

RESPUESTA INMUNE CELULAR MEDIANTE TECNICAS DE LINFOPROLIFERACION Y FAGOCITOSIS EN CERDOS PELÓN MEXICANO ANTES Y DESPUES DEL DESTETE

L.A. Guerrero¹, D.A.F. Villagómez¹, G. Zaitzeva², C. Lemus³, J.J. Taylor⁴, J. Galindo¹, D.R. Sánchez¹, M.A. Ayala¹, M.T. Merlos¹ y J.J. Roa⁵

¹ Instituto de Biotecnología Animal, División de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Universidad de Guadalajara, Apartado Postal 218. Zapopan 1, Código Postal 45101, Zapopan, Jalisco, México
email: lguerre@cucba.udg.mx

² Departamento de Biología Celular y Molecular. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Universidad de Guadalajara, Guadalajara. Jalisco, México

³ Posgrado de Biología y Agropecuaria. Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura "Amado Nervo", Tepic. Nayarit, México

⁴ Departamento de Producción Animal. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Universidad de Guadalajara, Guadalajara. Jalisco, México.

⁵ Departamento de Medicina Veterinaria. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Universidad de Guadalajara, Guadalajara. Jalisco, México

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune celular en lechones de cerdos Pelón Mexicano (PM) en la etapa pre-destete y post-destete a través de dos técnicas inmunológicas: linfoproliferación y fagocitosis, caracterizando inmunológicamente y comparándolo con cerdos comerciales (Yorkshire x Landrace, YL). Los linfocitos T de sangre periférica se estimularon con las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL de fitohemaglutinina (FHG) para establecer la dosis óptima de mitógeno en la respuesta proliferativa celular y determinar la mejor actividad blastogénica. También se midió y comparó la actividad fagocítica de macrófagos en ambos grupos de animales.

Los resultados mostraron una respuesta similar en la linfoproliferación y fagocitosis en ambos genotipos de cerdos, antes y después de la etapa del destete. Sin embargo, existió una tendencia de dar una mayor respuesta inmune celular en los cerdos PM que en los YL. No obstante el porcentaje de fagocitos activos (FA) e índice de ingestión (II) fue significativamente diferentes ($P < 0.05$) entre grupos, siendo mayor y significativa la respuesta inmune del cerdo PM ($P < 0.01$). No existieron diferencias significativas entre razas de cerdos sobre el índice de cuentas por minuto (cpm), como medida de linfoproliferación, e índice de digestión (ID) en la fagocitosis. Se observaron porcentajes de mortalidad similares en ambas líneas de cerdos durante el periodo de estudio.

Se considera que la respuesta inmune celular del cerdo Pelón Mexicano en nuestro medio tiende a ser mejor que la de un cerdo comercial, mejorado, como el Yorkshire x Landrace, debido quizá a su memoria inmunológica, rusticidad, a su mejor adaptación al medio y a que pueden ser reservorios de determinantes genéticos de resistencia natural a diferentes enfermedades.

Palabras claves: cerdo, Pelón Mexicano, Yorkshire x Landrace, predestete, postdestete, linfoproliferación, fagocitosis

Título corto: Respuesta Inmune celular en Cerdos Pelón Mexicano

CELLULAR IMMUNE RESPONSE THROUGH TECHNIQUES OF LINFOPROLIFERATION AND FAGOCITOSIS IN PELON MEXICANO PIGS BEFORE AND AFTER WEANING

SUMMARY

The objective of this work was studied the immune cellular response in Pelón Mexicano (PM) pig in the pre-weaning and post-weaning stages by two immunological techniques: lymphoproliferation and phagocytes, characterizing immunological and values were compared to that commercials (Yorkshire x Landrace, YL) pigs. The lymphocytes T in peripheral blood were stimulated by the concentrations of 5, 10 and 20 µg/mL of fitohemagglutinin (PHA) to establish the ideal dose of mitogen in the proliferative cellular response and to determine the best blastogenic activity. The phagocytes activity of macrophages was also measured and compared in both groups.

It was found a similar response in the lymphoproliferation and phagocytes in both types of pigs, PM and YL genotypes, before and after weaning. Nevertheless, a trend existed of PM animals to show a major immune cellular response as compared to the YL pigs. Nevertheless the percentage of active phagocytes and ingestion index was significantly different between groups, being major and significant the immune response of the PM pigs ($P < 0.01$) than in the YL genotype. There were not significant differences between both

breeds of pigs in the counts per minute index as a measure of lymphoproliferation, as well as in the index of digestion in the phagocytes. Similar percentages of mortality were observed in both lines of pigs during the period of study.

It is considered that the immune cellular response in the PM pig in its miliey tends to be better than an improved, commercial pig such as the Yorkshire x Landrace genotype, perhaps due to its immunological memory, rusticity, and its better adaptation to the environment, and because they can be reservoirs of genetic determinants for natural resistance to different diseases.

Key words: pig, Pelón Mexicano, F1 Yorkshire x Landrace, pre-weaning, post-weaning, Lymphoproliferation, Phagocytosis

Short title: Cellular immune response in Pelón Mexicano pigs

INTRODUCCION

En México se han realizado pocos estudios para caracterizar al cerdo nativo que es conocido como Cerdo Pelón Mexicano. El cerdo Pelón Mexicano (PM) representa una población endémica que se localiza en las Costas Mexicanas del Océano Pacífico, del Atlántico y en el Sureste de México (Baldizón 1971). Esta población fue originada a partir de animales introducidos por los españoles durante los primeros años de la conquista del país. Dicha población es probable que se haya formado a partir de cerdos tipo Ibérico, Céltico y Napolitano con cerdos de tipo Asiático provenientes de China, Japón o Filipinas, por el comercio establecido después de la conquista (Flores 1970).

Estos animales se volvieron silvestres, esparciéndose por el territorio nacional, la falta de control propició el cruzamiento entre estas razas, trayendo como consecuencia la creación de nuevos biotipos como el llamado cerdo PM. Así, de manera natural, esta población fue seleccionada a las distintas condiciones ecológicas, incluyendo factores infecciosos y nutricionales al menos por 500 años (Gallardo 1941; Berruecos 1972; Flores 1992). Actualmente estas poblaciones se localizan en el Golfo de México y costas mexicanas del Océano Pacífico; comprendiendo los estados de Oaxaca, sur de Veracruz, Chiapas, Guerrero, Tabasco, Yucatán y algunos estados hacia el occidente del país como Michoacán, Nayarit y Jalisco (Tello y Cisneros 1990).

En México, la porcicultura es una actividad que se encuentra en los tres primeros lugares de importancia en el ramo pecuario, teniendo la producción de traspatio o rural un gran interés de autoconsumo. Dentro de la producción de traspatio o rural, que es el sistema básico en regiones tropicales, el cerdo PM representa una importante alternativa de fuente de proteína de origen animal y de autosuficiencia económica (Lemus 1999). El cerdo PM tiene la cabeza y cara rectilínea, orejas de tamaño mediano, semirectas, dorso un tanto rectilíneo con ancas completamente caídas, el cuerpo está parcial o totalmente desprovisto de pelo, su color es grisáceo o combinado con blanco y son de talla mediana, teniendo una alzada de 72 cm y una longitud de 1.4 a 1.5 m (Castellanos y Gómez 1984; Flores 1992), es el más abundante, difundido y estudiado, tiene semejanza con el cerdo Ibérico.

Estos animales son de gran rusticidad, aprovechan gran cantidad de granos, frutas, raíces y subproductos agrícolas, así como desperdicios domésticos generados en el núcleo familiar, razón por la cual son explotados bajo un sistema poco

tecnificado y, por lo regular, no se tiene algún tipo de prevención contra las enfermedades bacterianas y parasitarias más comunes, por lo que muy probablemente presentan alta resistencia a las enfermedades de una manera adaptativa (Cárdenas 1966; Baldizón 1971).

Por lo anterior, estas poblaciones pueden ser el origen de determinantes genéticos de resistencia natural a diversas enfermedades, habilidades digestivas para consumir subproductos fibrosos y tolerancia a condiciones tropicales (Nájera 1989). Por otro lado en estudios inmunológicos realizados con cerdos de líneas comerciales se conoce que el lechón, al nacimiento, se encuentra prácticamente desprovisto de anticuerpos, esto es debido a las seis capas de tejido que contiene la placenta del cerdo, por lo que la transferencia de la inmunidad pasiva es adquirida por medio del calostro al ingerir anticuerpos maternos (Newby et al 1982).

Por las razones antes expuestas se realizó el presente estudio inmunológico que nos permite valorar la capacidad de respuesta inmune celular que tiene el cerdo PM en comparación de los cerdos comerciales Yorkshire x Landrace (YL) antes y después del destete.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto de Biotecnología Animal en las instalaciones del Rancho Cofradía que se encuentra en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga ubicado por la carretera Guadalajara-Morelia a la altura del Km. 23 con latitud norte de 20° 28' longitud oeste 103° 27' y una altura sobre el nivel del mar 1,575 mts. La temperatura media anual oscila entre 20 y 22° C, la dirección de los vientos es muy variable y la precipitación pluvial media anual es de 900mm³, el clima se considera semi-seco y semi-húmedo de acuerdo a la clasificación Köppen de climas del mundo; y en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara que está ubicado en la carretera Guadalajara a Nogales Km. 15.5 Las Agujas, Nextipac. Zapopan, Jalisco, México.

Animales

Se utilizaron dos cerdas progenitoras de primer parto de la raza Pelón Mexicano (CPM) cruzadas con un semental de la misma raza procedente de una población animal ubicada en el municipio del Tamarindo en el Estado de Nayarit; y dos cerdas progenitoras de primer parto de la raza comercial F1 Yorkshire

x Landrace (CCO) apareadas con sementales de la misma raza procedentes del Rancho Cofradía de la Universidad de Guadalajara.

Se seleccionaron 16 lechones hijos de PM y 14 de YL para un total de 30 lechones muestreados. Se realizó la prueba inmunológica de linfoproliferación y cultivo celular (respuesta proliferativa) con adición de timidina tritiada, y la prueba de fagocitosis (obtención de macrófagos).

Muestras

Las muestras fueron tomadas con tubos al vacío extrayendo 6 mL de la vena cava externa de los cerdos en estudio, un día antes y un día después del destete que se realizó a los 28 días edad, siguiendo los mismos lineamientos del sistema de producción intensivo para la cría del cerdo. El sistema de alimentación para las hembras gestantes consistió en un concentrado a base de sorgo y soya proporcionándoles 2.5 kg. al día con un 13% de proteína, los lechones estuvieron alimentándose de sus madres durante un periodo de 28 días, después, en el periodo del destete se les proporcionó alimento pelletizado a libre acceso durante las siguientes tres semanas con un 21% de proteína, los lechones machos no fueron castrados y ningún cerdo fue vacunado.

Cultivo Celular (Respuesta proliferativa)

Se realizó el estudio de cultivo celular de linfoproliferación en sangre periférica para determinar la prueba de viabilidad de los linfocitos "T", con el conteo de células en la cámara de Neubauer. Se sembraron los linfocitos, se incubaron y se cultivaron, al término de este tiempo se pulsó con 0.5 Ci de [methyl-³H] Thymidine (Amersham, 37 Mbq/mL). Se cosechó en papel filtro, se cortaron en cuadros uniformes y se colocaron en viales de vidrio (frascos especiales de vidrio con tapón para el aparato de contador de centelleo) posteriormente se colocaron en el contador de centelleo de radiaciones β (Beckman, USA LS6000SE), con la finalidad de medir la síntesis de ADN lograda, marcando los cultivos con timidina tritiada [³H-Tdr], el cual es un precursor de los nucleósidos que se incorporan al ADN recién sintetizado.

Los resultados sobre linfoproliferación de la ³H-Tdr incorporada se expresaron en cuentas por minuto (cpm). La transformación blastoide es usada como medición estándar de la respuesta linfocitaria, se expresa basándose en cpm no estimuladas en los cultivos control dividida entre las cpm estimuladas, lo cual proporciona un cociente referido como Índice de Estimulación (IE) (Jakoby y Pastan, 1979; Morgan y Darling, 1995).

Fagocitosis (método de adherencia al vidrio de Cunninham)

Se realizó el estudio de fagocitosis en el laboratorio analizando los mismos cerdos que en el experimento de linfoproliferación, utilizando la metodología descrita por Cunningham (Morgan y Darling., 1993). Se contaron un máximo de 100 macrófagos en cada placa, contando el número de levaduras ingeridas dentro del fagostoma teñidas de azul intenso dentro de la célula. Las levaduras digeridas se observan vacías dentro del fagostoma, las cuales son llamadas fantasmas, también se cuantificaron los fagocitos que no fueron activos.

Se obtuvo el Índice de Fagocitosis (IF) que es el promedio de levaduras ingeridas entre el número de células cuantificadas: También se obtuvo el Índice de Digestión (ID) que es el

promedio de levaduras digeridas entre el número de fagocitos contados. Además el Porcentaje de Activos (PA) que se obtiene por medio de una regla de tres simple.

Análisis estadístico

El modelo estadístico utilizado para comparar la respuesta proliferativa de los cerdos y para comparar los porcentajes de fagocitos activos así como los diferentes índices de fagocitosis, fue el análisis de varianza (Anova) considerando un 95% de nivel de confianza, los resultados obtenidos para estas dos pruebas se graficaron conforme a la media y error estándar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Por medio del ensayo de linfoproliferación y bajo el estímulo mitogénico con diferentes concentraciones de FHG, se caracterizó el estado funcional de linfocitos T en sangre periférica de los cerdos evaluados. Los promedios de cuentas por minuto estimulados con las diferentes concentraciones de la FHG en los cerdos PM antes del destete solamente fueron significativas (P<0.05) cuando se compararon las concentraciones de 20 y 5 µg/mL (tabla 1). En los cerdos comerciales, YL, no se halló efecto significativo (P>0.05) de dosificación, aunque también la aplicación de 20 µg/mL de FHG fue mejor estimulante que las otras concentraciones más bajas.

Tabla 1. Respuesta proliferativa en cerditos con fitohemaglutinina (FHG) antes y después del destete

	Antes		Después	
	n	c/min ¹	n	c/min
PM				
FHG 05	4	947.90 ² ± 44.44	-	-
FHG 10	10	1 076.91 ± 109.10	-	-
FGH 20	7	1 418.17 ± 132.82	14	1 246.50 ± 65.80
YL				
FHG 05	3	959.06 ± 37.39	-	-
FHG 10	6	1 277.70 ± 149.85	-	-
FHG 20	9	1 321.02 ± 126.04	13	1 263.61 ± 89.08

¹ c/min expresa cuentas por minuto

² Media y error estándar

PHA05 vs PHA20, P<0.030 en cerdos PM

En la comparación hecha después del destete, también la concentración de 20 µg/mL de FHG, resultó ser la concentración de mitógeno que dió mejor resultado. Cuando se compararon las medias de las dos líneas no se encontraron diferencia significativa (P>0.05) entre dosis.

La dosis óptima de mitógeno en el ensayo de linfoproliferación para las distintas especies informadas por diferentes autores son muy diversas y varían entre 5 y 100 µg/mL (Morgan y Darling 1993). En el cerdo no se encontró ningún dato al respecto; los estudios mencionan que se debe realizar la

estandarización de este parámetro metodológico. En este experimento se utilizaron concentraciones de mitógeno igual a 5, 10 y 20 µg/mL para determinar la aplicación óptima en el cerdo, tomando en cuenta los informes que se tienen sobre la dosis óptima en el humano, que es de FHG 10 (Roitt 1996), ya que el cerdo es un mamífero al igual que el humano. Anteriormente, en una prueba piloto se descartó el uso de dosis de FHG equivalentes a 50 y 100 µg/mL por no tener buena respuesta. En este estudio se halló que la aplicación que dió mayor resultado fue la de 20 µg/mL en ambos grupos de cerdos aunque la diferencia significativa (P<0.05) sólo se encontró en el genotipo PM (ver tabla 1).

La concentración óptima de FHG encontrada para el cerdo no difirió mucho de los datos informados en los mamíferos (Roitt 1996), por lo que se puede suponer que la FHG actúa en los linfocitos porcinos de modo similar que en el ratón y en el humano, uniéndose a los receptores N-acetil-D-galactosamina presente en las células T.

En la comparación de los genotipos PM y YL con la aplicación de 20 µg/mL de FHG antes y después del destete, los valores antes del destete se inclinaron a favor del PM y a favor de los animales YL después del destete, aunque en el análisis de varianza no se encontraron diferencia significativa (P>0.05) en ambos casos. Así se pudiera establecer que ambos tipos de animales son similares, y esto posiblemente se deba a que proceden de un tronco común a escala evolutiva.

Se compararon también los índices de estimulación con la concentración de FHG (tabla 2).

Tabla 2. Índice de estimulación en cerditos estimulados con (fitohemaglutinina, 20 µg/mL)

	Antes		Después	
	n	c/min ¹	n	c/min
PM				
FHG 05	7	1.08 ² ± 0.10	14	1.17 ± 0.05
YL				
FHG 05	6	1.15 ± 0.11	13	1.09 ± 0.06

¹ c/min expresa cuentas por minuto

² Media y error estándar

PHA05 vs PHA20, P<0.030 en cerdos PM

La respuesta inmune celular específica (linfoproliferación en cpm) se encontró disminuida en el periodo del destete debido a que el cambio dentro de un área de confinamiento de producción animal puede traducirse en estrés (Selye, 1976). En los últimos 20 años se ha postulado que existe una correlación bidireccional entre el sistema nervioso central y el sistema inmune (Roitt 1996). El efecto inmunosupresor del estrés sobre la respuesta inmune se atribuye principalmente al aumento de la secreción de glucocorticoides por la estimulación del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (Álvarez 1992; Stratakis 1995). Además, Stratakis (1995) también ha mencionado la involución temporal del timo y hasta una disminución de masa de los órganos linfoides en el caso de estrés notable.

Los resultados del segundo parámetro inmunológico llamado fagocitosis fueron también ordenados conforme se desarrollaron y fueron los que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Índice de estimulación en cerditos estimulados con (fitohemaglutinina, 20 µg/mL)

	Antes		Después	
	n	c/min ¹	n	c/min
Fagocitos activos				
PM	24	73 ² ± 3.04	24	87 ± 3.62
YL	20	72 ± 3.60	13	79** ± 3.95
Índice de fagocitosis				
PM	14	2.45 ± 0.33	10	3.36 ± 0.48
YL	12	2.16 ± 0.38	8	3.51 ± 0.61
Índice de ingestión				
PM	14	1.36 ± 0.21	10	2.67 ± 0.47
YL	12	1.42 ± 0.31	8	2.49** ± 0.53
Índice de digestión				
PM	14	1.08 ± 0.17	10	0.68 ± 0.07
YL	12	0.80 ± 0.11	8	0.97 ± 0.23

² Media y error estándar

** P<0.01

La respuesta inmune celular inespecífica (fagocitosis) en el cerdo PM se incrementó después del destete en referencia al porcentaje de fagocitos activos e índice de ingestión siendo esta respuesta significativa en ambos casos de (P<0.01). Esto podría ser debido al contacto mayor con antígenos en el momento del cambio de alimentación, ya que los macrófagos desarrollan un mayor trabajo por antígenos ingeridos después del destete en las mucosas digestiva y pulmonar (Tizard 1998).

La actividad fagocítica en lechones del genotipo PM muestran una cierta tendencia a mayores índices de fagocitosis e índices de digestión que los YL, debido posiblemente a la resistencia a enfermedades que en forma natural tienen por su gran adaptación al medio ambiente y por su memoria inmunológica ya que tienen mayor contacto con diferentes antígenos (Lemus 1999).

Como se sabe, 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. Es así que éstos son un excelente modelo para diferenciar entre reacciones inmunes innatas y estímulos a los antígenos externos (Tlaskalova-Hogenova et al 1994). Datos recientes han destacado las similitudes entre la señal de reconocimiento al patógeno y los mecanismos efectores en la inmunidad innata, que se refiere a la organización de la primera línea de defensa que sirve para limitar la infección en etapas tempranas después de la exposición a microorganismos. De esta forma, en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y en mamíferos, se señala que existe un linaje común de estas defensas (Hoffmann et al 1999). Además de su papel en la fase

temprana de defensa, la inmunidad innata en mamíferos parece desempeñar un papel muy importante en la estimulación subsiguiente de la respuesta de inmunidad adaptativa (Hoffmann et al 1999).

Las diferentes funciones de la inmunidad innata son claramente identificables, es un componente esencial de defensa contra la infección y se encuentra en la escena cuando se requiere. La inmunidad innata puede controlar la infección hasta que la respuesta inmune adaptativa tome el control, diferencia entre lo propio y lo no propio perfectamente. Asimismo, la inmunidad innata es esencial para la inducción y dirección de la respuesta inmune adaptativa (Janeway 2000). El sistema inmune innato comprende los monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células natural killer, además de linfocitos intraepiteliales de la superficie mucosal, entre otros. Este sistema es un requisito previo para una eficaz inmunidad adaptativa (Fox y Harrison 2000). Al contacto con la mayoría de microorganismos, se activa el reconocimiento al patógeno producto de un juego de receptores. Estos receptores reconocen modelos moleculares compartidos por grupos grandes de microorganismos y no sólo descubren su presencia sino también determinan el tipo de patógeno que infecta. Tales receptores activan y controlan la expresión de genes en la respuesta inmune (Medzhitov y Janeway 2000)

En el cerdo, las células T se han identificado con exactitud utilizando dextrana para estimular la aglutinación (Binns 1982). Tal cosa se ha logrado en la sangre, timo, ganglios linfáticos y bazo. Al utilizar este método, se obtiene una pureza mayor del 90% de células linfocíticas de sangre de cerdo. Los datos existentes sobre la dosis óptima del mitógeno FHG en el experimento de linfoproliferación para las distintas especies reportadas por diferentes autores son muy diversas y varían entre 5 y 100 µg/mL, por lo que en cada estudio respectivo debe realizarse la estandarización de éste parámetro metodológico (Barrete 1990). Además, para la identificación de la respuesta a la linfoproliferación ésta se puede medir por el consumo celular de timidina tritiada expresándolas a través de cuentas por minuto (Binns 1982). Las células fagocíticas también pueden ser identificadas por la habilidad de ingerir levaduras tal como las levaduras de *Candida albicans* (Pescovitz et al 1984).

Con base a los diferentes resultados observados en el presente estudio, podemos concluir que la dosis óptima de estimulación de FHG para estos cerdos fue de 20 µg/mL. Los índices de estimulación fueron similares en ambos grupos de 20 µg/mL en el genotipo PM contra el YL, donde los promedios obtenidos fueron similares antes y después del destete, no encontrándose diferencias significativas ($P>0.05$), aunque tal vez existió cierta tendencia a dar un mejor respuesta proliferativa en el YL antes del destete y el PM después del destete (ver tabla 2).

Se considera que la respuesta inmune celular del cerdo Pelón Mexicano en nuestro medio tiende a ser mejor que la de un cerdo comercial, mejorado, como el Yorkshire x Landrace, debido quizá a su memoria inmunológica, rusticidad, a su mejor adaptación al medio y a que pueden ser reservorios de determinantes genéticos de resistencia natural a diferentes enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. J. Ly la revisión crítica del texto, así como su adaptación estilística.

REFERENCIAS

- Álvarez, M. y García, J. 1992. Desarrollo de la respuesta del sistema inmune. Ediciones Omega. México, Distrito Federal, 3:69
- Baldizón, S.O. 1971. Contribución a la determinación de algunos valores hemáticos normales del Cerdo Pelón Mexicano. Tesis MVZ. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal, pp
- Barrete, T.J. 1990. Inmunología Médica. Editorial Interamericana. McGraw.Hill (quinta edición). México, Distrito Federal, p 70
- Berruecos, J.M. 1972. Mejoramiento genético del cerdo. Primera edición. Editorial Arana, México Distrito Federal, p 23
- Binns, R.M. 1982. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 3 :95-146
- Cárdenas, P.C. 1966. Introducción al estudio zoométrico del cerdo Pelón veracruzano. Tesis MVZ. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal, pp
- Castellanos, R.A. y Gómez, A.R. 1984. Retrospectiva y perspectiva sobre la raza de cerdo Pelón Mexicano. Coordinación Regional de Investigaciones Pecuarias. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Mérida, pp
- Flores, J.A. 1970. Síntesis histórica y breve análisis de la especie porcina en la República Mexicana. El libro azul para el Médico Veterinario. Editado por Química Hoechst de México. México, Distrito Federal, pp
- Flores, M.J. 1992. Cría y explotación, enfermedades e industrializaciones. Ganado Porcino I. Editorial Limusa. México, Distrito Federal, pp
- Fox, A. y Harrison, L.C. 2000. Innate immunity and graft rejection. *Immunological Reviews*, 173:141-147
- Gallardo, R.A. 1941. Contribución al mejoramiento del Cerdo Criollo en México. Tesis MVZ. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Distrito Federal, pp
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway Jr. C.A. y Ezekowitz, R.A.B. 1999. Phylogenetic Perspectives in Innate immunity. *Science*, 284 :1313-1317
- Jakoby, W.B. y Pastan I.H. 1979. Cell Culture. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press. In Company. San Diego, p 466-477
- Janeway, Jr. C.A. 2000. The road less traveled by the role of Innate immunity in the adaptive immune response. *Immunological Reviews*, 173:539-544

Lemus, F.C. 1999. Estudio molecular de la diversidad genética del cerdo Pelón Mexicano (*Sus scrofa*). Tesis DrSci. Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, pp

Medzhitov, R. y Janeway, Jr. C. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173:89-97

Morgan, S.J. y Darling, D.C. 1993. Cultivo de células animales. Editorial Acribia. Zaragoza, p 41-45

Najera, O.H. 1989. Alternativas de investigación y su aplicación animal en las zonas marginales del trópico de Chiapas. In: *Las Profesiones en México*. Universidad Autónoma de México. México, Distrito Federal, 1(2):

Newby, T.J., Stokes, C.R. y Bourne, F.J. 1982. Immunological activities of milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 3:67-94

Pescovitz, M.D., Lunney, J.K. y Sachs, D. H. 1984. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *Journal of Immunology*, 133:368-375

Roiit, M.I. y Brostoff, J. 1996. *Immunology*. (cuarta edición). Academia Press. Londres, pp

Selye, H. 1976. *The Stress of Life*. McGraw-Hill Book Company. New York, pp

Stratakis, C.A. y Chrousos, G.P. 1995. *Neuroendocrinology and Pathophysiology of the Stress System*. Washington, p 2-15

Tello, R.A. y Cisneros, G.A.A. 1990. Evaluación del comportamiento alimenticio y reproductivo del CPM en estabulación. Tesis MVZ. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal, pp

Tizard, I.R. 1998. *Inmunología Veterinaria* (quinta edición). Editorial McGraw Hill Interamericana. México, Distrito Federal, 4:34-35

Tlaskalová, H., Hogenová, H., Mandel, L., Trevichavsky, I., Kováru, F., Barot, R. y Sterzl, J. 1994. Development of immune response in early pig ontogeny. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 43:135-142