, secreciones de las mucosas, enzimas proteolíticas, pH del estómago, etc.), impiden la penetración de los agentes patógenos reales o potenciales, les permiten mantener su integridad. Seguido de la respuesta natural o innata que es la primera barrera inmunológica no específica, la cual mediante la activación de factores humorales como el complemento o celulares como la fagocitosis o la activación de las células NK, presentan una alta capacidad de eliminación de agentes infecciosos, para terminar, en caso necesario (no siempre hace falta, ya que muchas infecciones no progresan) (Margni, 1996; Molina, 2005).

2.2.2. RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA, ADAPTATIVA O ESPECÍFICA

Este tipo de respuesta depende de los linfocitos T y los linfocitos B, caracterizándose por la especificidad para reconocer antígenos y la generación de memoria para activarse rápidamente en caso de un posterior enfrentamiento al mismo agente. Consta de una respuesta primaria de baja intensidad y corta duración y una respuesta secundaria que se caracteriza por ser más rápida, intensa y efectiva (Pappaterra, 2002; Molina, 2005).

Dentro del proceso de la respuesta específica puede distinguirse un componente humoral, basado en la producción de anticuerpos, y un componente celular, basado

en mecanismos de citotoxicidad. Durante el desarrollo de la respuesta adaptativa frente a un patógeno, se suelen desencadenar ambos tipos de inmunidad, si bien generalmente una de ellas predomina sobre la otra (Pappaterra, 2002).

2.2.2.1. Respuesta inmune mediada por células

Está mediada por células llamadas linfocitos T, su especificidad se debe a que estos linfocitos a menudo funcionan en conjunto con otras células como los fagocitos para controlar o eliminar microorganismos (Rojas, 2004).

Los microorganismos intracelulares obligados, como los virus y algunas bacterias, proliferan en el interior de las células huésped, donde son inaccesibles a los anticuerpos circulantes. La defensa frente a tales infecciones se debe a la inmunidad mediada por células, que funciona por la inducción y promoción de la destrucción intracelular de los microorganismos o de la lisis de las células infectadas (Abbas y Lichtman, 2004; Anderson, 2006).

Esto se realiza mediante la acción directa de diferentes tipos celulares, así como los mecanismos de inflamación, quimiotaxis, fagocitosis, citotoxicidad, liberación de citocinas y presentación de antígenos, no interviniendo de manera determinante, los linfocitos B ni los anticuerpos (Pappaterra, 2002).

2.2.2.2. Respuesta inmune humoral

La inmunidad humoral está mediada por moléculas de la sangre responsables del reconocimiento específico y de la eliminación de antígenos; se llaman linfocitos B, y responden a los antígenos extraños evolucionando a células productoras de anticuerpos (Tizard, 2002).

Es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y las toxinas que secretan, porque los anticuerpos pueden unirse a ellos y cooperar en

su destrucción (Tizard, 2002).

Se observan linfocitos B en la corteza de los ganglios linfáticos, en la zona marginal del bazo, en médula ósea y en las placas de Peyer del intestino. Sólo unos cuantos circulan en la sangre. Al igual que los linfocitos T cada linfocito B porta una gran cantidad de receptores de antígeno idénticos; por esta razón, una célula sólo podrá unirse y reaccionar con un solo antígeno (Rojas, 2004).

La respuesta de tipo humoral puede ser independiente de los linfocitos T interaccionando directamente las células B con los antígenos. Una vez activadas, las células B se constituirán en células plasmáticas formadoras de anticuerpos o bien en células de memoria que permanecerán en el organismo por largo periodo de tiempo (Margni, 1996).

En la inmunidad frente a patógenos, los anticuerpos pueden actuar por tres vías: Se puede producir la unión de estos anticuerpos a los patógenos para prevenir la infección de las células, realizándose así la neutralización del agente. Por otra parte, este recubrimiento de los microorganismos por parte de los anticuerpo produce la opsonización del mismo para ser así reconocido por los receptores Fc (fracción cristalizable) específicos de las células fagocíticas, incrementándose considerablemente el proceso de la fagocitosis. Alternativamente los anticuerpos unidos a los patógenos pueden activar las proteínas del sistema del complemento para incrementar la opsonización y la lisis de algunas bacterias (Roitt, *et al.*, 2001).

A pesar de que dentro de todo el proceso de la respuesta inmune específica existe una especialización de cada una de las respuestas que la constituyen (celular y humoral), los componentes básicos de cada una de estas respuestas (células e inmunoglobulinas) son necesarios entre sí para la elaboración de una reacción inmune efectiva, ya que a pesar que de un tipo de respuesta predomina sobre otra, en muchas ocasiones ambas colaboran entre sí (Pappaterra, 2002).

2.3. CITOCINAS

Las células del sistema inmunitario secretan una variedad sorprendente de proteínas que regulan las inmunorreacciones al enviar señales entre las células. Estas proteínas reguladoras reciben el nombre genérico de citocinas; éstas presentan gran variedad de funciones y son de gran importancia en la respuesta inmune, tanto natural o innata como adquirida (Roitt, *et al*, 2001).

La actuación de las citocinas es semejante a las de las hormonas, de hecho también se conocen a las citocinas como las hormonas del sistema inmune. Las citocinas están implicadas en la respuesta inmune innata o natural mediante la activación de los macrófagos y de las células NK induciendo procesos inflamatorios y quimiotácticos (Cuadro No. 2), así como en la respuesta inmune adquirida, tanto humoral como celular (Cuadro No. 3) actuando sobre los linfocitos T y los linfocitos B y facilitando la comunicación entre las diferentes poblaciones celulares. La principal diferencia entre las citocinas y las hormonas es, que las primeras actúan sobre diferentes poblaciones celulares y tejidos, mientras que las hormonas, suelen actuar sobre un sólo órgano. Además, una sola célula puede producir diferentes citocinas, cosa que no ocurre con la producción de hormonas (Roitt, *et al*, 2001).

Aunque las citocinas tienen una estructura diversa, comparten varias propiedades:

-La secreción de citocinas es un acontecimiento breve y autolimitado. Las citocinas no pueden almacenarse en forma de moléculas preformadas y su síntesis se inicia por la transcripción de nuevos genes debida a una activación celular.

-Las acciones de las citocinas suele ser pleiotrópicas y redundantes. El pleiotropismo se refiere a la capacidad de una citocina para actuar sobre diferentes tipos celulares. Esta propiedad permite a una citocina mediar diversos efectos biológicos, pero limita en gran medida su utilidad terapéutica. La redundancia se refiere a la propiedad de múltiples citocinas de ejercer los mismos efectos funcionales. Debido a esta

redundancia, los antagonistas de una citocina pueden no tener consecuencias funcionales, ya que otras citocinas las compensan.

-Las citocinas influyen a menudo en la síntesis y las acciones de otras citocinas. La capacidad de una citocina para estimular la síntesis de otras produce cascadas en las que una segunda o tercera citocina puede mediar los efectos biológicos de la primera. Dos citocinas pueden antagonizarse entre sí, provocar efectos aditivos o, en algunos casos, producir un efecto mayor del previsto (sinergia).

-Las citocinas inician sus acciones al unirse a receptores específicos de membrana en las células diana.

-Las señales externas regulan la expresión de los receptores de citocinas y, por consiguiente, la respuesta de las células a las citocinas.

-Las respuestas celulares a la mayoría de las citocinas consisten en cambios en la expresión de genes en las células diana, lo que da lugar a la expresión de nuevas funciones y a veces, a la proliferación de las células diana. (Ramírez, 1996; Abbas y Lichtman, 2004).

Por último, las citocinas suelen actuar, fundamentalmente, de forma local, tanto sobre la misma célula que las produce (actividad autocrina) como sobre las células vecinas (actividad paracrina), más que en acciones sobre células y tejidos distantes de su producción (actividad endocrina). Esta situación es, más común en las hormonas. No obstante, algunas citocinas, especialmente de efectos proinflamatorios como la IL-1 y el TNF (Cuadro No. 2), actúan mediante difusión a través de la sangre sobre células diana distantes (actividad endocrina) (Chung, 2001; Tizard, 2002).

Cuadro No. 2. Citocinas de la inmunidad innata (Abbas y Lichtman, 2004).

Citocina	Principal fuente celular	Principales células diana y efectos biológicos
Factor de necrosis tumoral (TNF)	Macrófagos, linfocitos T	Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación) Neutrófilos: activación Hipotálamo: fiebre Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda Músculo, grasa: catabolismo (caquexia) Muchos tipos celulares: apoptosis
Interleucina-1 (IL-1)	Macrófagos, células endoteliales, algunas células epiteliales	Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación) Hipotálamo: fiebre Hígado: tipos de proteínas de fase aguda
Quimocinas	Macrófagos, células endoteliales, algunas células epiteliales	Leucocitos: quimiotaxia, activación; Migración a los tejidos
Interleucina-12 (IL-12)	Macrófagos, células dendríticas	Linfocitos T: diferenciación Th1 Linfocitos NK y T: síntesis de IFN- γ , aumento de actividad citolítica
IFN de tipo I (IFN- α , IFN- β)	IFN- α : macrófagos IFN- β : fibroblastos	Todas las células: estado antivírico, aumento de la expresión de MHC de clase I Linfocitos NK: activación
Interleucina-10 (IL-10)	Macrófagos Linfocitos T (sobre todo Th2)	Macrófagos, células dendríticas: inhibición de la síntesis de IL-12 y expresión de coestimuladores y moléculas del MHC de clase II
Interleucina-6 (IL-6)	Macrófagos, células endoteliales, linfocitos T	Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda Linfocitos B: proliferación de células productoras de anticuerpos.
Interleucina-15 (IL-15)	Macrófagos, otras	Linfocitos NK: proliferación Linfocitos T: proliferación (linfocitos CD8 ⁺ de memoria)
Interleucina-18 (IL-18)	Macrófagos	Linfocitos NK y T: síntesis de IFN- γ

Cuadro No. 3. Citocinas de la inmunidad adaptativa (Abbas y Lichtman, 2004).

Citocina	Principal fuente celular	Principales células diana y efectos biológicos
Interleucina-2 (IL-2)	Linfocitos T	Linfocitos T: proliferación, aumento de la síntesis de proteínas, potencia la apoptosis mediada por Fas Linfocitos NK: proliferación, activación Linfocitos B: proliferación, síntesis de anticuerpos (<i>in vitro</i>)
Interleucina-4 (IL-4)	Linfocitos T CD4 ⁺ (Th2), mastocitos	Linfocitos B: cambio a isotipo IgE Linfocitos T: diferenciación Th2, proliferación Macrófagos: inhibición de la activación mediada por IFN- γ Mastocitos: proliferación (<i>in vitro</i>)
Interleucina-5 (IL-5)	Linfocitos T CD4 ⁺ (T _H 2)	Eosinófilos: activación, aumento de la producción Linfocitos B: proliferación, síntesis de IgA
Interferón gamma (IFN- γ)	Linfocitos T (Th1, CD8 ⁺) Linfocitos T NK	Macrófagos: activación (aumento de las funciones Microbicidas) Linfocitos B: cambio a isotipos de subclases de IgG Opcionizadores y fijadoras del complemento Linfocitos T: diferenciación Th1 Varias células: mayor expresión de moléculas de las clases I y II del MHC, mayor procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T
Factor de crecimiento transformador beta (TGF- β)	Linfocitos T, macrófagos, otros tipos celulares	Linfocitos T: inhibición de proliferación y funciones efectoras Linfocitos B: inhibición de la proliferación; síntesis de IgA Macrófagos: inhibición
Leotowina (LT)	Linfocitos T	Atracción y activación de neutrófilos Organogénia linfática
Interleucina-13 (IL-13)	Linfocitos T CD4 ⁺ (T _H 2)	Linfocitos B: cambio a isotipo IgE Células epiteliales: aumento de moco Macrófagos: inhibición

2.3.1. interleucina 1(IL-1)

Es una proteína secretada principalmente por macrófagos, aunque también puede ser secretada por otros tipos celulares (linfocitos T, B, células asesinas naturales, granulocitos, células endoteliales, entre otras). Presenta dos formas IL-1 α e IL-1 β , utilizan el mismo receptor y su acción biológica es indistinguible.

Dentro de sus funciones están las de regulación inmunológica como: estimulación del crecimiento de linfocitos T y B, incremento de la proliferación celular y la síntesis de IL-6, IL-8, TNF- α y de la misma IL-1. Además activa las células asesinas naturales, es citostática para células tumorales, Actúa sinérgicamente con IL-6 para inducir la producción de IL-2 e incrementar la expresión del receptor para IL-2(CD25) (Abbas y Lichtman, 2004; Pappaterra, 2002).

En cuanto a las funciones pro-inflamatorias; por sí sola o actuando en combinación con otras citocinas (IL-6, IL-8, TNF- α) es el pirógeno endógeno responsable de la fiebre que acompaña a las infecciones, incrementa la secreción de proteínas inflamatorias como elastasa y activador del plasminógeno. También como la TNF- α es capaz de activar el endotelio para que los monocitos y neutrófilos se adhieran a la superficie endotelial (Abbas y Lichtman, 2004; Pappaterra, 2002).

2.3.2. interleucina 4(IL-4)

La principal fuente de producción son las células T activadas aunque también pueden producirla otros tipos celulares (mastocitos y basófilos activados, células B entre otras). Posee un receptor específico para IL-4 (CD124) que se expresa en diferentes células. Describiéndose también la existencia de un receptor soluble que puede tener como función bloquear la actividad de esta citocina (Pappaterra, 2002).

La IL-4 es producida principalmente por linfocitos Th2 activados y actúa en linfocitos B y T, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células cebadas. También la

generan basófilos activados. Esta citocina estimula la multiplicación de la diferenciación de los linfocitos B (Abbas y Lichtman, 2004).

La IL-4 promueve el desarrollo de linfocitos T citotóxicos a partir de células T en reposo. Otras veces provoca la multiplicación de linfocitos T de ayuda en ausencia de IL-2. Activa los polimorfonucleares, induce la proliferación de eosinófilos, basófilos y facilita el crecimiento de los mastocitos. En el timo estimula la expresión de las moléculas CD4 y CD8 en los linfocitos T en proceso de maduración. Actuando sobre los macrófagos, los estimula, pero frena su acción bactericida al desactivar a los linfocitos Th1. Regula a la baja la secreción de IL-1, IL-6 y TNF- α , pero incrementa la expresión de MCH clase II, su capacidad de presentación de antígenos y su actividad citotóxica. Induce la proliferación de células cebadas (Tizard 2002; Rojas 2004).

2.3.3. Interferón gama (INF- γ)

Existen tres tipos de INF, son bioquímicamente similares y tienen propiedades individuales únicas. El INF- α e INF- β productos de las células T aunque también lo secretan fibroblastos, macrófagos, células T entre otras células. El INF- γ producido principalmente en las células T y las células NK que utiliza diferente receptor y se ha descrito como un INF inmune o regulador. En apoyo a su papel citorregulador, está la inducción de la síntesis del factor activador de los macrófagos, capacidad de promover la expresión de genes clase II del MHC y su capacidad para incrementar la densidad de IL-2R en células T. (Pappaterra, 2002; Rojas 2004).

El INF- γ promueve la actividad de los linfocitos asesinos naturales NK, los cuales reaccionan al antígeno con la producción de INF- γ , de modo que se establece un ciclo positivo en el que la activación de algunas células NK ocasiona la secreción de INF- γ y la activación de otras células asesinas naturales (NK) (Muraille, *et al*; 1998; Xiao, *et al*; 2004).

El $\text{INF-}\gamma$ activa a los macrófagos e incrementa en gran medida su capacidad de destruir microorganismos engullidos. Además, promueve la fagocitosis mediada por anticuerpo y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). También tienen función antiviral y antiparasitaria. Además de antagonizar el efecto de IL-4, inhibiendo el crecimiento de células B y la producción de IgG1 e IgE favoreciendo la producción de IgG2 (Tizard 2002).

2.3.4. Factor de necrosis tumoral (TNF- α)

El TNF es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda a las bacterias gramnegativas y a otros microorganismos infecciosos responsables de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves (Abbas y Lichtman, 2004).

El TNF- α es un homotrímero secretado por macrófagos, linfocitos T y B y fibroblastos, y actúa casi en cualquier célula nucleada. Se le encuentra en forma soluble o unida a la membrana. Es mediador de muchas funciones inmunitarias e inflamatorias y regula la proliferación de muchos tipos celulares. También activa los macrófagos para incrementar su propia síntesis junto con la de IL-1, IL-6, M-CSF y GM-CSF. Como su nombre lo indica tiene la capacidad de iniciar la apoptosis en algunas células tumorales. Es uno de los principales factores pro-inflamatorios junto a IL-1, IL-6 e IL-8, induciendo la respuesta inflamatoria, fiebre, síntesis de proteínas de fase aguda y, en algunos casos shock séptico. Se conocen dos receptores TNF- α R1(CD120a) y TNF- α R2(CD120b) que son expresados en todas las células con núcleo (Tizard 2002; Rojas 2004).

TNF- α es el responsable activo contra las células tumorales, tiene actividad antibacteriana y antivírica, junto con IL-1 es responsable de diversas alteraciones en el endotelio incrementando la expresión de moléculas de adhesión, inhibiendo los mecanismos anticoagulantes y promoviendo los procesos trombocíticos. También induce la producción de $\text{INF-}\gamma$ y la de IL-1, estimula la fagocitosis (Rojas 2004).

2.4. ELISA

La prueba de inmunoabsorción ligada a enzima es una técnica muy utilizada en inmunología por la posibilidad de estudiar muchas muestras a la vez así como su rapidez. Forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. El ELISA se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente peroxidasa) de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro (Sánchez-Vizcaíno, 2004; Abbas y Lichtman, 2004).

En la actualidad el ELISA es uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico serológico de distintas enfermedades infecciosas porcinas, está recomendado fundamentalmente para el estudio de poblaciones ya que es ampliamente sensible y de gran especificidad, que permite realizar en un corto plazo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica; presenta además una buena reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados (Abbas y Lichtman, 2004).

Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA que permiten aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba, entre ellos están el ELISA indirecto, de captura, sándwich, etc).

2.4.1. ELISA indirecto

Es el método más utilizado para la determinación de anticuerpos. Básicamente, consiste en la inmovilización a la placa de ELISA del antígeno del que queremos conocer si en el suero problema existen anticuerpos específicos. Se pueden utilizar

como antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos (Sánchez-Vizcaino, 2004).

Cada día es más frecuente utilizar exclusivamente las proteínas de interés inmunológico y no todas las proteínas antigénicas. Los pasos siguientes serían la adición del suero problema, incubación y lavado, adición del conjugado, incubación y lavado, finalizando con la adición del sustrato, el frenado de la reacción y la lectura (Fernández-Botran, 2001).

2.4.2. ELISA sandwich

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de antígenos es el modelo ELISA "Sandwich". En esta forma, la placa suele ya venir con un anticuerpo fijado (monoclonal ó policlonal) frente al antígeno problema, sobre el que se añadirá el suero, que en caso de reaccionar con el anticuerpo de la placa, será puesto en evidencia tras la adición del segundo anticuerpo marcado con la enzima. Por último, se añade el sustrato para revelar la reacción (Fernández-Botran, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, así como en la de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit.

3.2. Animales

Se incluyeron 76 animales divididos en tres grupos:

26 cerdos de la raza comercial (F1 Yorkshire-Landrace) (CCO).

25 cerdos de la raza Cerdo Cuino (CC).

25 cerdos de la raza Cerdo Pelón Mexicano (CPM).

Estos animales fueron criados en la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit y vacunados a los 45 días de nacidos con Bacterina Comercial (Bacterina Mixta Porcina Intervet/SAGARPA-B-0273-133) que contiene cepas de *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Pasteurella*, como reto para establecer la reacción inmunológica.

5

3.3. Obtención de las Muestras biológicas.

Se realizaron tres extracciones de sangre sin anticoagulante de 5 mL cada una de la vena cava externa, con tubos al vacío (Vacutainer); la primera antes de la aplicación de la vacuna para medir los niveles séricos iniciales de IgM e IgG, la segunda a los 8 días después de la vacunación para medir los niveles séricos de IgM y citocinas: interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 4 (IL-4), interferón gama (INF- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la tercera a los 15 días después de la vacunación para medir los niveles séricos de IgG (Es decir 45, 53 y 60 días de edad). La sangre se

centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos (Hermle Z160M). El suero se conservó a -20 °C hasta su análisis.

3.4. Variables:

Las variables son:

-Niveles séricos de IgM anti-bacterina comercial, antes y después de la vacunación (45 y 53 días de edad de los cerdos).

-Niveles séricos de IgG anti-bacterina comercial, antes y después de la vacunación (45 y 60 días de edad de los cerdos).

-Concentración sérica de IL-1 β , IL-4, INF- γ y TNF- α (53 días de edad de los cerdos).

3.5. Determinación cuantitativa de IgM e IgG anti-bacterina comercial, en suero.

Se diseñó una prueba para la determinación cuantitativa de IgM e IgG anti-bacterina comercial, en suero mediante un ensayo de ELISA indirecto.

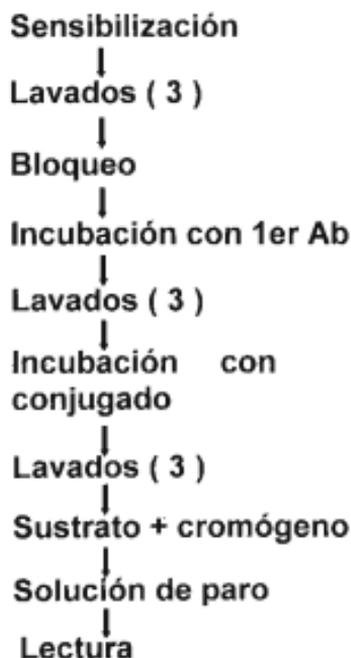
El antígeno utilizado para la detección de anticuerpos de cerdo de las clases IgG ó IgM fue la misma vacuna aplicada a los cerdos con anterioridad, sólo que en este caso la vacuna fue sonicada (30 segundos de sonicación por 1 minuto de reposo; por 30 repeticiones en frío) y después se le realizó la prueba de determinación de proteínas por medio del método de Lowry (Lowry, *et al.*, 1951).

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) que fueron sensibilizadas con 1 μ g de antígeno por pozo diluido en amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.6. La placa se incubó toda la noche a 4°C. Después de desechar el exceso de antígeno, se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS por una hora a 37 °C. Se adicionaron los sueros problema diluidos 1:100 con regulador de bloqueo, se incubó

una hora a 37 °C. Después se lavo 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS-Tween₂₀) al 5%, se añadió un anti-IgM (para determinar IgM) o anti-IgG (para determinar IgG) de cerdo conjugado a peroxidasa (Rockland^R) diluido 1:5000 en PBS-gelatina. Se incubo a 37 °C durante 1 hora y se lavó con (PBS-Tween₂₀) al 5%. Como sustrato se utilizó o-fenilendiamina 0.04 mg.mL⁻¹, y 0.04% de H₂O₂ al 30% en regulador citrato fosfato pH 5. La reacción fue detenida a los 25 minutos para las determinaciones de IgM y a los 15 minutos para las determinaciones de IgG con 25 µL de H₂SO₄ 8N y la absorbancia fue medida en un lector de microplacas de ELISA (Bio-Rad Mod. 680^R) a 492 nm.

Como control conjugado se utilizaron dos pozos sin antígeno y sin suero problema, como control de antígeno se utilizaron dos pozos sin antígeno y con suero problema.

Diagrama de flujo del ensayo ELISA indirecto



3.6. Cuantificación de Citocinas.

La cuantificación de citocinas en suero se realizó mediante kits comerciales, los cuales emplean una técnica de ELISA sándwich, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación de las citocinas IL-1 β y TNF- α se utilizaron kits de R&D Systems, utilizando suero sin diluir y las longitudes de onda de la lectura fueron a 450 nm con corrección a 540nm.

En cuanto a la cuantificación de IL-4 se utilizó un kit (biosource) específico para cerdos utilizando suero sin diluir, y se leyó a una longitud de onda de 450nm.

Para la cuantificación de la Citocina INF- γ en suero mediante un kit (Pierce endogen) específico para cerdos. Se utilizó también suero sin diluir y la lectura se realizó en el aparato con un filtro de 450 nm.

3.7. Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los niveles de IgM e IgG antibacterina comercial, así como para la comparación de los valores de citocinas en las diferentes razas de cerdos; y la prueba de Wilcoxon, para conocer las diferencias entre los distintos pares de combinaciones raciales. En todos los casos se utilizó el "software" SAS, 2002.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de seguir el protocolo antes mencionado, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

4.1. Determinación de los niveles de inmunoglobulina IgM anti-Bacterina Comercial antes de la vacunación.

Los cerdos se destetaron a los 45 días de edad y fueron muestreados antes de la vacunación para determinar los niveles de IgM anti-Bacterina Comercial en sangre.

La vacuna Bacterina Mixta Porcina tuvo una concentración de proteínas de 1521.997 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Como puede observarse (Cuadro No. 4) en las razas de CCO (0.125 ± 0.039) y CC (0.151 ± 0.065) no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de IgM. En cambio, la raza CPM (0.252 ± 0.112) presenta los niveles de esta inmunoglobulina mas altos y estadísticamente significativos ($p < 0.001$) comparando las razas CCO y CC.

Cuadro No. 4. Absorbancias para la variable IgM antes de la vacunación independiente del sexo.

raza	Número de observaciones	variable	Media de las absorbancias	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	26	IgM	0.125 b	0.039	0.077	0.211
CC	25	IgM	0.151 b	0.065	0.068	0.363
CPM	23	IgM	0.252 a	0.112	0.103	0.506

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

En el análisis estadístico independiente del sexo, realizado para los valores obtenidos de las absorbancias de inmunoglobulinas tipo M (IgM) antes de la vacunación mostró diferencias significativas entre las razas de cerdo comercial y cerdo pelón y entre cerdo culno y cerdo pelón, no así entre CCO y CC (Figura No. 10).

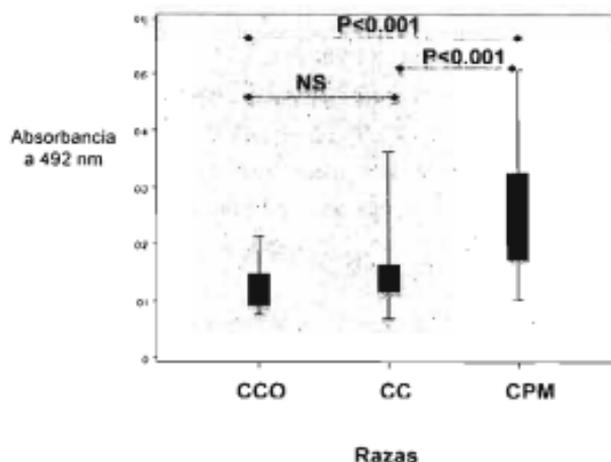


Figura No. 10. Niveles de anticuerpos IgM anti-Bacterina Comercial antes de la vacunación en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo culno), CPM (cerdo pelón mexicano).

El muestreo se realizó antes de la aplicación de la vacuna; se observó que todos los lechones de todas las razas empleadas en este estudio presentaron niveles de IgM y que probablemente las obtuvieron a través de la leche materna, ya que se ha demostrado que en la placenta no existe traslado alguno de inmunoglobulinas maternas por circulación fetal (Tlaskalowa-Hogenova *et al.*, 1994, Hernández, *et al.*, 2004); y que es hasta la tercera semana de vida, que el cerdo comienza la propia producción de anticuerpos; y sólo hasta la sexta u. octava es cuando completa su maduración inmunológica (Buxadé, 1996). Las tres poblaciones raciales de este estudio estuvieron en el mismo ambiente y manejo técnico, por lo que es de suponer que tuvieron contacto previo con las bacterias empleadas en la inmunización.

Así, los CPM tienen mayor cantidad de IgM antes de la vacunación (figura No. 10); sugiriéndose que éstos obtienen mayor cantidad de inmunoglobulinas de la madre por medio de la leche materna.

4.2. Determinación de los niveles de inmunoglobulinas IgM anti-Bacterina Comercial después de la vacunación.

Ocho días después de la vacunación los cerdos fueron muestreados nuevamente para registrar los niveles de IgM anti-Bacterina Comercial, encontrándose que las razas CCO (0.341 ± 0.070) y CC (0.336 ± 0.065) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Cuadro No. 5); mientras que la raza CPM (0.426 ± 0.102) mostró niveles de IgM mas elevados con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$)

Cuadro No. 5. Absorbancias para la variable IgM después de la vacunación independiente del sexo.

raza	Número de observaciones	variable	Medio de las absorbancias	Desviación estándar	Minimo	Máximo
CCO	16	IgM	0.341 b	0.070	0.220	0.463
CC	25	IgM	0.336 b	0.065	0.210	0.476
CPM	25	IgM	0.426 a	0.102	0.232	0.693

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cubano

CPM cerdo pelón mexicano

Para el caso de los niveles de IgM anti-Bacterina Comercial que resultaron del muestreo 8 días después de la vacunación (figura No. 11); se observó que la raza CPM tuvo niveles séricos mas altos, que puede ser debido a que esta raza tenía niveles mas altos desde antes de la vacunación, al correlacionarse en esta raza en forma positiva los niveles de IgM antes y después de la vacunación ($p < 0.0001$).

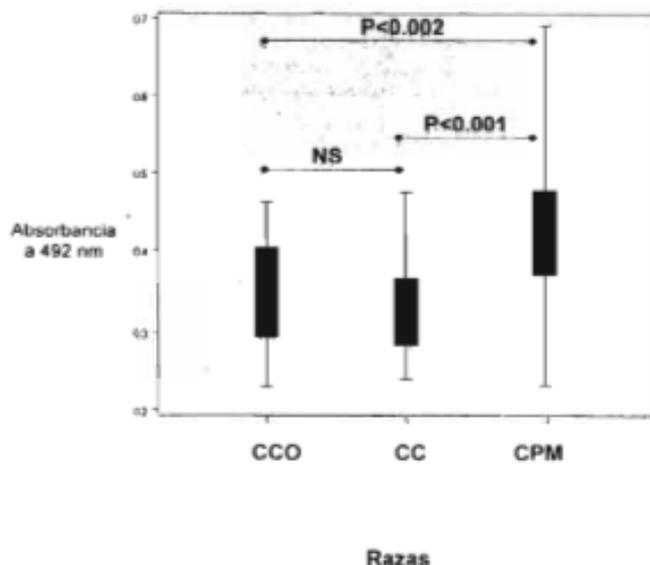


Figura No. 11. Niveles de anticuerpos IgM anti-Bacterina Comercial a los 8 días después de la inmunización en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano).

4.3. Diferencias de los niveles de IgM antes y después de inmunizar.

Antes de la inmunización se observó la presencia de inmunoglobulinas en las tres razas, después de inmunizar hubo un incremento en todas las razas también (Figura No. 12); sin embargo para la respuesta de inmunoglobulinas tipo M (IgM) entre las razas CCO (0.216 ± 0.056) y CPM (0.174 ± 0.088) se observó mayor respuesta en CCO, respondiendo los CC (0.185 ± 0.074) en forma similar a ambas razas (Cuadro 6).

Cuadro No. 6. Diferencia de las absorbancias para la variable IgM independiente del sexo.

raza	Número de observaciones	variable	Medio de las absorbancias	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	26	respuesta IgM	0,214 a	0,054	0,104	0,331
CC	25	respuesta IgM	0,185 ab	0,034	0,060	0,351
CPM	25	respuesta IgM	0,131 b	0,028	0,027	0,355

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

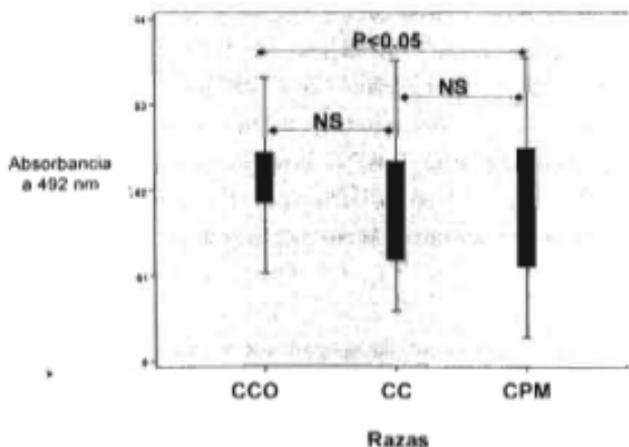


Figura No. 12. Diferencia de los niveles de anticuerpos IgM anti-Bacteria Comercial antes y después de la inmunización en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano).

A pesar de que la respuesta en las diferencias de los niveles de IgM en el periodo antes a después de la inmunización fue más alta en los CCO, esta no se

considera tan importante, ya que no es producida por el lechón, sino que es transferida por la madre.

Aunque no se reportan estudios similares a este, Brown, *et al.*, (2006) realizaron un trabajo con la finalidad de evaluar las características morfológicas intestinales y el desarrollo del sistema inmune de los cerdos a diferentes edades, midieron la concentración de inmunoglobulinas de tipo IgM en cerdos comerciales (a los 7, 14 y 18 días de nacidos, no encontrando diferencias significativas en los valores obtenidos de IgM; sin embargo por análisis complementarios llegaron a la conclusión que el sistema inmune porcino va cambiando conforme va declinando la inmunidad pasiva, y en este estudio sólo se midieron concentraciones de IgM en cerdos en edades tempranas, razón por la cual se sugiere que no coincidan con nuestros resultados.

Carrón, *et al.*, (2005), analizaron las respuesta inmunitaria humoral en cerdos (de 2 y 4 meses de edad) de raza ibérica infectados experimentalmente por un parásito; y observaron una clara diferencia entre la respuesta humoral de IgM en ambos lotes de edad, en los de mayor edad no hubo evolución temporal, en cambio en los animales jóvenes se presentaron evoluciones significativas desde los 7 días después de la vacunación, estos datos coinciden con nuestro estudio ya que en este se observó también el incremento de los niveles de IgM a los 7 días después de la vacunación.

4.4. Determinación de los niveles de inmunoglobulina IgG anti-Bacterina Comercial antes de la vacunación.

Los cerdos se destetaron a los 45 días de edad y fueron muestreados antes de la vacunación para determinar los niveles de IgG anti-Bacterina Comercial en sangre.

En el caso de los niveles de IgG anti-Bacterina Comercial antes de la inmunización, el CCO (0.102 ± 0.031) presentó niveles mas bajos que las razas CC (0.244 ± 0.111) y CPM (0.327 ± 0.182) (Cuadro No. 7) ($p < 0.001$).

Cuadro No. 7. Absorbancia para la variable IgG antes de la vacunación independiente del sexo.

raza	Número de observaciones	variable	Media de las absorbancias	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	26	IgG	0.102 b	0.021	0.052	0.145
CC	25	IgG	0.244 a	0.131	0.073	0.524
CPM	25	IgG	0.327 a	0.182	0.090	0.731

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de esta inmunoglobulina en las razas CC y CPM, que mostraron niveles mas elevados (figura No. 13).

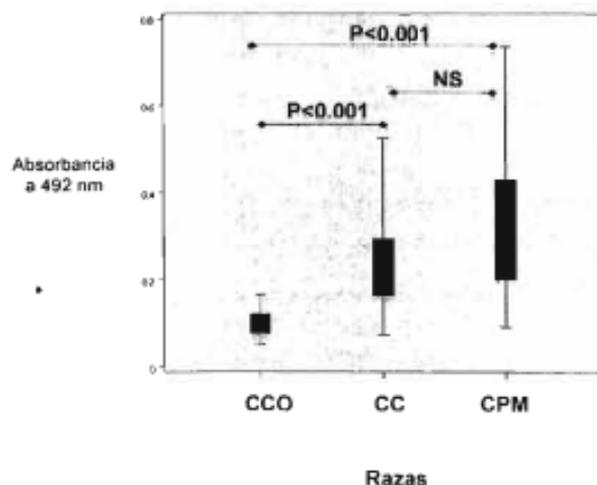


Figura No. 13. Niveles de anticuerpos IgG anti-Bacterina Comercial antes de la vacunación en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano).

Los niveles de IgG antes de la vacunación (figura No. 13) resultaron ser mayores en CPM y en CC, por lo que se sugiere que estos anticuerpos también fueron transferidos por la madre a través del calostro, y que las razas antes mencionadas recibieron mayores cantidades de esta inmunoglobulina.

4.5. Determinación de los niveles de inmunoglobulinas IgG anti-Bacterina Comercial después de la vacunación.

Quince días después de la inmunización, al determinar los niveles de IgG anti-Bacterina Comercial, se observaron niveles menores en la raza CCO (0.220 ± 0.049) (Cuadro No. 8); diferente de las otras razas criollas ($p < 0.001$); mientras que los niveles de esta inmunoglobulina en CC (0.473 ± 0.302) y CPM (0.604 ± 0.358) y en fueron más altos y no mostraron diferencias significativas entre ellas (figura No. 14).

Cuadro 8. Absorbancia para la variable IgG después de la vacunación independiente del sexo.

raza	Número de observaciones	variable	Media de las absorbancias	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	26	IgG	0.220 b	0.049	0.147	0.332
CC	25	IgG	0.473 a	0.302	0.234	1.411
CPM	25	IgG	0.604 a	0.358	0.226	1.539

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

En cuanto a la IgG anti-Bacterina Comercial a los 15 días después de la vacunación (figura No. 14); se observó que las razas CC y CPM respondieron en forma similar con niveles más altos de esta inmunoglobulina; esto es importante ya que la IgG es la inmunoglobulina principal en la respuesta secundaria a la infección y que origina memoria. Estas razas criollas presentaron mas altos niveles desde antes de la inmunización, estos niveles de IgG antes y después de

la vacunación están correlacionados significativamente en ambas razas criollas, y no en la raza comercial.

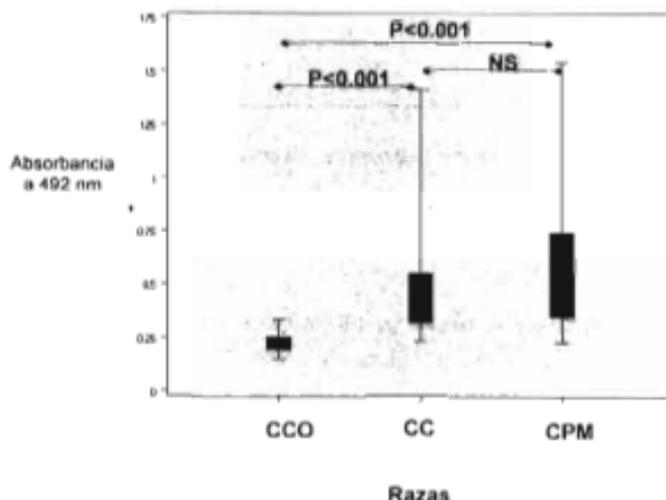


Figura No. 14. Niveles de anticuerpos IgG anti-Bacterina Comercial a los 15 días después de la inmunización en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano).

4.6. Diferencias de los niveles de IgG antes y después de inmunizar.

Para la IgG se observó igual respuesta para las razas CPM (0.277 ± 0.229) y CC (0.229 ± 0.244), en cambio para CCO (0.118 ± 0.054) se observó menor respuesta en los niveles para IgG en el periodo antes a después de la vacunación (Cuadro No. 9).

Cuadro No. 9 Diferencia de las absorbancias para la variable IgG independiente del sexo.

raza	Número de observaciones	variable	Media de las absorbancias	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	26	respuesta IgG	0.119 b	0.054	0.009	0.247
CC	25	respuesta IgG	0.229 a	0.244	0.002	1.103
CPM	25	respuesta IgG	0.271 a	0.229	0.001	0.941

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

El sexo de los cerdos no influyó en los niveles de IgM e IgG ni en las diferencias encontradas en los resultados presentados, antes y después de la inmunización, ni en su respuesta.

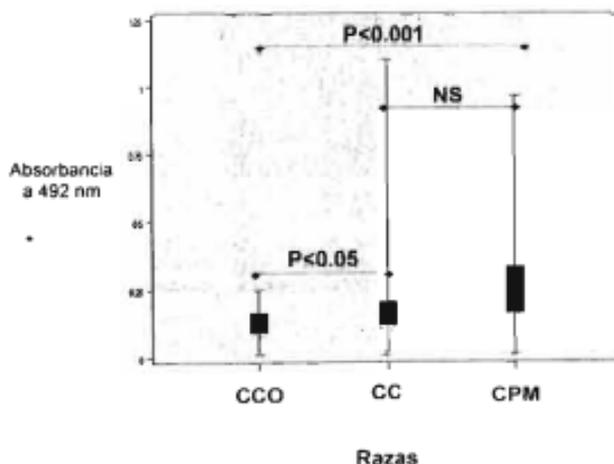


Figura No. 15. Diferencia de los niveles de anticuerpos IgG anti-Bacterina Comercial antes y después de la inmunización en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano).

A pesar de que la respuesta en las diferencias de los niveles de IgM en el periodo antes a después de la inmunización fue mas alta en los CCO, es mas importante la respuesta de los CPM y CC para IgG ya que ésta inmunoglobulina es la que produce memoria (Figura. No. 16).

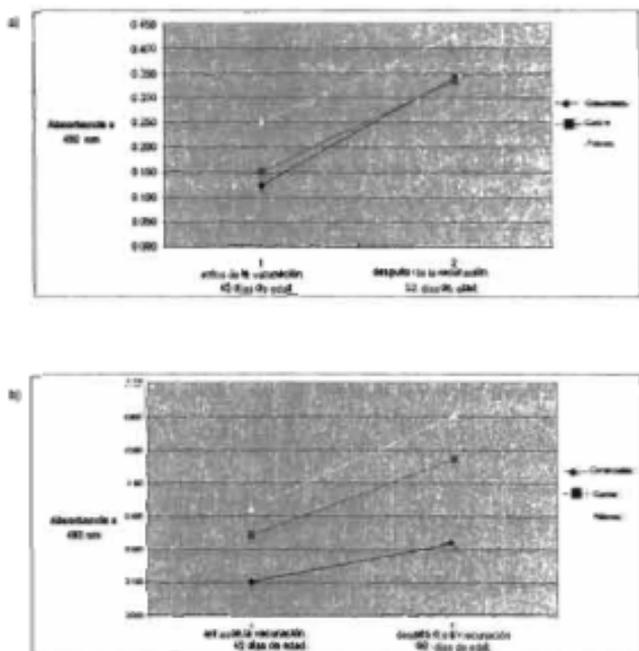


Figura No. 16 a) Niveles de IgM contra los antígenos de la vacuna bacterina comercial en las diferentes razas de cerdo, antes y después de la vacunación. b) Niveles de IgG contra los antígenos de la vacuna bacterina comercial en las diferentes razas de cerdo, antes y después de la vacunación.

En estudios previos realizados con la finalidad de comparar la respuesta inmune humoral de los niveles de IgG con 12 CPM y 12 CCO vacunados con vacuna triple, Guerrero-Quiroz, *et al.*, (2005) mostraron resultados parecidos, haciendo muestreos a los 28, 32, 45 y 60 días de edad (antes del destete, después del destete, antes de la vacuna y en la maduración inmunológica); encontrando también niveles más altos de IgG en el CPM.

Existe otro estudio por Gomez, *et al.*, (1998), donde se miden diferentes variables hematológicas e inmunológicas en cerdos con diferente alimentación (con calostro de cerda, sin calostro, con calostro bovino y con inmunoglobulinas porcinas) en los primeros días después del nacimiento; se observan diferencias en los cerdos alimentados con calostro de cerda, ya que responden mejor que los alimentados con otros tratamiento utilizados; a pesar de que los cerdos se muestrearon a los pocos días después de nacidos (2, 4, 7, 14 y 19 días) se observó que los valores de IgG aumentaron desde los 2 y 4 días después de nacidos, sin embargo; fueron disminuyendo a los 7, 14 y 19 días. Cabe mencionar que no se realizaron mediciones a mayor edad por lo que no se puede realizar la comparación con nuestro estudio; sin embargo, se hace referencia a la administración de inmunoglobulinas por medio del amamantamiento.

4.7. Determinación de los niveles de citocinas.

Los cerdos se destetaron y vacunaron a los 45 días de edad y fueron muestreados siete días después de la vacunación para determinar los niveles séricos de las citocinas.

4.7.1. Determinación de los niveles de IL-1 β .

Como puede observarse (Cuadro No. 10) en las razas de CCO (16.9730 \pm 9.160) y CC (17.097 \pm 14.833) no hubo diferencias significativas para los niveles de IL-1 β . En cambio, la raza CPM (21.848 \pm 10.275) presenta los niveles mas altos ($p < 0.05$) comparado con las razas CCO y CC.

En el análisis estadístico independiente del sexo, realizado para los valores obtenidos en pg.mL⁻¹ de IL-1 β después de la vacunación mostró diferencias entre las razas de cerdo comercial y cerdo pelón y entre cerdo cuino y cerdo pelón, no así entre CCO y CC, ($p < 0.05$) (Figura No. 17).

Cuadro No. 10. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de IL-1 β a los siete días después de la vacunación, independiente del sexo.

Raza	Número de observaciones	variable	Media en pg.mL^{-1}	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	14	IL-1 β	16.730 b	9.160	0.963	32.142
CC	13	IL-1 β	17.091 b	14.833	0.000	59.878
CPM	10	IL-1 β	21.448 a	10.275	14.190	49.661

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

En todas las razas se mostraron niveles de IL-1 β .

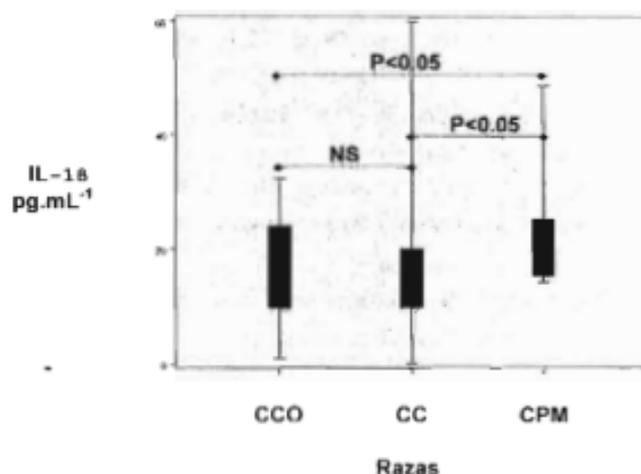


Figura No. 17. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de IL-1 β , a los siete días después de la vacunación en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano) a una Absorbancia de 450 nm con corrección a 540nm.

A pesar de los escasos estudios comparativos entre la raza de cerdo comercial y los cerdos criollos que se han reportado, existe un estudio publicado por Guerrero-Quiroz, *et al.*, (2006) que se realizó con la finalidad de comparar la respuesta inmune humoral través de la cuantificación de los niveles de IL-1 β donde utilizó 12 cerdos de la raza CPM y 12 cerdos de la raza CCO, vacunados con vacuna triple y muestreándolos: antes del destete, después del destete, después de la vacuna y en la maduración inmunológica (28, 32, 45 y 60 días de edad); encontrando también niveles más altos de IL-1 β en el CPM; sin embargo, los niveles que se reportan son mucho más altos que los mostrados en este estudio

La IL-1 β desempeña un papel importante en la defensa contra bacterias Gram negativas (Abbas y Lichtman, 2004), y las bacterias contenidas en la vacuna comercial que se aplicó a los cerdos es de ese tipo; sin embargo, no se puede asegurar que los niveles que se reportan de esta citocina se deban a la vacunación, ya que los cerdos se encuentran en condiciones no controladas y cualquier estímulo (infección o contacto) puede generar el aumento de ella. Sin embargo, se reporta al igual que en el trabajo antes mencionado que si existen niveles de IL-1 β y que la raza que presenta mayores niveles es CPM. Sugiriéndose también un estudio posterior infectando a los cerdos y muestreándolo antes y después de la infección, con manejo técnico especial.

Otro estudio reportado es el de Huang, *et al.*; (1999) donde se realizó *in vitro* la producción de citocinas proinflamatorias en células de cerdo infectándolos con *Actinobacillus pleuropneumoniae* y en condiciones controladas; donde también se observó el incremento de los niveles de IL-1 coincidiendo con el establecimiento de la enfermedad clínica aguda.

4.7.2. Determinación de los niveles de IL-4.

A los siete días después de la vacunación se realizó el muestreo para la IL-4. Se encontró que la raza CPM tiene mayores concentraciones de esta citocina en referencia a la raza CCO (Figura No. 18).

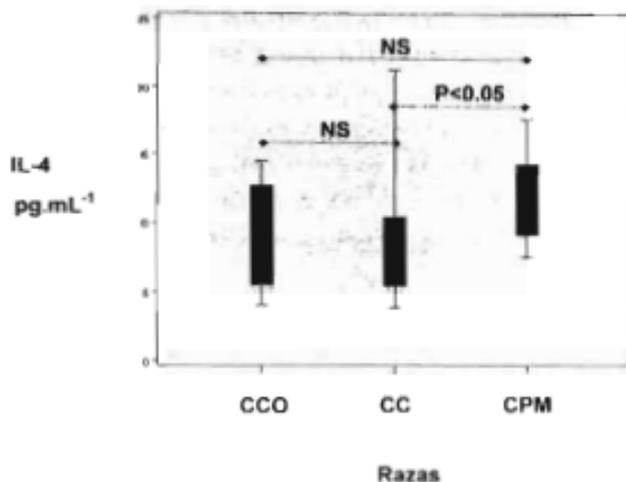


Figura No. 18. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de IL-4, a los siete días después de la vacunación en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano) a una Absorbancia de 450 nm.

Como puede observarse en (Cuadro No. 11) entre las razas CC (8.423 ± 4.437) y CPM (11.804 ± 3.491) hubo mayor respuesta en la raza CPM, y la raza CCO (9 ± 3.780) fue similar a ambas razas.

Cuadro No. 11. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de IL-4 a los siete días después de la vacunación, independiente del sexo.

raza	Número de observaciones	variable	Medio en pg.mL^{-1}	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	13	IL-4	9.700 ab	3.780	4.001	14.491
CC	14	IL-4	8.423 bc	4.437	3.873	23.270
CPM	9	IL-4	11.804 a	3.491	7.855	17.887

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

Aunque no se reportan estudios similares a este, Brown, *et al.*, (2006) realizaron un trabajo con la finalidad de evaluar las características morfológicas intestinales y el desarrollo del sistema inmune de los cerdos a diferentes edades, midieron los niveles de IL-2 e IL-4 en cerdos comerciales (a los 7, 14 y 18 días de nacidos), no encontrando diferencias entre los niveles referidos. Cabe mencionar que en este estudio sólo se midieron los niveles de estas citocinas en cerdos en edades tempranas, razón por la cual se sugiere que no coincidan nuestros resultados.

Al igual que en la IL-1 β no podemos aseverar que los niveles resultantes de IL-4 en cerdos se deba a la vacunación, ya que los animales no estuvieron en condiciones controladas pudiendo recibir otro estímulo que desencadenó los niveles de esta citocina, pero también queda de manifiesto que los CPM responden mejor a este tipo de estímulos, ya que se observaron niveles más altos en esta raza.

La variación genética en las poblaciones criollas en México, Cuba como en España, se ha encontrado que es más alta que en los cerdos de raza comercial, factor que puede ser predisponente a una mejor respuesta inmunológica. Los Cerdos Criollos locales filogenéticamente se encuentran separados genéticamente de los cerdos modernos, situación que sugiere que así se han conservado a pesar de la falta de programas sistematizados de mejora genética (Martínez *et al.*, 2000; Lemus *et al.*, 2001).

En nuestro país no se han aplicado programas de selección productiva para este tipo de cerdos criollos; sin embargo, han sobrevivido por más de 500 años a problemas de zoonosis, lo que hace suponer que tienen alta resistencia a enfermedades, además de representar un reservorio genético para obtener variedades nacionales mejor adaptadas. (Benitez y Sánchez, 2001; Lemus *et al.*, 2001; Sierra, *et al.*, 2005; Canul, *et al.*, 2005).

4.7.3. Determinación de los niveles de INF- γ .

Los cerdos se destetaron y fueron vacunados a los 45 días de edad, siete días después de la inmunización, se determinó la concentración de la citocina INF- γ .

En el análisis estadístico, realizado para los valores obtenidos en pg mL^{-1} de INF- γ después de la vacunación no se encontraron diferencias significativas entre las razas de cerdo analizadas (Figura No. 19).

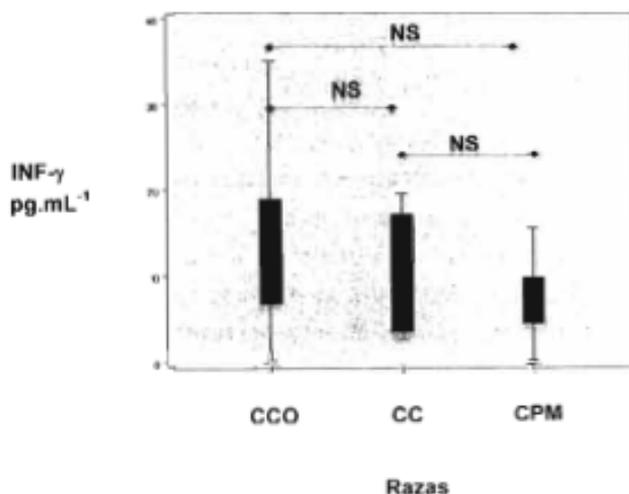


Figura No. 19. Valores obtenidos en pg mL^{-1} de INF- γ , a los siete días después de la vacunación en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano) a una Absorbancia de 450 nm.

Como puede observarse en el Cuadro No. 12 en referencia a la citocina INF- γ , en las razas de CCO (13.362 ± 10.226), CC (10.520 ± 7.107) y CPM (7.469 ± 4.494), no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro No. 12. Absorbancia para la variable IgM después de la vacunación independiente del sexo.

Raza	Número de observaciones	variable	Media en pg/mL-1	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	15	INF- γ	13.362 a	10.266	0.146	35.061
CC	13	INF- γ	10.520 a	7.107	2.498	19.494
CPM	10	INF- γ	7.469 a	4.404	0.000	15.322

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

Siendo esta citocina tóxica en altas concentraciones no se espera su producción (Fresno, *et al*; 1997); El INF- γ se produce en la respuesta innata a la infección, al no encontrarse enfermos los animales se esperaría que los niveles de la citocina fueran normales; sin embargo, en este estudio se pone de manifiesto que si hay producción de en todas las razas de cerdos y que no se encontraron diferencias en las razas.

Xiao, *et al*; (2004) realizaron un estudio en cerdos comerciales de 4 meses de edad infectándolos con el virus del síndrome porcino reproductivo y respiratorio (PRRSV) y observaron diferencias entre los niveles de antes de después de la infección, diferencias que no pueden ser comparables con nuestro estudio, ya que los cerdos utilizados tuvieron en condiciones controladas libres de cualquier estímulo externo.

4.7.4. Determinación de los niveles de TNF- α .

A los siete días después de la vacunación se procedió con la determinación de la concentración de los valores de TNF- α para las tres razas de cerdos.

En el análisis estadístico, realizado para los valores obtenidos en pg.mL^{-1} de TNF α , después de la vacunación no se encontraron diferencias significativas entre las razas de cerdo analizadas (Figura No. 20).

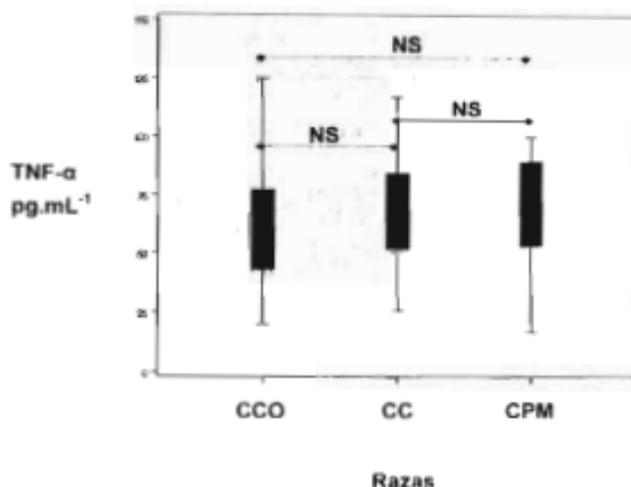


Figura No. 20. Valores obtenidos en pg.mL^{-1} de TNF α , a los siete días después de la vacunación en las diferentes razas de cerdo. CCO (cerdo comercial), CC (cerdo cuino), CPM (cerdo pelón mexicano) a una Absorbancia de 450 nm con corrección a 540nm.

Como puede observarse en el Cuadro No. 13 en referencia a la citocina TNF- α , en las razas de CCO (59.953 ± 24.184), CPM (66.747 ± 23.559) y CC (66.783 ± 20.943) no hubo diferencias estadísticamente significativas entre razas.

Cuadro No. 13. Absorbancia para la variable IgM después de la vacunación independiente del sexo.

raza	Número de observaciones	variable	Medida en pg.mL-1	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
CCO	21	TNF- α	59.952 a	24.184	19.962	125.431
CC	21	TNF- α	66.193 a	20.943	25.574	117.521
CPM	22	TNF- α	69.747 a	23.559	16.648	100.000

Valores señalados con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$)

CCO cerdo comercial

CC cerdo cuino

CPM cerdo pelón mexicano

A pesar de que no se reportan estudios similares a este; Huang *et al.*, 1999, realizaron muestreos en células de cerdos *in vitro* antes y después de su estimulación, y observaron el aumento de la citocina TNF- α y se concluyó que su elevación en cerdos ocurre coincidentemente cuando se presenta la infección clínica aguda.

Aunque no se observaron diferencias entre los niveles de TNF- α e INF- γ producidas por los cerdos de todas las razas, todos ellos las producen, sugiriéndose estudios posteriores que permitan medir los valores de estas citocinas antes y después de la vacunación y con cerdos en condiciones controladas, ya que existen estudios como los de Huang, *et al.*, 1998, Fujimoto, *et al.*, (2002), Lee, *et al.*, (2004); donde se realizaron mediciones de diferentes citocinas todos en condiciones controladas y algunos incluso *in vitro*.

V. CONCLUSIONES

- La mayor respuesta después de la inmunización para los niveles de IgM anti-bacterina comercial se encontraron en la raza CCO.
- La mayor respuesta después de la inmunización para los niveles de IgG anti-bacterina comercial se encontró en las razas CPM y CC.
- La raza CPM presentó los mayores niveles de IL-1 β e IL-4 comparado con las razas CCO y CC.
- La raza CPM tiene mejor respuesta humoral comparada con las razas CC y CCO, lo que corrobora la hipótesis planteada en este trabajo.

VI. LITERATURA CITADA

1. Abbas, K.A., Lichtman, H.A. 2004. *Inmunología Celular y Molecular*. Quinta Edición. Editorial Elsevier. Madrid España.
2. Anderson M.D., 2006. Conceptos sobre el sistema inmunitario. Informes para médicos. *Oncolog*, 51(2).
www2.mdanderson.org/depts/oncolog/sp/articles/06/2feb/2-06-hc.html.
3. Barret, T.J. 1993. *Inmunología Médica*. Texto y revision. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F.
4. Benitez, O.W., y Sánchez, D.M. 2001. Los cerdos criollos en América Latina. En FAO (ed.). *Los Cerdos Locales en los Sistemas Tradicionales de Producción*. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal. 148,13-35.
5. Binns, R.M. 1982. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet. Immunol. Immunopath*. 3, 95-146.
6. Brown, C.D., Maxwell, V.C., Erf, F.G., Davis, E.M., Singh, S., and Johnson, B.Z. 2006. Ontogeny of T Lymphocytes and intestinal morphological characteristics in neonatal pigs at different ages in the postnatal period. *J. Anim. Sci.* 84, 567-578.
7. Buxadé, C.C. 1996. *Zootecnia. Bases de Producción animal*. Tomo VI. Mundi Prensa. Barcelona España.
8. Canul, S.M., Sierra, V.A., Martínez, M.A., Ortiz, O.J., Delgado, J.V., Vega-Pia, J.L., y Pérez G.F. 2005. Caracterización genética del cerdo pelón mexicano mediante marcadores moleculares. *Arch. Zootec.* 54, 267-272.
9. Carrón, A., Frontera, E., Sánchez, J., Alcalde, M., Serrano, F. 2005. Respuesta inmunitaria humoral en cerdos infectados experimentalmente por *Ascaris suum*. Congreso Internacional Virtual 1-5.
<http://www.congresocbta.unam.mx/MV13.htm>
10. Chung, F.K. 2001. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir. J.* 18, suppl. 34, 50s-59s. Congreso virtual.
www.congresocbta.unam.mx/MV13.htm.

11. CVID. 2003. Centro Virtual, Investigación y Desarrollo.
<http://lead/virtualcenter.org/es/dec/toolbox/Index.htm>.
12. Durán, R. 1990. Aspectos fisiológicos del destete en el lechón. Mundo Ganadero N° 10. México D.F.
13. FAO 2000. Domestic Animal Diversity Information System: FAO, Rome.
<http://www.fao.org7dad-is7>>. Consulado diciembre del 2002.
14. Fernández-Bofran, R., Vetvicka, V. 2001. Methods in cellular immunology. 2ª. Edición. Washington D.C.
15. Flores, M.J.M. 1992. Enciclopedia Técnica del Ganado Porcino. Edit. Limusa México. D. F.
16. Fresno, M., Kopf, M., Rivas, L. 1997. Cytokines and infectious diseases. Immunol. Today. 18, 56-58.
17. Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., De leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J. and MacLennan, D.H. 1991. Identification of mutation in the porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hyperthermia. Science 253, 448-451.
18. Fujimoto, M., Tsutsui, H., Yamikura-Futatsugi, S., Ueda, H., Xingshou, O., Abe, T., Kawase, I., Nakanishi, K., Kishimoto T. and Naka, T. 2002. A regulatory role for supresor of cytokine signaling-1 in Th polarization in vivo. Jap. Soc. Immunol. 14(11), 1343-1350.
19. Glimcher, L., Murphy, K. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. Genes develop. 14, 1693-1711.
20. Goldsby, R.A., Kindt, J.T., Osborne, B.A., Kubi, J., 2004. Immunología. 5a. Edición. Mc Grawn-Hill Interamericana. México, D. F.
21. Gomez, G.G., Phillips, O., and Goforth, A. R. 1998. Effect of Immunoglobulin Source on Survival, Growth, and Hematological and Immunological Variables in Pigs. J. Anim. Sci 76, 1-7.
22. Guerrero-Quiroz, L.A., Villagómez D.A.F., Galindo-García, J., Taylor-Preciado, J.J., Sánchez-Chiprés, D.R., Ayala-Valdovinos, M.A., Merlos-Barajas, T.M. 2006. Estudio comparativo de la respuesta inmune humoral a través de los

- niveles de IL-1 β en el cerdo pelón y una raza comercial. AMVEC Memorias. XLI Congreso Nacional. Ixtapa Zihuatanejo. México.
23. Guerrero-Quiroz, L.A., Villagómez, D.A.F., Galindo-García, J., Taylor-Preciado, J.J., Sánchez-Chiprés, D.R., Ayala-Valdivinos, M.A., Merlos-Barajas, T.M., 2005. Estudio comparativo de la respuesta inmune humoral a través de los niveles de IgG en el cerdo pelón y una raza comercial. AMVEC Memorias. XL Congreso Nacional. León, Gto. México.
24. Harris, P.D., Haynes L., Sayles C.P., Duso K.D., Eaton M.S., Lepak M.N., Johnson L.L., Swain L.S., and Lund E.F. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. <http://immunol.nature.com.mx>. 1(6), 475-482.
25. Huang, H., Potter, A. A., Campos, M., Leighton, A. F., Willson, J. P., Haines, M. D., and Yates G. D. 1999. Pathogenesis of Porcine *Actinobacillus* Pleuropneumonia, Part II: Roles of Proinflammatory Cytokines. *Can J. Vet.* 1, 69-78.
26. Huang, H., Potter, A. A., Campos, M., Leighton, A. F., Willson, J. P., Yates G. D.W. 1998. Pathogenesis of Porcine *Actinobacillus* Pleuropneumonia, Part I: Effects of Surface Components of *Actinobacillus pleuropneumoniae* In vitro and In vivo. *Can J. Res.* 62, 93:101.
27. Kidd, P. 2003. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. *Alter. Med. Rev.* 8 (3), 223-246.
28. Kurita, H., Kamei, T., Nagota, K., Yoshida, T., Taniwaki, H., Ono, Y., Morita, K., and Shima S. 2001. Natural Killer Cell Activity in Mice after Intraperitoneal Administration of Berillium Chloride. *J. Occup. Health* 43, 284-286.
29. Lee, Y. D., Young, W. C., Sang, G. K., Sung, J.S., Han, S.Y. 2004. Development of a novel antigen capture-ELISA using IgY against porcine interleukin-6 and its application. *J. Vet. Sci.* 5(4), 337-343.
30. Lemus, F.C., Alonso, M.R., Alonso-Spilsbury, M. and Ramirez, N.R., 2003. Morphologic characteristics in Mexican native pigs. *Características morfológicas en cerdos nativos mexicanos. Arch. Zootec.* 52, 197.

31. Lemus, F.C., Ulloa-Arvizu, R., Ramoskuri, M., Estrada F.J. and Alonso R.A., 2001. Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. *J. Anim. Sci.*, 79, 1-6.
32. Lemus, F.C., y Alonso-Spilsbury, M., 2005. El cerdo pelón mexicano y otros cerdos criollos. 1ª. Edición. Universidad Autónoma de Nayarit.
33. Linton, P.-J., Bautista B., Biederman E., Bradley S. E., Harbertson J., Kondrack M. R., Padrick C.R. and Bradley M.L. 2003. Costimulation via OX40L expressed by cells is insufficient to determine to extent of primary CD4 cell expansim and Th2 Cytokine Secretion *in vivo*. *J. Exp. Med.* 197, 875-883.
34. Lowry, O.H., Rosenbrough N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. of Biolo. Chem.* 193, 355.
35. Margni, R. A. 1996. *Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos*. 5ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina.
36. Mariscal, A.V., 1998. Impacto del mejoramiento genético sobre la eficiencia reproductiva en cerdos. Tercer foro de análisis de los recursos genéticos. México. pp. 92-101.
37. Martínez, A.M., Delgado, J.V., Rodero, A. and Vega-Pla J.L., 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Anim. Gen.* 31, 295-301.
38. Martínez, A.M., Pérez-Pineda, E., Vega-Pla J.L., Barba C., Velásquez F.J., Delgado, J.V., 2005. Caracterización genética del cerdo criollo cubano con microsatélites. *Arch. Zootec.* 54, 369-375.
39. Molina, I.J. 2005. *Principios de Urgencias Médicas y Cuidados Críticos*. UNINET. Sun Microsystems. Revista SAMIUC. España.
40. Muraille, E., Leo, O. 1998. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J. Immunol* 47, 1-9.
41. O'Brien, P.J., Shen, H., Cory, R. and Zhang, X., 1993. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) on 10,000 breeding swine. *JAVMA*, 203, 842-51.

42. O'Garra A., Vieira, L.P., Vieira P, and Goldfeld E.A. 2004. IL-10 producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J. Clin. Invest.* 114, 1372-1378.
43. Pappaterra, M. J. G., 2002. Efecto *in vitro* e *in vivo* de un inmunomodulador compuesto por LPS de *E. coli* y *Propionibacterium granulosum* sobre el sistema inmune del cerdo. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
44. Parslow, G. T., Suites, P. D., Terr I. A., Imboden B. J. 2002. Inmunología básica y Clínica 10a. Edición. Editorial El Manual Moderno. México.
45. Paul, W., Seder, R. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.
46. Pistoia, V. 1997. Production of cytokines by human B cells in health and disease *Immunol. Today* 19, 343-349.
47. Ramírez, A.J.L., Ruiz-Argüelles A. 1996. Inmunología. Parte C, Libro 2. 1a. Edición. Edición de Intersistemas. Programa Nacional de Actualización y Desarrollo Académico para el Médico General. México, D.F.
48. Roitt, I. M., Delves J. P. 2001. Inmunología Fundamentos. 10a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
49. Rojas, M.W. 2004. Inmunología. 13ª. Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín Colombia.
50. Saalmüller, A. 1998. Linfocitos T y la respuesta inmune específica de antígeno contra patógenos varios en el cerdo. *Rev. Sci. tech. off. int. Epiz.*, 17, 71-83.
51. Sanchez-Vizcaino, J.M. 2004. Curso de introducción a la Inmunología porcina. Revista electrónica de Veterinaria. www.veterinaria.org ISSN 1695-7504.
52. Sierra A.C., Poot, B.T., Díaz, I.Z., Cordero, H A., Delgado V.J., 2005. El cerdo pelón mexicano, una raza en peligro. *Arch. Zootec* 54,165-170. México.
53. Sierra, V.A., Canal, S.M., Cen, A.F., Rodríguez, C.R., Delgado, B.J.V., Martínez, M.A., 2003. El cerdo pelón mexicano: programa de conservación genética de una raza en peligro. *Arch. Zootec* 52, 279-284. México.
54. Tizard, I. R., 2002. Inmunología Veterinaria. Mc Graw-Hill Interamericana. México D.F.

55. Tlaskalová, H., Hogenová, H., Mandel, L., Trevichavsky, I., Kováru, F., Barot, R., Sterzl, J., 1994. Development of immune response in early pig ontogeny. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 135-142.
56. Vinay, Kumar., Abbas, K. A., Nelson F. 2005. *Patología Estructural y Funcional Robbins*. Séptima edición. Elsevier. Madrid España.
57. Xiao Z., Trincado A. C., Murtaugh P. M., 2004. B-Glucan enhancement of T cell INF- γ response in swine. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 102, 315-320.