



1978
2010

Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



Efecto de las Aflatoxinas Sobre el Perfil Inmunológico de los Cerdos y la Respuesta Protectora contra la Vacuna de la Fiebre Porcina Clásica

T E S I S
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P r e s e n t a n
Estrada Urbina María del Rosario
González Villeda José Luis

ASESOR: DR. ANTONIO MORILLA GONZALEZ



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

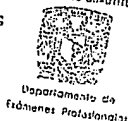
DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADEMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Efecto de las aflatoxinas sobre el perfil inmunológico
de los cerdos y la respuesta protectora contra la vacuna
de la Fiebre Porcina Clásica.

que presenta la pasante: Estrada Urbina María del Rosario
con número de cuenta: 7611910-3 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga; en colaboración con:
José Luis González Villeda

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de septiembre de 1994

PRESIDENTE Dr. Antonio Morilla González

VOCAL M.V.Z. Tonatiuh Cruz Sánchez

SECRETARIO Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez

PRIMER SUPLENTE M. en C. Andrés Romero Rojas

SEGUNDO SUPLENTE en C. Victor M. Zendejas Buitrón



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA ACADEMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Efecto de las aflatoxinas sobre el perfil inmunológico
de los cerdos y la respuesta protectora contra la vacuna
de la Fiebre Porcina Clásica.

que presenta el pasante: González Villeda José Luis
con número de cuenta: 7855437-9 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo ; en colaboración con :
Estrada Urbina María del Rosario

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de septiembre de 1904

PRESIDENTE Dr. Antonio Morilla González
VOCAL M. V. Z. Tonatiuh Cruz Sánchez
SECRETARIO Q. F. I. Leticia Zúñiga Ramírez
PRIMER SUPLENTE M. en C. Andrés Romero Rojas
SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Victor M. Zendejas Buitrón

[Firma de Antonio Morilla González]
[Firma de Leticia Zúñiga Ramírez]
[Firma de Víctor M. Zendejas Buitrón]

DEDICATORIA

DEDICO ESTE TRABAJO A LAS PERSONAS QUE MAS AMO:

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS PEQUENAS MITZI Y MAGDA

A JOSE LUIS MI ESPOSO

A MI ESCUELA, MIS MAESTROS,

MIS AMIGOS Y COMPANEROS

CON CARINO

MA. DEL ROSARIO ESTRADA URBINA

DEDICATORIA

A MIS PADRES ALFONSO Y LEONILA

A MIS HERMANOS YOLANDA, ALEJANDRO Y ADRIANA

A QUIENES AMO Y ADMIRO.

A MIS MAESTROS

AMIGOS Y COMPANEROS

JOSE LUIS GONZALEZ VILLEDA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Morilla González, por su apoyo constante como asesor de este trabajo.

Al Dr. René Rosiles Martínez, por su generosa asesoría para la obtención de aflatoxinas.

A los profesores: M en C. Angel Germán Martínez Sosa y M. en C. Victor M. Zendejas Buitrón, por su incondicional asesoría y amistad.

A los revisores de la tesis por su atención y acertadas observaciones.

Al personal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, por la ayuda durante la fase experimental del trabajo.

A todas las personas que en algún momento nos brindaron su ayuda.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA DE LA FMVZ - UNAM, Y EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA DEL INIFAP - SARH, BAJO LA DIRECCION DEL DR. ANTONIO MORILLA GONZALEZ Y LA ASESORIA DEL DR. RENE ROSILES MARTINEZ.

INDICE

	Página
Abreviaturas.....	4
Indice de tablas.....	5
Indice de figuras.....	8
Resumen.....	10
Introducción.....	12
1. Origen de las aflatoxina.....	14
2. Importancia de las aflatoxinas en la producción animal.....	17
3. Efecto de las aflatoxinas: biológico y sobre el sistema inmune	18
a. Aflatoxicosis aguda, subaguda y crónica.	18
b. Aflatoxinas y sistema inmune.....	20
4. Fiebre Porcina Clásica (FPC).	20
a. Alteraciones hematológicas e inmunológicas en la FPC.	22
b. Vacunación contra la FPC y fallas vacunales.	23
Hipótesis de trabajo.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares	25
Material y métodos	26
a. Producción de aflatoxinas.....	26
a.1. Extracción y cuantificación de aflatoxinas.	27
a.2. Preparación de placas para cromatografía en capa fina para la detección de micotoxinas.	27
a.3. Desarrollo de la cromatografía	28

b. Efecto de las aflatoxinas sobre el peso corporal, biometría hemática (fórmula blanca) y cuantificación de subpoblaciones linfocitos.	28
b.1 Separación de linfocitos de sangre periférica de cerdo y determinación de rosetas T y B	29
c. Inmunización y desafío con el virus de la FPC.	32
Diagrama de diseño experimental	33
Resultados.	34
a. Producción de aflatoxinas.	34
b. Efecto de las aflatoxinas sobre el peso corporal, biometría hemática (fórmula blanca) y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos	35
c. Inmunización y desafío con el virus de la FPC.	64
Discusión.....	65
Conclusiones.....	68
Referencias.....	69

ABREVIATURAS

AFB1	Aflatoxina B1
FPC	Fiebre Porcina Clásica
GRC	Glóbulos rojo de carnero
LBc	Linfocitos B con receptor para complemento
LBFc	Linfocitos B con receptor para la fracción Fc
LNull	Linfocitos Null
LTaa	Linfocitos T de alta afinidad
LTaut	Linfocitos T autólogos
LTT	Linfocitos T totales
PMNB	Polimorfonucleares segmentados
PMNS	Polimorfonucleares en banda
ppm	Partes por millón

INDICE DE TABLAS

	Descripción	Página
Tabla 1.	Pesos promedio en Kg de los grupos de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1	35
Tabla 2.	Concentración de leucocitos por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1.....	37
Tabla 3.	Valores relativos en porcentaje, de la concentración de linfocitos de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento	39
Tabla 4.	Valores relativos en porcentaje de la concentración de monocitos por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento	40
Tabla 5.	Valores relativos en porcentaje de la concentración de PMNS por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento.	41
Tabla 6.	Valores relativos en porcentaje de la concentración de PMNB por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	42

Tabla 7. Valores relativos en porcentaje de la concentración de eosinófilos por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	43
Tabla 8. Valores absolutos de la concentración de linfocitos por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	44
Tabla 9. Valores absolutos de la concentración de PMNS por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	46
Tabla 10. Valores absolutos de la concentración de PMNB por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	48
Tabla 11. Valores absolutos de la concentración de eosinófilos por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	50
Tabla 12. Valores absolutos de la concentración de LTT por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	52
Tabla 13. Valores absolutos de la concentración de LTa _a por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	54

Tabla 14. Valores absolutos de la concentración de LTaut por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	56
Tabla 15. Valores absolutos de la concentración de LBc por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	58
Tabla 16. Valores absolutos de la concentración de LBfc por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	60
Tabla 17. Valores absolutos de la concentración de LNull por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	62
Tabla 18. Resultados del desafío de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1, vacunados contra la FPC y desafiados 14 días más tarde.	64

INDICE DE FIGURAS

	Descripción	Página
Figura 1.	Concentración de leucocitos por mm ³ de los cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento	38
Figura 2.	Valores absolutos de la concentración de linfocitos por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	45
Figura 3.	Valores absolutos de la concentración de PMNS por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	47
Figura 4.	Valores absolutos de la concentración de PMNB por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	49
Figura 5.	Valores absolutos de la concentración de eosinófilos por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB ₁ en el alimento.	51
Figura 6.	Valores absolutos de la concentración de LTT por mm ³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y	

1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	53
Figura 7. Valores absolutos de la concentración de LTaa por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	55
Figura 8. Valores absolutos de la concentración de LTaut por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	57
Figura 9. Valores absolutos de la concentración de LBc por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	59
Figura 10. Valores absolutos de la concentración de LBfc por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	61
Figura 11. Valores absolutos de la concentración de LNull por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de AFB1 en el alimento.	63

RESUMEN

En las granjas porcinas ocasionalmente los animales se intoxican con aflatoxina B1 al consumir alimento contaminado. El efecto que se ha reportado ha sido el de baja de peso y probablemente falla vacunal. En esta tesis se evaluó el efecto de dos concentraciones de aflatoxina B1 0.6 y 1.0 ppm, dadas en el alimento por 31 días a dos lotes de 3 cerdos cada uno y 2 cerdos fueron dejados como control. Durante este tiempo se determinó la concentración de leucocitos totales, neutrofilos, eosinofilos, monocitos, linfocitos, basófilos y las subpoblaciones de linfocitos T por medio de la técnica de rosetas que fueron los linfocitos T totales, T alta afinidad, T autólogos, B con receptor para Fc, B con receptor para complemento y null.

Para determinar la funcionalidad del sistema inmune a los 21 días de intoxicación todos los cerdos fueron vacunados con una vacuna de virus vivo modificado de la Fiebre Porcina Clásica y a los 31 días fueron desafiados, incluyendo un grupo de 2 cerdos que no fueron vacunados. Los resultados obtenidos fueron los siguientes : el grupo que recibió 1.0 ppm de aflatoxina tuvo una ganancia de peso de 3.1 ± 1.7 Kg en comparación con el de 0.6 ppm de 8.2 ± 1.1 Kg y el control de 7.5 ± 1.5 Kg mostrando que la concentración de 1.0 ppm de aflatoxina produjo una marcada pérdida de peso. No se observaron alteraciones en la concentración ni en el porcentaje en ninguna de las células sanguíneas por lo que se concluyó que las aflatoxinas no

afectan su número. Ninguno de los cerdos después de la vacunación a estas dosis desarrollaron signos clínicos sugerentes de una reactivación de la cepa vacunal por inmunosupresión y al desafío todos los cerdos vacunados estuvieron protegidos, indicando que no hubo una falla vacunal.

Los resultados del efecto de las aflatoxinas sobre el sistema inmune del cerdo obtenidos en este experimento fueron semejantes a los reportados en otras especies, en los que no fue posible demostrar una clara relación entre la intoxicación e inmunosupresión, a pesar de la pérdida de peso en todas las especies animales.

INTRODUCCION

Los seres vivos habitamos un mundo potencialmente hostil, debido a la gran variedad de agentes infecciosos que nos pueden atacar y por esto se han desarrollado una serie de mecanismos de defensa, cuya eficiencia y complejidad depende del desarrollo evolutivo de los animales. Estos mecanismos de defensa en conjunto se les llama sistema inmune que en los vertebrados consiste en una serie de órganos y varios tipos diferentes de células, que actúan para evitar ser invadidos por los microorganismos patógenos ó agentes extraños. Los animales poseen la piel y las mucosas habitada por una flora normal que evita la colonización por microorganismos patógenos (6, 7, 26, 32, 61, 62). En la tabla 1 se presentan algunas barreras de defensa de la piel y las mucosas de los animales.

TABLA 1 Barreras inespecíficas de los animales

FISICAS	QUIMICAS	MICROBIOLOGICAS
-Movimiento ciliar de las células epiteliales en faringe	-Presencia de ácidos grasos insaturados	Cándida albicans
-Tos, estornudo	-pH estomacal	Escherichia coli
-Movimientos peristálticos de intestino	Espermina	Entamoeba coli
-Parpadeo, lagrimeo	-Lisozima en la mayoría de las secreciones	Lactobacillus spp
-Descamación de piel	-Secreción de glándulas sebáceas	otros
-Impermeabilidad bacteriana de la piel		

Cuando el agente extraño logra atravesar las barreras externas, entonces el organismo se activa para atacarlo y destruirlo. Esta defensa del organismo es llevada a cabo por dos

destruirlo. Esta defensa del organismo es llevada a cabo por dos mecanismos generales: uno es inespecífico constituido por la fagocitosis de sustancias y materiales extraños al organismo, así como la inflamación, efectuadas por los monocitos, macrófagos y polimorfonucleares, y otro específico en el que hay una reacción inmune celular y humoral, en la que intervienen los linfocitos T, B, macrófagos activados y anticuerpos que interactúan dentro de un complejo de señales dirigiendo y regulando la respuesta del organismo hacia el agente extraño o antígeno. La inmunidad específica es la base de la vacunación. (6, 7, 61, 62)

Es de fundamental importancia el óptimo funcionamiento de éstos mecanismos de defensa, ya que son los que impiden que los animales enfermen y mueran. Se han encontrado sustancias tóxicas que afectan a los animales y debilitan, siendo una de ellas las aflatoxinas producidas por hongos y que contaminan los alimentos. En este trabajo se determinó el efecto de las aflatoxinas sobre la ganancia de peso, las subpoblaciones de linfocitos y la respuesta inmune protectora de una vacuna contra la Fiebre Porcina Clásica en cerdos.

Los linfocitos y otras leucocitos expresan un gran número de moléculas en su superficie, algunos de los cuales aparecen en determinados estadios de la diferenciación celular durante breves períodos de tiempo, mientras que otros son característicos de distintas líneas celulares.

Uno de los métodos para diferenciar las células T y B se basa en la capacidad de unirse a eritrocitos de carnero y es empleado en el presente trabajo por ser un buen método para separar un gran

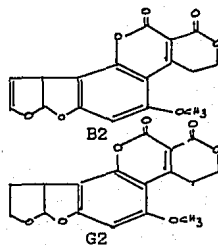
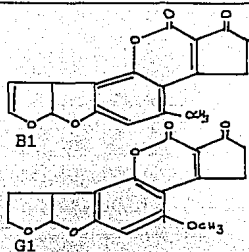
numero de linfocitos y las subpoblaciones especificas en corto tiempo. La cuantificación de linfocitos y subpoblaciones de ellos representa una serie de parámetros de interés diagnóstico para evaluar parcialmente la funcionalidad del sistema inmune.

1. Origen de las aflatoxinas.

Las aflatoxinas representan un grupo de metabolitos tóxicos secundarios producidos en mayor proporción por ciertas cepas de Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus, estas fueron descubiertas como contaminantes de los alimentos de consumo animal, aunque posteriormente se han encontrado en alimentos de consumo humano (50, 51, 64). Los factores que influyen en el desarrollo de los hongos, son: humedad, temperatura, aereación y tipo de sustrato, entre otros, de los cuales al parecer el más importante es la humedad. En este caso, al favorecer el crecimiento de hongos, se favorece la producción de toxinas, ya que se ha observado que frecuentemente, en el caso de granos, la contaminación proviene porque son almacenados en forma deficiente; por ejemplo cuando tienen un alto contenido de humedad, falta de aereación, o cuando hay un deficiente prensado vegetal en los ensilados; en estos casos, la temperatura que se llega a mantener en su interior puede ser entre 40 y 50oC de esta manera los hongos se reproducen en zonas conocidas como bandas de crecimiento o manchas calientes en las cuáles se libera la aflatoxina B1 (63, 64). Si en el almacenamiento de granos hay 13 a 15% de humedad se favorece el crecimiento de Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus y Aspergillus versicolor. En regiones

donde el clima es húmedo y las condiciones y facilidades de secado en el almacén son pobres, los problemas de aflatoxinas pueden ser elevados (13, 35, 64).

Las aflatoxinas son producidas por los hongos como mezclas complejas que pueden separarse por medio de extracción con solventes y técnicas cromatográficas; cuando se observan con luz ultravioleta presentan cuatro componentes fluorescentes; dos de ellos emiten luz visible azul, por lo que se les denomina B1 y B2 (Blue), y los otros dos emiten luz amarillo verdosa llamados G1 y G2 (Green). La cantidad y proporción de éstos cuatro componentes en los extractos varía de acuerdo a los factores tales como el tipo de hongo, composición del sustrato y condiciones de cultivo. La aflatoxina más abundante es la B1 en comparación con las demás. Las aflatoxinas B y G tienen una estrecha relación estructural entre sí ya que mantienen un sistema de anillo bisfurano unido a un núcleo cumarínico sustituido (9, 31, 40, 86).



Algunas de sus propiedades físicas se resumen en el siguiente cuadro:

Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso molecular	Punto de fusión °C
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268- 269*
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286- 289*
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244- 246*
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237- 240*

*Descomposición

Los métodos que se han empleado para la identificación y cuantificación de las aflatoxinas son diversos y dependen sobre todo del tipo de muestra a procesar, pero en general son extraídas, desengrasadas y decoloradas, del material contaminado aprovechando propiedades físicas y químicas de estas toxinas, tales como su solubilidad en solventes de baja polaridad y su fluorescencia. Los

extractos son separados por cromatografía en capa fina y los componentes visualizados por luz ultravioleta (4, 30, 50).

Se ha reportado que el máximo de emisión de fluorescencia para aflatoxinas B1 y B2 es de 425 um, y para G1 y G2 es 450 um, y el valor del Rf para cada una de ellas depende del sistema de solventes para revelar las placas cromatográficas. Estas toxinas pueden ser degradadas bajo algunas condiciones como exposiciones prolongadas a luz visible o calor (4, 30).

Cuando los animales consumen aflatoxinas, éstas se metabolizan y se forman la aflatoxina P presente en la orina, el aflatoxicol el cual es obtenido de extractos de hígado humano, y entre otras, las aflatoxinas M1 y M2 detectables en la leche, por lo que constituyen un posible peligro a la salud pública (40, 60).

2. Importancia de las aflatoxinas en la producción animal.

Los alimentos contaminados con aflatoxinas constituyen un importante problema para las explotaciones pecuarias debido al efecto tóxico que tienen sobre algunas especies animales.

Las aflatoxinas se encuentran en una amplia gama de productos de consumo tales como cereales (maíz, sorgo, trigo, avena, centeno y arroz), cacahuates, mantequilla de cacahuete, nuez de Brasil, pistaches, almendras, nueces, copra, semilla de algodón, avellana y polvo de chile indio entre otros, lo cual ilustra la amplia variación de ingredientes sujetos a contaminación (27, 40, 46, 63).

En los alimentos para aves, bovinos y cerdos, que contienen sorgo, pasta de soya, maíz, harina de cártamo, harina de pescado, harinolina y maíz ensilado, se ha reportado que se pueden encontrar

niveles de aflatoxina B₁ que fluctúan entre 0.025 y 2.0 ppm, en un 34%, 36%, y 19% en alimentos para aves, bovinos y cerdos respectivamente. Estos resultados indican que la contaminación de los alimentos por aflatoxinas es común y se encuentran concentraciones variables (27, 63,).

3. Efecto de las aflatoxinas: biológico y sobre el sistema inmune

El efecto tóxico de las aflatoxinas depende de la especie animal, dosis, tiempo de exposición, edad, sexo y estado nutricional. Los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos y los machos mucho más que las hembras (9, 19, 63, 70, 86). La lista de especies animales afectados, ha sido expandida incluyendo los domésticos, de campo y de laboratorio. Debe mencionarse además que no existe un tratamiento específico para contrarrestar la aflatoxicosis; la mejor medida es retirar inmediatamente el alimento contaminado, proveer de una dieta elevada de proteínas, lípidos, y evitar el estrés (70, 75)

a. Aflatoxicosis aguda, subaguda y crónica.

En cerdos la aflatoxicosis puede ser aguda, subaguda y crónica. Los efectos de la aflatoxicosis aguda puede ser la muerte del animal sin que se presenten signos clínicos apreciables; en algunos animales puede haber anorexia, depresión, ataxia, disnea y anemia acompañada de hepatitis y heces teñidas con sangre (20, 21, 39, 41, 53, 71, 85). En casos subagudos, los animales viven más tiempo y pueden presentar ictericia, hematomas, hipoprotobinemia y enteritis hemorrágica (50).

La aflatoxicosis crónica provoca en los cerdos disminución en la conversión alimenticia, bajan de peso, pelo hirsuto, anemia, distensión abdominal, ictericia ligera, depresión y anorexia; además cirrosis hepática, proliferación de los conductos biliares y fibrosis periportal la cual provoca desarrollo de hepatoma benigno o colangiocarcinoma. En algunas especies de animales se ha reportado poder carcinogénico de la aflatoxina B1 (15, 16, 19, 29, 47, 49, 58, 65, 85).

Es notorio que el principal efecto tóxico de las aflatoxinas sea sobre el hígado, pues es el primer sitio del metabolismo de estas toxinas ingeridas; en este órgano se han observado lesiones severas en células hepáticas, fundamentalmente necrosis y acumulación de lípidos, ocasionando cambios bioquímicos apreciables, a partir de los cuales se ha planteado un posible modo de acción de las aflatoxinas, enfocando la atención a la aflatoxina B1, ya que es la que presenta mayor poder patogénico.

Inicialmente la aflatoxina B1 interfiere con la transcripción del ADN, causando síntesis deficiente de ADN. Por medio de estudios en hígado de rata se encontró una rápida inhibición de la actividad de la ARN polimerasa repercutiendo en la síntesis de ARN nuclear. Existe poca duda sobre este mecanismo, ya que se reporta el aislamiento de aflatoxina B1 unida a 60 nucleótidos de ADN microsomal de hígado de rata (54).

Por otro lado, se ha reportado que la aflatoxina B1, requiere activación metabólica para ejercer su actividad biológica, ya que se han aislado posibles moléculas intermediarias, a partir de hepatocitos de rata, por ejemplo, óxido de AFB1-2,3 del que se ha

sugerido cierta actividad carcinogénica, además de ser un posible intermediario en la unión covalente de las aflatoxinas B1 y B2 al ADN ribosomal de rata (49, 51, 74).

Como efecto secundario, existe una disminución de las proteínas plasmáticas totales, por depresión en la síntesis de ARN mensajero (53, 55).

b. Aflatoxinas y sistema inmune.

Las aflatoxinas afectan al sistema inmune. En aves se ha reportado daño en la bolsa de Fabricio donde se observó reducción de tamaño de los folículos y destrucción de timocitos corticales. En cerdos, cobayos y pavos, las aflatoxinas provocan disminución de proteínas séricas excepto gamaglobulinas. En aves, como consecuencia del daño hepático los niveles del complemento disminuyen, afectando a su vez la actividad fagocítica (41, 45, 53, 54, 55, 88).

Por la alteración de órganos y células que participan en los mecanismos de inmunidad, a causa del efecto tóxico de las aflatoxinas se puede presentar mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Debido a que frecuentemente las aflatoxinas se encuentran como contaminantes del alimento para animales, se consideró importante en este caso, establecer la posible relación entre el consumo de alimento contaminado por aflatoxina B1, y la falla de la vacuna contra la fiebre porcina clásica, en estos animales (45).

4. Fiebre porcina clásica (FPC)

La FPC es una enfermedad altamente contagiosa, que ocasiona grandes pérdidas a la porcicultura nacional. La infección es causada por un virus del género Pestivirus, que corresponde a la familia de

los Togavirus; contiene una cadena de ARN envuelta en una nucleocápside icosaédrica; posee envoltura lipídica (23, 28, 33, 60).

La FPC tiene varias manifestaciones en los cerdos:

FPC aguda: Después de 2 a 6 días de la exposición al virus se presenta fiebre mayor de 41°C, diarrea, anorexia, incoordinación de movimientos, púrpura hemorrágica, estornudo, deficiencia respiratoria, y/o convulsiones relacionadas con daño al sistema nervioso central. En la forma aguda de la FPC, la mortalidad se puede presentar en un período breve de tiempo, y aunque algunos animales pueden sobrevivir después de 10 a 14 días de la exposición, la mortalidad puede llegar al 100% (23, 28, 34, 38, 76).

FPC crónica: En la cual se puede provocar un cuadro clínico con duración aproximada de 30 días; usualmente cursa lentamente con algunos de los signos clínicos mencionados presentando después aparente recuperación, recaída y muerte. El cuadro patológico se intensifica por infecciones bacterianas secundarias (26, 28, 34, 76).

FPC clínicamente inaparente. Se refiere al caso de cerdas gestantes infectadas con alguna cepa de baja virulencia, que no ocasiona manifestaciones clínicas aparentes pero, frecuentemente el feto se afecta, debido a que el virus de la FPC es capaz de atravesar la barrera placentaria, ocasionando infección congénita (28, 34, 76). Dependiendo de la edad fetal, su competencia inmunológica y de la patogenicidad del virus, la infección puede conducir a muerte fetal, malformaciones, tolerancia al virus, viremia persistente en la vida postnatal.

En el examen postmortem se han encontrado lesiones hemorrágicas predominantes, por daño en los vasos sanguíneos ocasionando úlceras y necrosis local en el tracto gastrointestinal, además de hiperplasia en los ganglios linfáticos (28).

a. Alteraciones hematológicas e inmunológicas en la FPC.

Los cambios hematológicos en la FPC, son principalmente leucopenia que puede llegar de 9000 a 3000 leucocitos/mm³, además de que prácticamente desaparecen los eosinófilos y basófilos de la sangre, probablemente debida a la migración de éstas células hacia tejidos. Puede ocurrir anemia con anisocitosis y poiquilocitosis, además de una considerable trombocitopenia, relacionada con alteraciones en el sistema de coagulación (34).

El virus de la FPC ejerce su efecto patogénico sobre diferentes tipos de células incluyendo células endoteliales, del sistema reticuloendotelial, macrófagos, ciertas células epiteliales y linfocitos. Estas son las células blanco para la replicación del virus, lo cual sugiere que con la infección hay alteraciones a nivel de funcionamiento del sistema inmune (1, 14, 22). Ejemplos de estos daños son la depleción del tejido linfático por la destrucción de linfocitos ya sea por la infección viral o por la liberación de glucocorticoides desde la corteza adrenal hiperplásica (60, 61), ocasionando linfocitopenia. Van Oirschot y colaboradores encontraron que los linfocitos B de sangre periférica y bazo no responden a suero de cabra anti Ig, ni a proteína A, mitógenos específicos de células B, hecho que posiblemente se explique a causa de un defecto en los receptores de membrana de linfocitos, a causa de la viremia alterando los patrones de migración, ya que se encontró una acumulación de

linfocitos B en tejido linfoide. Por otro lado también los macrófagos alveolares son invadidos siendo disminuida su capacidad bactericida, mientras que en la prueba de transformación blastoide, utilizando fitohemaglutinina, se encontró una respuesta disminuida (46, 48, 56, 82, 83).

Se ha encontrado que los cerdos infectados con el virus de la FPC pueden responder inmunológicamente de manera muy variable, dependiendo de diversos factores como son la cepa viral, dosis y vía de infección, así como de la edad y condición de cada cerdo, aunque la inmunogenicidad parece relacionarse más con el grado de virulencia de la cepa involucrada (28). Las alteraciones inmunológicas más impresionantes se han observado después de infecciones con virus de FPC de baja virulencia en lechones infectados en periodos prenatal y neonatal (76, 77, 78, 79, 80, 81).

También los animales persistentemente infectados parecen ser más susceptibles a infecciones secundarias respiratorias bacterianas, lo cuál no sorprende considerando la linfocitopenia, baja síntesis de inmunoglobulinas u otros efectos inmunosupresivos (46).

b. Vacunación contra la FPC y fallas vacunales.

Para el control de la enfermedad se vacuna a los cerdos. Los resultados han sido buenos, ya que la incidencia ha ido disminuyendo a través de los años. Un gran número de vacunas han sido empleadas en el control de la enfermedad, pero en la actualidad se emplean las elaboradas a partir de virus vivo modificado por medio de cultivos celulares, éstas vacunas son inocuas para los animales y proporcionan sólida inmunidad (5, 32). Sin embargo, en condiciones

de campo, se ha reportado que en ocasiones las vacunas no proporcionan la protección adecuada.

En un reporte se encontró que sin importar la cepa o marca de la vacuna hubo un 23% de probabilidades de que los animales después de la inmunización no quedaran protegidos óptimamente (42, 43). Se ha sugerido que una posible causa de la falla vacunal pueda ser debido a que los animales no respondan a la vacuna por encontrarse inmunosuprimidos debido a la ingestión de aflatoxinas en el alimento (42, 44). Cysewsky y colaboradores (18) reportaron que en cerdos, que recibieron aflatoxina B1 y luego fueron inmunizados con una bacteria contra erisipela, al desafío con la bacteria patógena los animales enfermaron indicando que hubo falla vacunal.

Es por este motivo que es necesario determinar si la aflatoxina B1 es capaz de inmunosuprimir a los cerdos, y si los animales cuando son vacunados contra la fiebre porcina clásica, son capaces de montar una respuesta inmune protectora.

HIPOTESIS DE TRABAJO

¿El consumo de alimento contaminado con aflatoxina B1 es capaz de alterar la respuesta inmune de los cerdos?

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de dos concentraciones de aflatoxina B1 sobre la ganancia de peso, las subpoblaciones de linfocitos y la respuesta inmune protectora de una vacuna contra la Fiebre Porcina Clásica en cerdos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Producción, identificación y cuantificación de aflatoxina B1.
2. Determinar el efecto del consumo de alimento contaminado con aflatoxina sobre la variación de peso de los animales.
3. Determinar el efecto del consumo de alimento contaminado con aflatoxina sobre los leucocitos y subpoblaciones de linfocitos por medio de la técnica de formación de rosetas
4. Evaluar la respuesta inmune protectora de una vacuna contra la F.P.C.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo experimental se dividió en tres partes. En la primera se obtuvieron las aflatoxinas, en la segunda, se determinó cómo afectó la aflatoxina B1 las subpoblaciones de linfocitos de los cerdos y en la tercera se trató de determinar si los cerdos intoxicados se inmunizaban cuando se les aplicó una vacuna contra la Fiebre Porcina Clásica y posteriormente fueron desafiados con virus patógeno.

a. Producción de aflatoxinas

A partir de una cepa de Aspergillus flavus se indujo la producción de aflatoxinas usando como sustrato 1500 gramos de arroz, distribuidos en 15 matraces Erlenmeyer, los cuales contenían 100 gramos de dicho sustrato y 50 ml de agua. Los matraces se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se esterilizaron a 15 lbs de presión durante 20 minutos. Posteriormente, cada uno de ellos fue inoculado con una cepa de A. flavus productora de aflatoxinas (previamente identificada) amablemente suministrada por el doctor René Rosiles, jefe del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se incubó por 8 semanas en la oscuridad a temperatura ambiente, con agitación manual constante y cuidadosa, obteniéndose un máximo de crecimiento en éste tiempo. El hongo se inactivo por medio de la esterilización a 15 libras de presión durante 15 minutos, posteriormente se secó en estufa a una temperatura de 54 a 56°C durante dos días y se obtuvo la base seca que se molió y se reunió en un sólo lote.

a.1. Extracción y cuantificación de aflatoxinas. Se siguió la técnica descrita por Stoloff (73). De la base seca y molida de arroz contaminado se tomaron muestras de 25 grs a las que se les adicionó 90 ml de acetonitrilo y 10 ml de cloruro de potasio al 4% y se licuaron durante 3 minutos. El licuado se vertió a un embudo de separación por medio de papel filtro de poro grueso. Se extrajo con 50 ml de éter de petróleo 2 veces desechando el éter sucio. La fase acuosa se decoloró con gel ($FeCl_3$ al 10% a pH 4.60), mezclado usando un agitador magnético. La mezcla se filtró directo al embudo de separación se extrajo dos veces con 50 ml de cloroformo, el volumen total se deshidrató con sulfato de sodio anhidro. El cloroformo decantado a otro matraz se evaporó usando un rotavapor.

La muestra desecada se resuspendió en 500 ul de benceno-acetonitrilo 98:2. Para la detección de las aflatoxinas, en una placa de cromatografía en capa fina, se colocaron muestras de 5 y 10 ul de estándares de aflatoxinas, a 2 cm de distancia y de la muestra se colocaron alicuotas de 10, 30 y 50 ul.

a.2. Preparación de placas para cromatografía en capa fina para la detección de micotoxinas. En un mortero se colocaron 30 gramos de sílica gel 60H para cromatografía en capa fina (Labs. Merck) y 70 ml de agua destilada y desionizada y se mezclaron hasta eliminar los grumos. La mezcla se colocó en la cámara del corredor de placas, previamente ajustado a 0.25 mm de grosor. Se colocaron 6 placas de vidrio de 20 X 20 cm y 0.5 cm de grosor, previamente lavadas, secadas y desengrasadas con alcohol etílico absoluto. Al abrir la cámara, se corrió instantáneamente la sílica gel y en la

base de plástico con una secadora de pelo se secaron las placas y posteriormente se activaron en estufa a 100°C (4, 30, 73).

a.3. Desarrollo de la cromatografía . Las cámaras cromatográficas se saturaron previamente con el sistema de solventes durante una hora; se utilizó la mezcla de Xileno /alcohol isoamílico/ amilacetato en proporción 9/ 1/ 1. Posteriormente se introdujeron las placas cromatográficas conteniendo las muestras, protegiéndolas de la exposición excesiva a la luz. Se detuvo el corrimiento cuando la fase móvil llegó a 2 cm del final de la placa, se secaron las placas y se observaron bajo luz ultravioleta (onda larga) comparando tanto el Rf como la magnitud de las manchas de la muestra problema con los estándares internacionales. En caso de duda se procedió a atomizar la placa con ácido sulfúrico y se observó el cambio de fluorescencia a amarillo. De ésta manera se estableció la concentración de aflatoxina B contenida en la base seca producida (4, 30, 73) .

Se adquirió alimento para cerdos marca comercial, libre de aflatoxinas (previamente analizado en el departamento de Toxicología de la F.M.V.Z., U.N.A.M.). El alimento adquirido se mezcló con base seca suministrando dos diferentes concentraciones de aflatoxina B1: 0.6 y 1.0 ppm.

b. Efecto de las aflatoxinas sobre el peso corporal, biometría hemática (fórmula blanca) y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos

Animales: se utilizaron 8 cerdos convencionales de aproximadamente 10 Kg de peso recién destetados, de ambos sexos, distribuidos aleatoriamente en tres grupos , de tres cada uno : control, 0.6 y 1.0 ppm de contenido de aflatoxina en su dieta.

Parámetros:

1. Los animales se pesaron al inicio y al final para determinar la ganancia de peso.
2. El perfil inmunológico se realizó 2 veces por semana (lunes y jueves) durante la fase experimental de 31 días, que consistió en: cuenta total de leucocitos, cuenta diferencial, cuenta de linfocitos T totales (TT), linfocitos T autólogos (Taut), linfocitos T alta afinidad (Taa), linfocitos B con receptor fc (Bfc) y linfocitos B con receptor para el complemento (BC), por medio de la técnica de formación de roseta con glóbulos rojos (69).

b.1 Separación de linfocitos de sangre periférica de cerdo y determinación de rosetas T y B: De cada cerdo se obtuvieron 10 ml de sangre por punción yugular, la que se vertió a un matraz Erlenmeyer conteniendo perlas de vidrio suficientes para desfibrinar y luego verterla a tubos de ensayo sobre un gradiente de Ficoll- Hypaque ($d = 1.077$, preparado con 10 partes de Hypaque al 34% y 24 partes de Ficoll al 9%), en proporción de 2 partes de sangre a una de Ficoll-Hypaque, para centrifugar a 1600 rpm durante 45 minutos. Por medio de una pipeta Pasteur se retiró la interfase de mononucleares, la que se lavó dos veces con 5 ml de solución de Hanks, se centrifugó a 1600 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para eliminar los glóbulos rojos contaminantes se adicionó 2 ml de agua destilada en agitación con vórtex durante 15 segundos y se adicionó inmediatamente 6 ml de Hanks enriquecido con suero fetal bovino, se centrifugó durante 10 minutos a 1600 rpm. El botón de linfocitos se reconstituyó en 1 ml de Hanks enriquecido con 2% de suero fetal bovino; dos gotas de esta suspensión se mezclaron con dos gotas de azul de tripán para contar

las células vivas en cámara de Neubauer y determinar la viabilidad, que deberá ser mayor del 95%. Finalmente se ajustó la concentración de linfocitos a $4-5 \times 10^6$ células /ml.

Preparación de eritrocitos de carnero. Se obtuvieron 5 ml de sangre de carnero en 5 ml de solución de Alsever. Se lavaron los eritrocitos con solución PBS pH 7.2, durante 10 minutos a 1600 rpm, y del paquete se prepararon dos suspensiones de eritrocitos, una al 2% y otra al 5% con solución de Hanks.

Determinación de rosetas T totales (Tt) y T de alta afinidad (Taa). Se tomaron 0.2 ml de suspensión de eritrocitos de carnero al 2% adicionando 0.2 ml de la suspensión de linfocitos ($4-5 \times 10^6$), incubando 30 minutos a 37°C, inmediatamente después se centrifugó a 1000 rpm. Cuidadosamente se resuspendió la mezcla para llenar la cámara de Neubauer, contando 200 células, se anotó el porcentaje de rosetas, considerando éstas, todos aquellos linfocitos que enlacen 3 ó más glóbulos rojos de carnero (GRC). Estas determinan los linfocitos T aa.

La suspensión remanente se incubó durante toda la noche a 40°C y se añadió al tubo una gota de azul de Tripán (0.3%) y se resuspendieron suavemente las células sedimentadas. Con una pipeta Pasteur se tomó una alícuota de la mezcla para contar en cámara de Neubauer 200 linfocitos ; se anotó el porcentaje de rosetas que correspondió a linfocitos Tt.

Determinación de linfocitos (T aut). Se mezclaron 0.2 ml de linfocitos $4-5 \times 10^6$, con 0.2 ml de GRC de cerdo al 2%. Se incubó durante 18 horas a 40°C y se siguieron los mismos pasos que con los linfocitos Tt.

Sensibilización de eritrocitos de carnero. Se mezclaron 5 ml de GRC al 5% con 5 ml de hemolisina (1:1.024) y se incubaron 30 minutos a 40C, la mezcla se lavó dos veces con Hanks y se centrifugó durante 10 minutos a 1600 rpm; el botón se resuspendió en 5 ml de Hanks. Estos eritrocitos quedaron cubiertos con anticuerpos y listos para las rosetas BFc.

Posteriormente se tomaron 2.5 ml de los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos y se mezclaron con 2.5 ml de complemento de cobayo (1:8 en solución salina fisiológica). La mezcla se incubó durante 20 minutos a 37oC, se lavó dos veces con Hanks a 1600 rpm durante 10 minutos cada vez, después de esto los eritrocitos quedaron cubiertos con complemento.

Determinación de rosetas B.

Determinación de linfocitos B con receptores para Fc (BFc).

Se mezclaron 0.2 ml de la suspensión de linfocitos con 0.2 ml de GRC sensibilizados para Fc y se incubaron durante 30 minutos a 37oC. Para cuantificar las rosetas se siguió el método descrito para Taa.

Determinación de linfocitos B con receptores para complemento (Bc). Se mezclaron 0.2 ml de la suspensión de linfocitos, con 0.2 ml de GRC sensibilizados con complemento, se incubaron durante 30 minutos a 37oC y para cuantificar las rosetas se siguió el método para Taa.

c. Inmunización y desafío con el virus de la fiebre porcina clásica, FPC.

El día 21 del experimento los cerdos de los tres grupos, control, 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxinas se inmunizaron con una vacuna comercial (cepa PAV-1) contra la FPC y el día 31 se desafiaron con 2 ml de la cepa patógena Lederle, (título 1×10^6 dl/ml) (37).

A cada animal se le determinaron los signos clínicos y en caso de muerte se hizo la necropsia para hacer el diagnóstico de FPC.

DIAGRAMA DE DISEÑO EXPERIMENTAL

Producción de aflatoxinas

Contaminación de alimento para cerdo
en dos concentraciones para
8 cerdos divididos en tres grupos:

2 cerdos control (dieta sin AFB1)
3 cerdos 0.6 ppm AFB1
3 cerdos 1.0 ppm AFB1

Día 0 registro de peso
de cada cerdo

Día 1

Determinación del
perfil inmunológico:
cuenta total de
leucocitos
cuenta diferencial,
cuenta de LTt,
LT aut, LTaa, LBfc,
Lbc, LNull

Día 19: registro de peso de cada cerdo

Día 21 Vacunación contra FPC

Día 31 Desafío cepa patógena FPC

RESULTADOS

a. Producción de aflatoxinas

Después de cultivado el hongo A. flavus se observó abundante crecimiento sobre el arroz húmedo utilizado como sustrato, una vez inactivado se procedió a verificar la existencia de aflatoxinas por medio de cromatografía en capa fina, en donde se obtuvieron valores idénticos de Rf, para B1 y B2, con respecto a estándares internacionales aplicados como referencia (B1, B2, G1, G2), es importante hacer notar que la cantidad de aflatoxina B1 se obtuvo en mayor proporción a la de B2 y no se observó la presencia de aflatoxinas G1 y G2. Considerando tanto el Rf registrado como las dimensiones de las diferentes diluciones empleadas en las muestras corridas cromatográficamente, se determinó la concentración de aflatoxinas presentes en todo el lote de sustrato contaminado. Ya que se ha reportado que la toxicidad de las aflatoxinas es mayor para la aflatoxina B1 (50, 63, 74) y considerando que fue la más abundante en nuestro trabajo, se decidió despreciar la presencia de la aflatoxina B2, tomando en cuenta sólo el efecto tóxico de la aflatoxina B1.

Una vez obtenida la aflatoxina B1 se contaminó el alimento comercial para cerdos en dos diferentes concentraciones: 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 para su empleo en el transcurso del experimento. Cada lote de alimento contaminado se analizó para verificar la correcta concentración de aflatoxina al inició, durante y al final del experimento.

b. Efecto de las aflatoxinas sobre el peso corporal, biometría hemática (fórmula blanca) y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos

1) En la tabla 1 se muestran los pesos registrados, al inicio durante y al final del experimento.

Tabla 1. Pesos promedio en Kg de los grupos de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

Grupo	Días			Ganancia de peso
	0	19	31	
Control	8.1 ± 1.8	10.9 ± 2.5	15.6 ± 3.3	7.5 ± 1.5
Aflatoxinas				
0.6 ppm	11.3 ± 2.0	15.5 ± 2.0	19.5 ± 2.9	8.2 ± 1.1
1.0 ppm	9.4 ± 1.1	12.3 ± 1.1	12.5 ± 2.3	3.1 ± 1.7*

* Por medio de la prueba t Student ($p < 0.05$), se observó que la concentración de 0.6 ppm de aflatoxinas B1 no afectó la ganancia de peso de los animales de este grupo comparada con el efecto observado en los animales del grupo de 1.0 ppm.

Los valores de la concentración de leucocitos se presentan en el cuadro 2, los valores relativos en porcentaje de las poblaciones de leucocitos son presentados en los cuadros 3, 4, 5, 6 y 7, y en los cuadros 8, 9, 10 y 11 se presentan los valores absolutos expresados en células por mm^3 de éstas poblaciones. En los cuadros 12, 13, 14,

15, 16 y 17 se presentan las subpoblaciones de linfocitos expresados en valores absolutos.

Con el objeto de determinar si existen diferencias entre las concentraciones de leucocitos y subpoblaciones de linfocitos los valores absolutos fueron transformados a delta concentración en los que el valor del día 1 corresponde al 100% y de ahí se pudo determinar si hubo un incremento o decremento de la concentración con relación al valor basal. Los datos analizados representan el promedio de grupo en cada caso y se muestran por medio de las figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Los resultados del desafío de los cerdos vacunados se muestran en el cuadro número 18.

Tabla 2. Concentración de leucocitos por mm³ de los cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

	Días (a)									
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I control										
(b)										
54	19200	14700	13500	17600	23000	15900	15500	22200	21200	22000
60	18900	19200	19000	21100	14400	19100	16800	19300	21000	20800
MEDIA	19050	16950	16250	19350	18700	17500	16150	20750	21100	21400
Grupo II Aflatoxina 0.6 ppm										
55	21600	27000	18500	27100	29400	21300	19500	30400	21900	21400
56	20600	18500	21200	24300	22300	13900	17800	24700	32100	23900
57	22100	15500	17200	17400	17100	21800	21500	21000	21800	21000
MEDIA	21433	20333	18967	22933	22933	19000	19600	25367	25267	22100
Grupo III Aflatoxina 1.0 ppm										
50	21900	17600	16500	18900	21400	17000	21200	38000	26400	42500
58	16300	11800	15500	16500	22700	17200	19100	16600	26200	29300
59	20100	22500	31200	18600	18800	21200	19000	21500	21900	23200
MEDIA	19433	17300	21067	18000	20967	18467	19767	25367	24833	31667

(a) La aflatoxina se administró a partir del día 1

(b) Número de animal.

(c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

(d) Día del desafío.

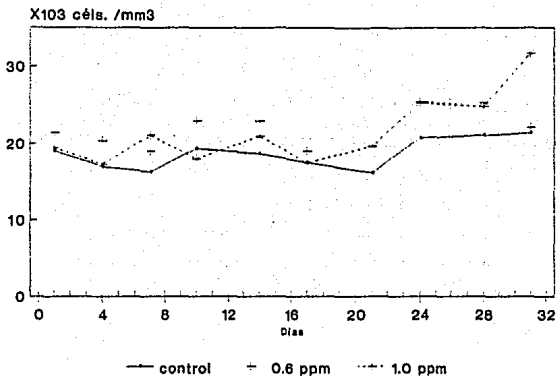


Figura 1. Concentración de leucocitos por mm³ de los cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento
 Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.
 Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.
 Día 31 desafío.

Tabla 3. Valores relativos en porcentaje, de la concentración de linfocitos de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

		Días (a)										
		1	4	7	10	14	17	(c)		(d)		
								21	24	28	31	
Grupo I control		(b)										
		54	64	78	63	76	65	66	60	58	63	60
		60	31	47	66	65	70	63	39	47	61	43
	MEDIA	48	63	65	71	68	65	50	53	62	52	
Grupo II 0.6 ppm												
		55	67	58	82	72	66	64	65	53	61	68
		56	76	78	77	73	77	70	52	69	66	53
		57	72	54	59	59	65	58	62	47	70	51
	MEDIA	72	63	73	68	69	64	60	56	66	57	
Grupo III 1.0 ppm												
		50	75	67	75	75	73	69	33	37	55	34
		58	60	75	68	71	62	60	74	52	52	45
		59	71	74	79	71	69	73	74	39	59	47
	MEDIA	69	72	74	72	68	67	60	43	55	42	

(a) La aflatoxina se administró a partir del día 1

(b) Número de animal.

(c) Día de vacunación contra Fiebre Porcina Clásica

(d) Día del desafío

Tabla 4. Valores relativos en porcentaje de la concentración de monocitos por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

		Días (a)									
		1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I	control										
	(b)										
	54	4	3	5	4	4	3	4	7	3	0
	60	6	8	3	1	6	5	3	2	1	4
	MEDIA	5	6	4	3	5	4	4	5	2	2
Grupo II	0.6 ppm										
	55	5	3	2	1	1	4	6	7	2	1
	56	1	3	1	4	3	0	6	8	3	0
	57	4	5	6	8	3	5	2	5	3	3
	MEDIA	3	4	3	4	2	3	5	7	3	1
Grupo III	1.0 ppm										
	50	3	3	1	2	8	3	4	8	2	4
	58	5	5	3	1	5	2	3	3	6	5
	59	5	3	2	5	6	2	4	5	4	3
	MEDIA	4	4	2	3	6	2	4	5	4	4

(a) La aflatoxina se administró a partir del día 1

(b) Número de animal.

(c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

(d) Día del desafío

Tabla 5. Valores relativos en porcentaje de la concentración de Polimorfonucleares segmentados (PMNS) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento.

		Días(a)									
		(c)									(d)
		1	4	7	10	14	17	21	24	28	31
Grupo I control											
	(b)										
	54	28	17	32	16	25	27	33	33	30	36
	60	59	44	30	31	23	32	55	49	38	53
	MEDIA	44	31	31	24	24	30	44	41	34	45
Grupo II 0.6 ppm											
	55	27	36	14	25	32	31	27	37	34	29
	56	19	16	19	21	17	30	37	23	28	40
	57	24	37	33	31	31	34	33	45	26	46
	MEDIA	23	30	22	26	27	32	32	35	29	38
Grupo III 1.0 ppm											
	50	21	28	22	21	17	27	61	55	39	61
	58	35	20	29	22	30	37	22	42	42	49
	59	20	20	16	20	20	23	19	54	36	50
	MEDIA	25	23	22	21	22	29	34	50	39	53

(a) La aflatoxina se administró a partir del día 1

(b) Número de animal.

(c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

(d) Día del desafío.

Tabla 6. Valores relativos en porcentaje de la concentración de Polimorfonucleares en banda (PMNB) por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento.

		Días (a)									
		1	4	7	10	14	(c)		24	28	(d)
							17	21		31	
Grupo I control											
	(b)										
	54	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
	60	3	1	0	1	0	0	3	2	0	0
	MEDIA	2	1	0	1	0	1	2	1	1	0
Grupo II 0.6 ppm											
	55	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0
	56	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	57	0	2	1	2	0	3	1	0	0	0
	MEDIA	1	2	0	1	0	1	1	0	0	0
Grupo III 1.0 ppm											
	50	1	1	0	0	0	1	2	0	0	0
	58	0	0	0	2	1	0	0	3	0	0
	59	2	0	0	2	2	0	0	2	1	0
	MEDIA	1	0	0	1	1	0	1	2	0	0

(a) La aflatoxina se administró a partir del día 1

(b) Número de animal.

(c) Día de la vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

(d) Día del desafío.

Tabla 7. Valores relativos en porcentaje de la concentración de eosinófilos por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

		Días (a)									
		1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I control		(b)									
	54	4	2	0	4	6	3	2	2	3	4
	60	1	0	1	2	1	0	0	0	0	0
	MEDIA	3	1	1	3	4	2	1	1	2	2
Grupo II 0.6 ppm											
	55	0	1	2	1	1	1	2	3	3	2
	56	2	2	3	2	3	0	4	0	2	7
	57	0	2	1	0	1	0	2	0	1	0
	MEDIA	1	2	2	1	2	0	3	1	2	3
Grupo III 1.0 ppm											
	50	0	1	1	2	2	0	0	0	3	1
	58	0	0	0	4	2	1	1	0	0	1
	59	2	3	3	2	3	2	3	0	0	0
	MEDIA	1	1	1	3	2	1	1	0	1	1

- (a) La aflatoxina se administró a partir del día 1
- (b) Número de animal.
- (c) Día de vacunación contra Fiebre Porcina Clásica
- (d) Día del desafío.

Tabla 8. Valores absolutos de la concentración de linfocitos por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

		Días (a)									
		1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control											
(b)											
54	2288	11466	8505	13376	14950	10494	9300	12876	13356	13200	
60	5859	9024	12540	13715	10080	12033	6552	9071	12810	8944	
MEDIA	9074	10245	10523	13546	12515	11264	7926	10974	13083	11072	
Grupo II 0.6 ppm											
55	14472	15660	15170	19512	19404	13632	12675	16112	13359	14552	
56	15656	14430	16324	17739	17171	9730	9256	17043	21186	12667	
57	15912	8370	10148	10266	11115	12644	13330	9870	15260	10710	
MEDIA	15347	12820	13881	15839	15897	12002	11754	14342	16602	12643	
Grupo III 1.0 ppm											
50	16425	11792	12375	14175	15622	11730	6996	14060	14520	14450	
58	9780	8850	10540	11715	14074	10320	14134	8632	13624	13185	
59	14271	16650	24648	13206	12972	15476	14060	8385	12921	10904	
MEDIA	13492	12431	15854	13032	14223	12509	11730	10359	13688	12846	

- (a) La aflatoxina se administró a partir del día 1
- (b) Número de animal.
- (c) Día de vacunación contra Fiebre Porcina Clásica
- (d) Día del desafío.

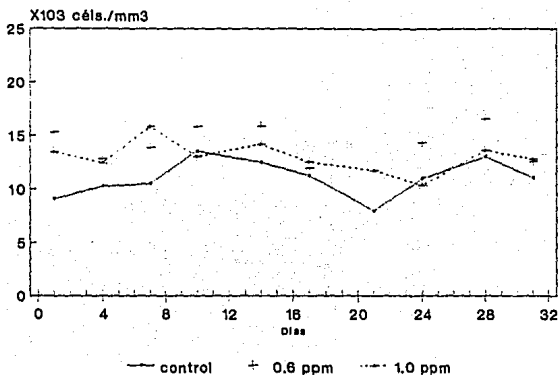


Figura 2. Valores absolutos de la concentración de linfocitos por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B₁ en el alimento

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 9. Valores absolutos de la concentración de polimorfonucleares segmentados PMNS por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento.

Días(a)										
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control										
(b)										
54	5376	2499	4320	2816	5750	4293	5115	7326	6360	7920
60	11151	8448	5700	6541	3312	6112	9240	9457	7980	11024
MEDIA	8264	5474	5010	4679	4531	5203	7178	8392	7170	9472
Grupo II 0.6 ppm										
55	5832	9720	2590	6775	9408	6603	5265	11248	7446	6206
56	3914	2960	4028	5103	3791	4170	6586	5681	8988	9560
57	5304	5735	5676	5394	5301	7412	7095	9450	5668	9660
MEDIA	5017	6138	4098	5757	6167	6062	6315	8793	7367	8475
Grupo III 1.0 ppm										
50	4599	4928	3630	3969	3638	4590	12932	20900	10296	25925
58	5705	2360	4495	3630	6810	6364	4202	6972	11004	14357
59	4020	4500	4992	3720	3760	4876	3610	11610	7884	11600
MEDIA	4775	3929	4372	3773	4736	5277	6915	13161	9728	17294

(a) La aflatoxina se administró a partir del día 1

(b) Número de animal.

(c) Día de vacunación contra Fiebre Porcina Clásica

(d) Día del desafío.

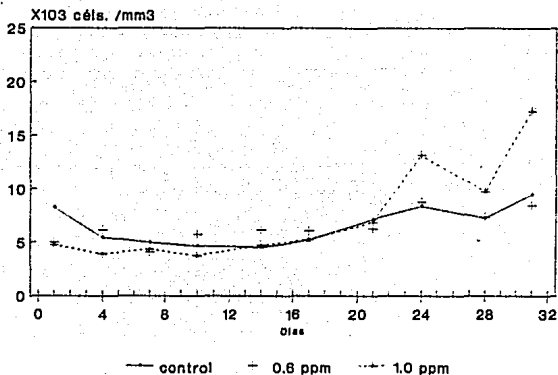


Figura 3. Valores absolutos de la concentración de polimorfonucleares segmentados PMNS por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento.

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 10. Valores absolutos de la concentración de polimorfonucleares en banda PMNB por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B₁ en el alimento.

	Días(a)									
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control										
(b)										
54	0	0	0	0	0	159	155	0	212	0
60	567	192	0	211	0	0	504	386	0	0
MEDIA	284	96	0	106	0	80	330	193	106	0
Grupo II 0.6 ppm										
55	216	540	0	271	0	0	0	0	0	0
56	412	185	0	0	0	0	178	0	0	0
57	0	310	172	348	0	654	215	0	0	0
MEDIA	209	345	57	206	0	218	131	0	0	0
Grupo II 1.0 ppm										
50	219	176	0	0	0	170	424	0	0	0
58	0	0	0	330	227	0	0	498	0	0
59	402	0	0	372	376	0	0	430	219	0
MEDIA	207	59	0	234	201	57	141	309	73	0

(a) La aflatoxina se administró a partir del día 1

(b) Número de animal.

(c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

(d) Día del desafío.

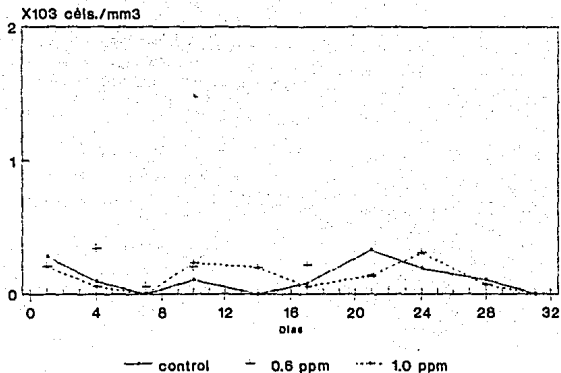


Figura 4. Valores absolutos de la concentración de polimorfonucleares en banda PMNB por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento.

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 11. Valores absolutos de la concentración de eosinófilos por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

	Días (a)									
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control										
(b)										
54	768	294	0	704	1380	477	310	444	636	880
60	189	0	190	422	144	0	0	0	0	0
MEDIA	479	147	95	563	762	239	155	222	318	440
Grupo II 0.6 ppm										
55	0	270	370	271	294	213	390	912	657	428
56	412	370	636	486	669	0	712	0	642	1673
57	0	310	172	0	171	0	430	0	218	0
MEDIA	137	317	393	252	378	71	511	304	506	700
Grupo III 1.0 ppm										
50	0	176	165	378	428	0	0	0	792	425
58	0	0	0	660	454	172	191	0	0	293
59	402	675	936	372	564	424	570	0	0	0
MEDIA	134	284	367	470	482	199	254	0	264	239

- (a) La aflatoxina se administró a partir del día 1
- (b) Número de animal.
- (c) Día de la vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.
- (d) Día del desafío.

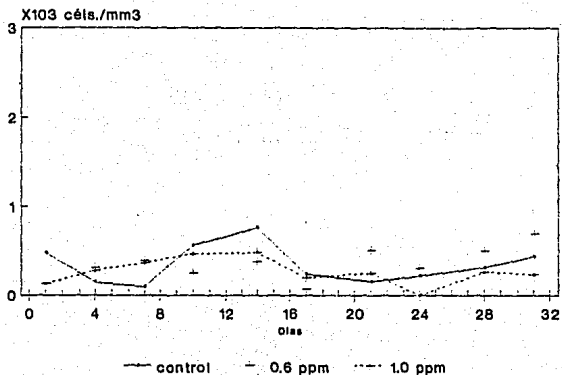


Figura 5. Valores absolutos de la concentración de eosinófilos por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 12. Valores absolutos de la concentración de linfocitos T totales (Tt) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B₁ en el alimento.

	Días(a)									
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control										
(b)										
54	3686	3554	1616	3210	2841	2833	2325	4249	3072	2640
60	1465	3519	3010	960	0	0	1310	2177	1922	1699
MEDIA	2576	3537	2313	2085	1420	1417	1818	3213	2497	2170
Grupo II 0.6 ppm										
55	4631	4072	2276	5658	5045	3408	4310	6767	3073	3056
56	4384	5195	2612	2483	4808	2141	3147	5624	6356	1013
57	3978	2427	2740	1643	2779	4173	4132	3060	5188	643
MEDIA	4331	3898	2542	3262	4211	3240	3863	5150	4872	1571
Grupo III 1.0 ppm										
50	12319	7901	9281	10631	11404	8094	2309	5202	7986	4913
58	5868	6638	7167	8318	8726	6192	10459	4489	7084	5933
59	10132	12321	19472	9376	8951	11297	10404	3270	7623	5125
MEDIA	9440	8953	11973	9442	9694	8528	7724	4320	7565	5324

(a) La aflatoxina se administro a partir del día 1.

(b) Número de animal.

(c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

(d) Día del desafío.

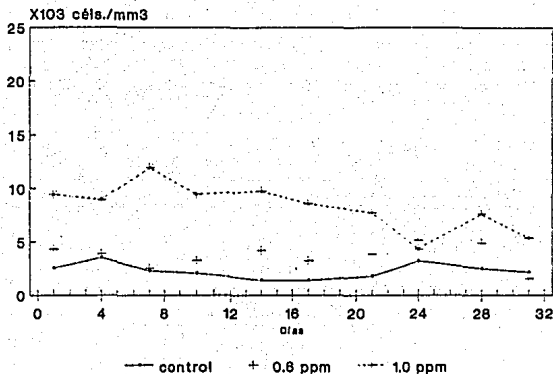


Figura 6. Valores absolutos de la concentración de linfocitos T totales (Tt) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento.

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 13. Valores absolutos de la concentración de linfocitos T alta afinidad (Taa) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

	Días (a)									
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control										
(b)										
54	2949	1032	680	535	2243	1784	1023	773	1469	1188
60	703	2076	1881	1097			655	454	1153	894
MEDIA	1826	1554	1281	816	2243	1784	839	613	1311	1041
Grupo II 0.6 ppm										
55	2171	626	2124	1366	3493	2181	1394	2256	1469	2328
56	1566	1876	490	1242	3262	1265	2869	1704	3178	633
57	1432	1339	1116	513	1778	1897	2399	691	1984	964
MEDIA	1723	1281	1243	1040	2845	1781	2221	1550	2210	1309
Grupo III 1.0 ppm										
50	1643	236	990	1134	1562	1290	840	1828	2904	2023
58	1174	1505	1265	937	1126	1342	1837	1381	1635	3164
59	2426	1998	4930	1453	2594	4952	3656	2348	3230	2726
MEDIA	1747	1246	2395	1175	1761	2528	2511	1852	2590	2638

- (a) La aflatoxina se administró a partir del día 1
- (b) Número de animal.
- (c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica
- (d) Día del desafío

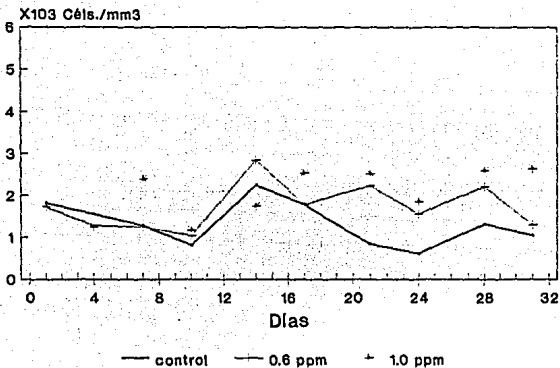


Figura 7. Valores absolutos de la concentración de linfocitos T alta afinidad (Taa) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 14. Valores absolutos de la concentración de linfocitos T autólogos (Taut) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

	Días(a)									
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control										
(b)										
54	123	344	85	401	150	1574	279	644	801	396
60	176	451	376	686			393	635	512	89
MEDIA	149	398	231	544	150	1574	336	639	657	243
Grupo II 0.6 ppm										
55	579	470	303	390	582	682	254	322	802	291
56	783	289	326	1064	687	389	370	511	847	0
57	955	335	304	308	111		533	395	610	107
MEDIA	772	364	311	588	460	535	386	409	753	133
Grupo III 1.0 ppm										
50	657	236	1361	425	1094	469	140	422	1888	289
58	391	266	316	117	704	103	424	777	409	264
59	143	666	1972	528	649	310	1406	419	904	0
MEDIA	397	389	1216	357	815	294	657	539	1067	184

(a) La aflatoxina se administró a partir del día 1

(b) Número de animal.

(c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica

(d) Día del desafío

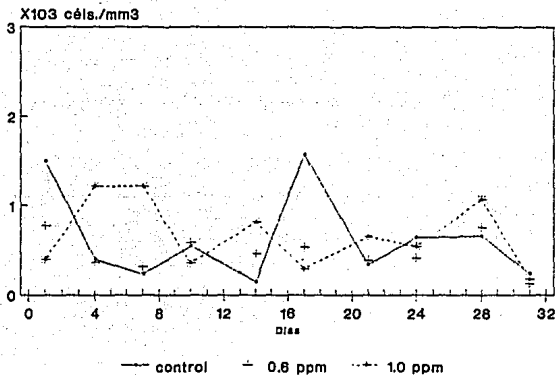


Figura 8. Valores absolutos de la concentración de linfocitos T autólogos (Taut) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 15. Valores absolutos de la concentración de linfocitos B complemento (Bc) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento.

	Días(a)									
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control										
(b)										
54	2335	1261	340	1070	1794	944	744	129	1336	1584
60	1172	2436	878	823			852	91	1025	805
MEDIA	1753	1849	609	946	1794	944	798	110	1180	1194
Grupo II 0.6 ppm										
55	1737	1566	1214	780	776	1908	761	1289	1870	1455
56	1879	2742	1306	887	2404	2433	463	1704	3813	1393
57	2546	753	1421	411	1778	1897	667	691	2594	1392
MEDIA	2054	1687	1313	693	1653	2079	630	1228	2759	1414
Grupo III 1.0 ppm										
50	2300	1179	866	1418	1094	2933	420		3194	3035
58	1369	1505	949	1992	844	1651	848	863	2180	4483
59	2711	2831	2711	3302	1946	4952	1828	1090	4393	2181
MEDIA	2127	1838	1509	2237	1295	3179	1032	977	3256	3233

- (a) La aflatoxina se administró a partir del día 1
- (b) Número de animal.
- (c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica
- (d) Día del desafío

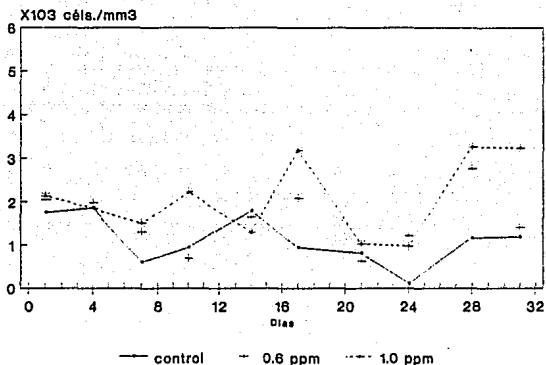


Figura 9. Valores absolutos de la concentración de linfocitos B complemento (Bc) por mm3 de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 16. Valores absolutos de la concentración de linfocitos B con receptor para Fc (BFc) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

		Días (a)									
		1	4	7	10	14	17	(c)	24	28	(d)
								21			31
Grupo I Control											
	(b)										
54	2335	1835	1191	1873	1196	1469	744	1030	935	1980	
60	1172	2888	2633	1234			393	363	897	894	
MEDIA	1753	2361	1912	1553	1196	1469	569	696	916	1437	
Grupo II 0.6 ppm											
55	2894	2506	1365	2732	2328	1772	2028	1289	2137	3056	
56	2662	3463	1632	1597	2576	2043	1851	2045	3178	2407	
57	3342	921	1116	1643	2556	2529	3066	494	2289	2678	
MEDIA	2966	2297	1371	1990	2487	2115	2315	1276	2535	2713	
Grupo III 1.0 ppm											
50	1807	708	2599	284	781	3402	1609		2468	2312	
58	1467	1505	422	1406	1407	1445	1555	777	2180		
59	3282	3663	3944	3169	2205	6809	3515	1174	3101	2290	
MEDIA	2185	1958	2321	1620	1465	3885	2226	975	2583	2301	

- (a) La aflatoxina se administró a partir del día 1
- (b) Número de animal.
- (c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica
- (d) Día del desafío

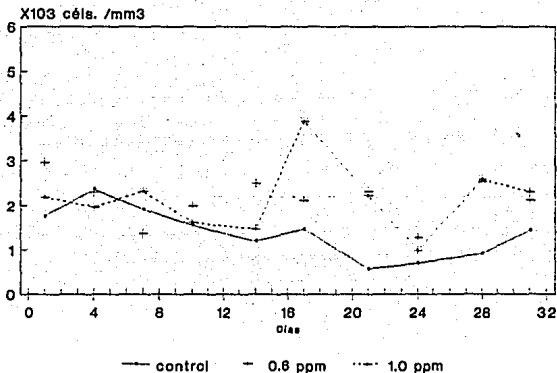


Figura 10. Valores absolutos de la concentración de linfocitos B con receptor para Fc (BFC) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento
 Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.
 Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.
 Día 31 desafío.

Tabla 17. Valores absolutos de la concentración de linfocitos Null (Null) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B₁ en el alimento

	Días(a)									
	1	4	7	10	14	17	(c) 21	24	28	(d) 31
Grupo I Control										
	(b)									
54	6267	6077	5698	8293	10914	6191	6231	7597	9349	8580
60	3222	2617	6897	11521			4848	6531	9992	6350
MEDIA	4745	4347	6298	9907	10914	6191	5540	7064	9671	7465
Grupo II 0.6 ppm										
55	6947	9083	11529	11122	12030	8452	6338	8056	8149	8440
56	8611	5772	12080	13659	9787	5546	4258	11078	11652	9247
57	8592	5022	6292	6981	5780	5943	6132	6317	7783	7390
MEDIA	8050	6626	9967	10587	9199	6647	5576	8484	9195	8359
Grupo III 1.0 ppm										
50	8870	8254	5569	10631	11717	5161	3778	8998	6970	8959
58	5770	5399	8010	9138	9711	6192	9328	5611	7493	9625
59	5851	8492	14296	7924	7524	1083	5765	3522	6461	6433
MEDIA	6830	7381	9292	9231	9650	4146	6290	6044	6974	8339

- (a) La aflatoxina se administró a partir del día 1
 (b) Número de animal.
 (c) Día de vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica
 (d) Día del desafío

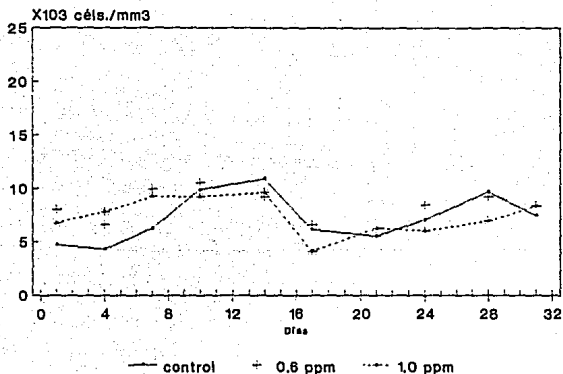


Figura 11. Valores absolutos de la concentración de linfocitos Null (Null) por mm³ de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1 en el alimento

Día 1 inicio de consumo de aflatoxina.

Día 21 vacunación contra la Fiebre Porcina Clásica.

Día 31 desafío.

Tabla 18. Resultados del desafío de cerdos a los que se les administró 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B₁, vacunados contra la Fiebre Porcina Clásica y desafiados 14 días más tarde

	Número de animal	Muertos/total	% protección
Grupo I Control	54	2/2	0
	60		
Grupo II 0.6 ppm	55	0/3	100
	56		
	57		
Grupo III 1.0 ppm	50	0/3	100
	58		
	59		

De éste desafío se obtiene un nivel de protección del 100% de los cerdos, ya que todos sobrevivieron, sin importar la dosis de aflatoxinas consumida.

DISCUSION

En las granjas porcinas ocasionalmente los porcicultores compran grano barato que se encuentra contaminado con hongos. Al preparar el alimento con estos granos hay una contaminación con micotoxinas siendo la aflatoxina B1 una de las más frecuentes. Se ha reportado que los cerdos que consumen el alimento contaminado pierden peso, pero no se ha demostrado que desarrollen más enfermedades o sean propensos a fallas vacunales.

Es por este motivo que en el presente trabajo se determinó el efecto del consumo de aflatoxina B1 en dos diferentes concentraciones 0.6 y 1.0 ppm, sobre la ganancia de peso, la biometría hemática (fórmula blanca), las subpoblaciones de linfocitos y la respuesta inmune protectora de una vacuna contra la Fiebre Porcina Clásica.

Se emplearon dos concentraciones diferentes de aflatoxina B1, ya que se ha reportado que 1.0 ppm, es capaz de inducir toxicidad y efectos patológicos en un periodo similar al que se empleó en este experimento (15, 63, 64). Debido al efecto marcado sobre los animales de 1.0 ppm, se decidió probar también una dosis menor, 0.6 ppm, que simulara las condiciones de campo en las que no hay signos clínicos aparentes, el veterinario no reconoce una intoxicación y evaluar su efecto sobre el sistema inmune así como la respuesta protectora hacia una vacuna de Fiebre Porcina Clásica.

Los animales que consumieron la dieta baja de aflatoxinas (0.6 ppm) y los del grupo control mostraron una mayor ganancia de peso en comparación con los animales que consumieron 1.0 ppm, como había sido mencionado por Bueno (12), y otros investigadores (15, 19, 20, 47).

Fué aparente que el consumo de 0.06 ppm de aflatoxina B1 fué metabolizada sin afectar a la ganancia de peso (9).

Con respecto al efecto de las aflatoxinas sobre la biometría hemática y subpoblaciones de linfocitos no se observan cambios en las concentraciones en ninguna de las células evaluadas durante los 31 días del experimento. En modelos de hígado de rata, se ha descrito que la aflatoxina B1 inhibe síntesis de proteínas a través de la unión con el ADN lo que evita la transcripción, sin embargo, no se ha descrito que ésto ocurra en los cerdos (40, 74, 86).

Debido a que no se observan cambios en las concentraciones de células sanguíneas de elevada multiplicación, es probable que la aflatoxina no las esté afectando. Quizá esto se deba a que la aflatoxina se encuentra principalmente en el hígado y no quede disponible en una concentración que afecte el número de células a nivel de otros órganos (49).

Con objeto de determinar el efecto de las aflatoxinas sobre la funcionalidad del sistema inmune se vacunaron los animales con una vacuna de virus vivo modificado contra la Fiebre Porcina Clásica. Se escogió este modelo porque en el campo ocasionalmente falla la vacuna y algunos clínicos lo han atribuido a un probable efecto inmunosupresor por presencia de aflatoxinas en el alimento. Los resultados que se obtuvieron indican claramente que en el grupo de 1.0 ppm, a pesar de la marcada pérdida de peso, sí se estimuló una respuesta inmune protectora. Este resultado contrasta con el obtenido por Cysewski y colaboradores (18), en el que demostró que los cerdos intoxicados con aflatoxina y bacterinizados no produjeron una respuesta inmune protectora contra *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Es probable que esto

se deba a que Cysewski y colaboradores usaron una bacterina que contenía antígeno inactivado, mientras que en este trabajo se utilizó una vacuna con virus vivo atenuado el cual se multiplicó en el animal, incrementando de esta manera la masa antigénica. Este resultado indicó que la aflatoxicosis en los cerdos probablemente no sea una causa de falla vacunal; además debido a que con 1.0 ppm los animales pierden rápidamente peso, generalmente el veterinario se da cuenta, procede a cambiar el alimento y no los vacuna.

Por otro lado una concentración menor (0.6 ppm) que pudiera pasar inadvertida para el veterinario, no tuvo ningún efecto sobre el peso de los animales ni en su respuesta inmune durante el periodo del experimento.

Los resultados del efecto las aflatoxinas sobre el sistema inmune del cerdo obtenidos en este experimento fueron semejantes a los reportados en otras especies (29, 40, 41, 45, 49, 53, 55, 84, 86), en los que no fue posible demostrar una clara relación entre la intoxicación e inmunosupresión, a pesar de la pérdida de peso en todas las especies animales (19, 20, 21, 40, 41, 47, 50, 63, 70, 86).

CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los objetivos planteados al inicio del presente trabajo, se pudo obtener una importante cantidad de aflatoxinas las cuáles al ser caracterizadas mostraron ser aflatoxina B1 en mayor proporción, con respecto a las otras aflatoxinas, en concentración suficiente para contaminar el alimento que fué consumido durante el tiempo de experimentación, a las concentraciones de 0.6 y 1.0 ppm de aflatoxina B1, el cuál fué verificado al inicio, durante y al final del experimento, encontrándose en las concentraciones deseadas.

2. El consumo del alimento contaminado con aflatoxina B1 disminuyó significativamente la ganancia de peso de los cerdos que recibieron 1.0 ppm de aflatoxina, sin afectar a los cerdos del grupo que recibió 0.6 ppm de aflatoxina B1.

3. Los valores de leucocitos así como de subpoblaciones de linfocitos determinados en el presente trabajo, no muestran alteraciones estadísticamente significativas, por lo cuál no se puede atribuir efecto sobre éstas células por el consumo de alimento contaminado con aflatoxina B1.

4. La respuesta inmune protectora no se vió alterada con el consumo de las aflatoxinas, al menos en las concentraciones empleadas lo cuál es mostrado por la sobrevivencia de todos los cerdos vacunados contra la F.P.C. y desafiados con la cepa patógena de la F.P.C.

REFERENCIAS

1. Abnerl, N. and Stephan, E. M., 1970. Effect of virus infections on the function of the immune system. *Ann. Ref. Microbiol.*, 24: 525- 538
2. Aiken, J. M. and Blore, I. C., 1964. Immunology of newborn pigs: response to lapinized hog cholera virus in colostrum-deprived and suckling pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 1134- 1140
3. Alastair, W. S. R., Ian, O., 1983. Circadian variation of lymphocyte subpopulations: a study with monoclonal antibodies. *British Medical Journal.*, 286: 1773- 1775
4. AOAC Methods of Analysis AOAC Whashington., 1980. 13 th Edition. pp. 414-428
5. Aynaud, J. M., 1988. Principles of vaccination. Classical swine fever and related viral infections. Edited by Liess, B.: Martinus Nijhoff Publishing., Boston. 165- 177.
6. Bach, J. F. and Lesavre, P., 1983. *Inmunología*. Ed. Masson. pp. 3 -126.
7. Barret, J. T., 1990. *Inmunología Médica*. Editorial Interamericana. 5a. ed.
8. Beaver, R. W. and Wilson, D. M., 1990. Distribution of aflatoxin in tissues of growing pigs fed an aflatoxin-contaminated diet amended with a high affinity aluminosilicate sorbent. *Vet. Hum. Toxicol.* 32: 16 -18.
9. Bennett, J. W. and Christensen, S. B., 1983. New perspectives on aflatoxin biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology.*, 29: 53-92.
10. Bhakri, H. L., Pettingale, K. W., 1981. Circadian variation of lymphocyte subpopulation. *British Medical Journal.*, 287- 562.

10. Bhakri, H. L., Pettingale, K. W., 1981. Circadian variation of lymphocyte subpopulation. *British Medical Journal.*, 287- 562.
11. Binns, R. M., 1980. Pig lymphocytes- behaviour, distribution and classification. *Monogr. Allergy.*, 16: 19- 37.
12. Bueno, L., Szigeti, G., Díaz Moya, O. y Ramos, R., 1984. Ganancia en peso y conversión alimenticia en aflatoxicosis experimental de cerditos destetados. *Revista Cubana de Ciencia Veterinaria.*, 15: 201-204.
13. Castillo, A. A., Sánchez, G. J. y Rosiles, M. R., 1983. Características físicas y niveles de aflatoxina B1 en gallinaza y pollinaza de granjas de Texcoco, Edo. de Méx. *Vet. Méx.*, 14: 151-157.
14. Charley, B., Corthier, G., Houdayer, M., et Rouzé, P., 1980. Modifications des reactions immunitaires au cours de la peste porcine classique. *Ann. Rech. Vét.* 11: 27-33.
15. Chauhan, H. V. S., Jha, G. J. and Sing, P. N., 1984. Hepatocellular carcinoma associated with aflatoxicosis in pigs. *Indian Vet. J.*, 61: 1009-1014.
16. Chu, F. S. and Ueno, I., 1977. Production of antibody against aflatoxin B1. *Applied and Enviromental Microbiology.* 33: 1125- 1128
17. Cysewski, S. J., Pier, A. C. and Engstrom, G. W., 1968. Clinical pathologic features of acute aflatoxicosis of swine. *Am. J. Vet. Res.*, 29: 1577- 1590.
18. Cysewski, S. J., Wood, R. L., Pier, A. C. and Baetz, A. L., 1978. Effects of aflatoxin on the development of acquired immunity to swine erysipelas. *Am. J. Vet. Res.*, 39: 445- 448.

20. Dudley, B., SisK, D. V. and William, C., 1968. Experimental aflatoxicosis in young swin. Am. J. Vet. Res., 29: 1595- 1600.
21. Edds, G. T., 1973. Acute aflatoxicosis: a review. J. A. V. M. A., 162: 304- 309.
22. Ehrensperger, F., 1988. Immunological aspects of the infection. Classical Swine Fever and Related Viral Infections. Edited by Liess, B.: Martinus Nijhoff Publishing, Boston. pp. 144- 157.
23. Flores Menéndez, J. A., 1983. Ganado porcino: cría, explotación, enfermedades e industrialización. Ed. Limusa. 3a. ed. pp. 91- 798.
24. Francis, A. L. and Chantal, C., 1985. Circadian and/or circahemidian rhythms in nine lymphocyte- related variables from peripheral blood of healthy subjects. The American Association of Immunologists., pp. 217- 222.
25. Friesen, M. D. and Garren, L., 1982. Mycotoxins J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65: 855- 863.
26. Funderberg, H. H., Stites, D. P. and Caldwell, J. L., 1978. Manual de Inmunología Clínica. Editorial El Manual Moderno., pp 125- 250.
27. Helferich, W. G., 1984. Aflatoxin in food producing animal; metabolism and transmission. Dissertation Abstracts International., 8: 44.
28. Harkness, J. W., 1985. Classical swine fever and its diagnosis: a current view. Vet. Rec., 116: 288- 293.
29. Hayes, W., King, R. E., Hunger, P. D. and Timothy, D. P., 1978. Aflatoxicosis in swine. J. A. V. M. A., 172: 1295 - 1297

30. Hyde, W., Kiesey, J. Ross, P. F. and Stahr, H. M., 1977. Mycotoxins. Analytical Toxicology Methods Manual. Edited by H. M. Stahr. pp. 164 - 175.
31. Kanke, R. P., Roo, C. S., 1972. A rapid cualitative test for aflatoxin. Feedstuffs 32: 25.
32. Kumate, J., 1979. Inmunidad, Inmunización, Vacunas. Ediciones Médicas del Hospital Infantil. 2a. ed. pp. 2- 45.
33. Laude, H., 1986. Hog cholera virus: art and facts. Ann. Rech. Vet., 18: 127-138.
34. Liess, B., 1987. Pathogenesis and epidemiology of hog cholera. Ann. Rech. Vét., 18: 139- 145.
35. Lillehoj, E. B., 1973. Feed sources and conditions conducive to production of Aflatoxin, Ochratoxin, Fusarium toxins and Zearalenone. J. A. V. M. A., 163: 1281- 1284.
36. Lugo, R. N., Ocampo, C. L., Carbonell, R. C. y Rosiles, M. R., 1981. Evaluación del ácido propiónico como inhibidor del crecimiento de hongos en alimento para pollos. Vet. Mex., 12: 153- 157.
37. Martínez, A. G., Cisneros, I., Urquiza, F. and Morilla, A., 1986. Comparison of the immunosuppressive efect of a pathogenic and vaccinal hog cholera viral strains. Proceedings. International Pig Veterinary Society. pp. 331.
38. Mengeling, W. L. and Packer. R. A., 1969. Pathogenesis of chronic hog cholera: host response. Am. J. Vet. Res., 30: 409- 417.
39. Miller, D. M., Crowell, W. A. and Stuart, B. P., 1982. Acute aflatoxicosis in swine: clinical pathology, histopathology, and electron microscopy. Am. J. Vet. Res., 43: 273- 277.

39. Miller, D. M., Crowell, W. A. and Stuart, B. P., 1982. Acute aflatoxicosis in swine: clinical pathology, histopathology, and electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 273- 277.
40. Mirocha, C. J., 1991. Aflatoxinas: Química, metabolismo y sus efectos en la salud animal. *Porcira.*, 1: 62- 70.
41. Morilla, G. A., 1990. Aflatoxinas e inmunidad. *Avirama*. VII: 17-23.
42. Morilla, G. A., 1991. Conceptos sobre la inmunización contra el cólera porcino en México. *Ciencia Veterinaria.*, 5: 119- 142.
43. Morilla, G. A., 1991. Vacunación en la fiebre porcina clásica *Porcira.*, 1: 38- 43.
44. Morilla, G. A., 1984. Importancia del mantenimiento de zonas porcícolas libres de cólera, Aujeszky, gastroenteritis (GTC) en México. *Porcira.*, IX: 5- 16.
45. Morilla, G. A. Efecto de las micotoxinas sobre los mecanismos de inmunidad. *Avirama.*, pp. 19-27.
46. Nakamura, S., Sasahara, J. and Shimizu, M., 1983. Replication of hog cholera virus in porcine alveolar macrophage cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, 23: 101- 102.
47. Newberne, P. M., 1973. Chronic aflatoxicosis. *J. A. V. M. A.*, 163: 1262- 1267.
48. Notkins, A. L., Mergenhagen, S. E. and Howard, R. J., 1970. Effect of virus infection on the function of the immune system. *Ann. Rev. Microbiol.*, 24: 525- 538.
49. Panangala, V. S., 1986. Effects of aflatoxin on the growth performance and immune responses of weanling swine. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 2062- 2067

51. Pestka, J. and Chu, F., 1984. Aflatoxin B1 dihydrodiol antibody: production and specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 472- 477
52. Pier, A. C., Effects of aflatoxin and other mycotoxins on the immune response *J. A. V. M. A.*, 163: 133- 138.
53. Pier, A. C., 1973. Effects of aflatoxin on immunity. *J. A. V. M. A.*, 163: 1268- 1269.
54. Pier, A. C. and Belden, E. L., 1985. Suppression of cell mediated immune reactions by aflatoxin and T-2 toxin. Abstracts of papers presented at the Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases., 66: 17.
55. Pier, A. C., Fichtner, R.E. and Cysewski., 1977. Effects of aflatoxin on the cellular immune system. *Ann. Nuer. Alim.*, 31: 781- 783.
56. Pijoán, C., Campos, M. y Ochoa, G., 1980. Effect of a hog cholera vaccine strain on the bactericidal activity of porcine alveolar macrophages. *Rev. Latinoamer. Microbiol.*, 22: 69- 71.
57. Pownall, R. y Knapp, M. S., 1979. Immune responses have rhythms: are they important? *Immunology today.*, pp. 19- 22.
58. Rapar, K. B., Gennell, D., 1977. *The Genus Aspergillus*. Ed. Robert, E. Kriegs N.Y. pp. 17- 55.
59. Remond, M., Plateau, E. and Cruciere, C., 1981. In vitro study of the cellular response of pigs vaccinated against classical swine fever. *Zbl. Vet. Med.*, 28: 743- 748.
60. Robens, J. F., 1980. Health risk and regulatory aspects of aflatoxin. *Vet. Hum. Toxicol.*, pp. 264- 266.
61. Roitt, I., Brostoff, J. y Male, D., 1991. *Inmunología*. Salvat Editores., pp. 15- 40.

62. Roitt, I., 1991. Essential Immunology Blackwell Scientific Publications, U. K.
63. Rosiles, M. R. y Pérez, R., 1981. Consideraciones generales sobre micotoxinas en alimentos para animales domésticos. Vet. Mex., 12: 229- 232.
64. Rosiles, M. R., 1978. Estudio de las aflatoxinas en ensilado de maíz. Vet. Méx., 15: 163- 167.
65. Ruiz, P. A., Paasch, M. L., Adame, P. y Rosiles, M. R., 1984. Neoplasias hepáticas en la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) criada en la estación piscícola "El Zarco", Distrito Federal. Vet. Mex., 15: 255- 261.
66. Salmon, H., 1979. Surface markers of porcine lymphocytes and distribution in various organs. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 60: 262- 268.
67. Salmon, H. et Jan, C. L., 1979. Rôle du lymphocyte dans l'immunité. Rec. Méd. Vét., 155: 11- 22.
68. Shimizu, M. and Shimizu, Y., 1983. Propierties of hog cholera viruses recently isolated in Japan. Natl. Inst. Anim. Health Q., 23: 103- 104.
69. Shimizu, S., Pard, I. and Hess, W., 1976. T and B lymphocytes in porcine blood. Am. J. Vet. Res., 37: 309-316.
70. Sisk, D. B. and Carlton, W. W., 1972. Effect of dietary protein concentration on response of miniature swine to aflatoxins. Am. J. Vet. Res., 33: 107- 114.
71. Sisk, D. B., Carlton, W. W. and Curtin, T. M., 1968. Experimental aflatoxicosis in young swine. Am. J. Vet. Res., 29: 1591 - 1602.

72. Stahr, H. M., 1981. Detoxification of aflatoxin contaminated corn by methanol extraction. *Vet. Hum. Toxicol.*, 24: 16- 17.
73. Stoloff, L., 1972. Analytical methods for mycotoxicosis. *Clin. Toxicol.*, 3: 465-494.
74. Swenson, D. H., Lin, J., Miller, E. C. and Miller, J. A., 1977. Aflatoxin B₁- 2,3-oxide as probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B₁ and B₂ to rat liver DNA. *Cancer Research.*, 37: 172 - 181.
75. Thaxton, B. P., Thing, H. T., 1976. Immunosuppression in chickens by aflatoxin. *Poult. Sci.*, 53: 2241-2244.
76. Trawtein, G., 1988. Pathology and pathogenesis of the disease. Classical Swine Fever and Related Viral Infections. Edited by Liess, B.: Martinus Nijhoff Publishing, Boston. pp. 27- 49.
77. Van Der Molen, E. J. and Van Oirschot, J. T., 1981. Congenital persistent swine fever (hog cholera). I. Pathomorphological lesions in lymphoid tissues, kidney and adrenal. *Zbl. Vet. Med.*, 28: 89- 101.
78. Van Der Molen, E. J. and Van Oirschot, J. T., 1981. Congenital persistent swine fever (Hog cholera). I. Pathomorphological lesions in tissues, kidney and adrenal. *Zbl. Vet. Med.*, 28: 89- 101.
79. Van Oirschot, J. T., 1979. Experimental production of congenital persistent swine fever infections. I. Clinical, pathological and virological observations. *Vet. Microbiol.*, 4: 117- 132.
80. Van Oirschot, J. T., 1979. Experimental production of congenital persistent swine fever infections. II. Effect on functions of the immune system. *Vet. Microbiol.*, 4: 133- 147.
81. Van Oirschot, J. T., 1983. Congenital infections with non arbo togaviruses. *Vet. Microbiol.*, 8: 321- 361.

82. Van Oirschot, J. T., Jong, D. and Huffels, N., 1981. Effect of infections with swine fever virus on immune functions. I. Response of lymphocytes from blood and. *Vet. Microbiol.*, 6: 41- 57.
83. Van Oirschot, J. T., Jong, D. and Huffels, N., 1983. Effect of infections with swine fever virus on immune functions. II. Lymphocyte response to mitogens. *Vet. Microbiol.*, 8: 81- 95.
84. Wessel, J. R. and Stoloff, B. S., 1973. Regulatory surveillance for aflatoxin and other mycotoxins in feeds, meat, and milk. *J. A. V. M. A.*, 163: 1284- 1290.
85. Wilson, D., Sangster, L. and Bedell, C., 1984. Recognizing the signs of porcine aflatoxic. *Vet. Med. and Small Animal Clinics.*, 79: 974-1077.
86. Wogan, G. N., 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews.*, 30: 461-469:
87. Yang, W. C. and Panangala, V. S., 1982. Aflatoxin B1: is it immunosuppressive?. En 63rd Annual Meeting of the Conference of Research Workers Animal Diseases., pp. 29.
88. Yang, W. C., Schultz, R. D., 1983. In vitro effect of aflatoxins on porcine leucocyte functions. En 64rd Annual Meeting of the Conference of the Research Workers Animal Disease., 64 pp.38.
89. Yang, W. C., 1983. Effects of aflatoxin B1 on the development of porcine celular a humoral responses *Dissertation Abstracts International.*, pp. 44.