

11661
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO 1

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA DE LECHONES
TRATADOS CON EL FACTOR DE TRANSFERENCIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(MICROBIOLOGIA)
P R E S E N T A :
Q.F.B. LAURA CANO ORTIZ

300335

DIRECTOR: DR. ANDRES ROMERO ROJAS
CO ASESORES: DR. SERGIO ESTRADA PARRA
DR. JORGE REYES ESPARZA



Universidad Nacional
Autónoma de México

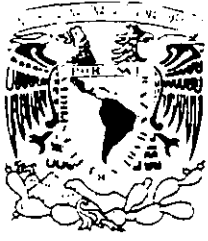


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

**Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES-Cuautitlán
Presente.**

Por medio de este conducto nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "Efecto del factor de transferencia sobre la respuesta inmune de lechones" que presenta la alumna **LAURA CANO ORTIZ** con número de cuenta **8940298-8** y número de expediente **100981004** para obtener el grado de **Maestra en Microbiología**. Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

_____ a _____ de _____ del _____

NOMBRE DE LOS SINODALES

Presidente: **DR. SERGIO ESTRADA PARRA**

Vocal: **DR. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ**

Secretario: **DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO**

Primer Suplente: **DR. PEDRO PRADAL ROA**

Segundo Suplente: **DR. ANDRES ROMERO ROJAS**

El presente trabajo fue realizado en el departamento de inmunología Molecular I de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN, en la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología – SSA y en el "Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción porcina" FMVZ –UNAM.

Agradecimientos

A mi familia por su inagotable cariño, por su apoyo, su confianza y por animarme a seguir siempre adelante a pesar de los obstáculos que puedan presentarse.

Ratifico mi eterno agradecimiento a mis padres Maria Luisa Ortiz y Benigno Cano, los amo.

A Ricardo por su comprensión, apoyo y paciencia incondicional, gracias por estar aquí.

A los sinodales Dr. Sergio Estrada Parra, Dr. Marco Antonio Vega López, Dr. Abel Ciprian Carrasco, Dr. Pedro Pardal Roa y Al Dr. Andrés Romero Rojas, por sus sugerencias para mejorar éste trabajo, agradezco su valioso tiempo.

A todas las personas que participaron con su apoyo para la realización de este trabajo, gracias.

Para ti Valeria.

CONTENIDO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE CONTENIDO | <i>i</i> |
| Índice de figuras y cuadros | <i>iv</i> |
| Lista de abreviaturas | <i>v</i> |
| | |
| Resumen | <i>vi</i> |
| Abstract | <i>viii</i> |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Sistema inmunológico del lechón | 3 |
| 1.1.1 Inmunidad pasiva | 3 |
| 1.1.2 Características de las inmunoglobulinas del cerdo | 6 |
| 1.1.3 Distribución fisiológica de las inmunoglobulinas del cerdo y células que secretan inmunoglobulinas | |
| 1.1.4 Estructura del sistema inmunológico del lechón | 8 |
| 1.1.5 Expresión de CD2 sobre linfocitos T porcinos | 10 |
| 1.1.6 Expresión de CD4 y CD8 sobre linfocitos T porcinos | 10 |
| 1.1.7 Células efectoras de la respuesta innata | 11 |
| 1.1.8 Desarrollo de la inmunidad activa | 12 |
| 1.2 Inmunomoduladores | 14 |
| 1.2.1 Clasificación de los inmunomoduladores | 16 |
| 1.2.2 Modo de acción general de los inmunomoduladores | 16 |
| 1.2.3 Efectos de inmunomoduladores fisiológicamente importantes | |
| Modificadores biológicos | |
| 1.2.3.1 Hormonas tímicas | 17 |
| 1.2.3.2 Citocinas | 17 |
| 1.2.3.3 Interferón | 18 |
| 1.2.3.4 Interleucina-1 | 18 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.2.3.5 | Interleucina-2 | 18 |
| 1.2.3.6 | Interleucina-6 | 18 |
| 1.2.4 | Compuestos sintéticos con efectos inmunomoduladores | 19 |
| 1.2.4.1 | Levamisol y tiabendazol | 19 |
| 1.2.4.2 | Imutiol | 19 |
| 1.2.5 | Aplicaciones clínicas de algunos inmunomoduladores en medicina veterinaria | |
| 1.2.6 | Limitaciones de los inmunomoduladores | 21 |
| 1.3 | Factor de Transferencia (FT) | 22 |
| 1.3.1 | Definición de FT | 22 |
| 1.3.2 | Características generales del FT | 23 |
| 1.3.3 | Estructura química del FT | 24 |
| 1.3.4 | Mecanismo de acción propuestos para el FT | 24 |
| 1.3.5 | Aplicaciones del FT en medicina veterinaria | 26 |
| 1.4 | Justificación | 28 |
| 1.5 | Hipótesis | 28 |
| 1.6 | Objetivo General | 29 |
| 1.7 | Objetivos Particulares | 29 |
| 2. | MATERIAL Y MÉTODOS | 30 |
| 2.1 | Animales de experimentación | 30 |
| 2.2 | Diseño experimental | 30 |
| 2.3 | Producción del FT | 32 |
| 2.4 | Proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos T de sangre periférica | 34 |
| 2.5 | Estudio de la expresión de los antígenos de diferenciación CD2, CD4 y CD8 mediante citometría de flujo. | |
| 2.6 | Determinación de anticuerpos específicos de isotipo IgM e IgA | 37 |
| 2.7 | Conteo diferencial | 38 |
| 2.8 | Incremento de peso semanal | 38 |
| 2.9 | Análisis estadístico | 38 |

| | |
|---|----|
| 3. Resultados | 39 |
| 3.1 Proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos T de sangre periférica | 39 |
| 3.2 Estudio de la expresión de los antígenos de diferenciación CD2, CD4, y CD8 mediante citometría de flujo | |
| 3.3 Determinación de anticuerpos específicos de isotipo IgA e IgM | 47 |
| 3.4 Conteo diferencial | 49 |
| 3.5 Incremento de peso semanal | 51 |
| 4. Discusión | 52 |
| 5. Conclusiones | 64 |
| 6. ANEXO 1 | 65 |
| 7. Referencias | 66 |

ÍNDICE DE FIGURAS y CUADROS

| | | Página |
|-------------|---|--------|
| Figura 2.2 | Protocolo de tratamiento a los 8 lechones de cada uno de los grupos trabajados | 31 |
| Figura 2.3 | Diagrama de flujo. Metodología empleada para realizar la evaluación inmunológica de lechones de 2 a 28 días de edad | 33 |
| Figura 2.5 | Análisis de subpoblaciones de linfocitos por citometría, se establecieron los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) con base a los cuales se seleccionó la población de linfocitos a analizar | 36 |
| Figura 3.1 | Muestra las respuestas proliferativas <i>in vitro</i> de linfocitos obtenidos de animales sin tratamiento (CONTROL) | 39 |
| Figura 3.2 | Muestra las respuestas proliferativas <i>in vitro</i> de linfocitos obtenidos de animales vacunados | 40 |
| Figura 3.3 | Muestra las respuestas proliferativas <i>in vitro</i> de linfocitos obtenidos de animales tratados con FT <i>in vivo</i> | 41 |
| Figura 3.4 | Muestra las respuestas proliferativas <i>in vitro</i> de linfocitos obtenidos de animales con vacuna y FT al mismo tiempo | 42 |
| Figura 3.5 | Efecto del FT sobre la expresión de marcadores CD2 por linfocitos T de lechón a partir de sangre periférica. Tinción sencilla para determinación del fenotipo CD | 44 |
| Figura 3.6 | . Efecto del FT sobre la expresión de marcadores CD4 por linfocitos T de lechón a partir de sangre periférica. Tinción sencilla para determinación del fenotipo CD | 45 |
| Figura 3.7 | Efecto del FT sobre la expresión de marcadores CD8 por linfocitos T de lechón a partir de sangre periférica. Tinción sencilla para determinación del fenotipo CD | 46 |
| Figura 3.8 | Respuesta de anticuerpos IgM detectados en el suero de lechones vacunados | 48 |
| Figura 3.9 | Respuesta de anticuerpos IgA detectada en el suero de lechones vacunados | 49 |
| Figura 3.10 | Porcentaje de cuenta diferencial. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 8 animales por tratamiento \pm la desviación estándar | 50 |
| Figura 3.11 | Porcentaje de ganancia en peso por tratamiento. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 8 animales por tratamiento \pm la desviación estándar | 51 |
| Cuadro 1 | Análisis por citometría de flujo: distribución de poblaciones celulares linfoides que expresan CD2, CD4 y CD8 en sangre periférica, es el comportamiento de treinta y dos lechones estudiados en este experimento | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Con A = Concanavalina A

FT = Factor de Transferencia

FITC = Isotiocianoato de Fluoresceína

IL- = Interleucina

Ig = Inmunoglobulina

IFN α = Interferón alfa

IFN γ = Interferón gamma

NK = Natural Killer (Asesina natural)

OPN = Osteopontina

PBL = Linfocitos de sangre periférica

PHA = Fitohemaglutinina

SSF= Solución salina fisiológica

TcR = Receptor de células T

RESUMEN

La mortalidad en lechones causa enormes pérdidas económicas en la industria porcícola, ello ha propiciado la búsqueda de alternativas terapéuticas que ayuden a disminuir dichas pérdidas. Para alcanzar este fin se ha propuesto el empleo de sustancias que tengan la capacidad de modular el sistema inmunológico, dichas sustancias se denominan "inmunomoduladores". Dentro de estas sustancias se encuentra el Factor de Transferencia (FT) considerado como un agente inmunoterapéutico. En el presente trabajo se investigó el efecto del FT sobre la respuesta inmunológica de lechones de 2 a 28 días de nacidos. Se emplearon 32 lechones híbridos Yorkshire x Landrace que se organizaron en 4 grupos con diferentes tratamientos cada uno de la siguiente forma: grupo A Tratado con SSF (Grupo control), grupo B Tratado con bacterina contra *Mycoplasma Hyopneumoniae*, grupo C Tratado con FT y grupo D Tratado con FT + bacterina. A cada cerdo se le tomaron 5 muestras de sangre con anticoagulante a lo largo de todo el experimento, en los días 2, 7, 16, 21 y 28 de edad, y se determinaron los porcentajes de células que expresaban los marcadores CD2, CD4 y CD8 mediante citometría de flujo. También se midió la respuesta proliferativa de linfocitos separados en gradiente de ficoll y cultivados *in vitro* mediante la incorporación de timidina. Se midieron las concentraciones de anticuerpos IgM e IgA contra *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante la técnica de ELISA. De cada muestra se realizaron conteos diferenciales de las células sanguíneas, también se registró el peso de los animales por semana para evaluar si el tratamiento *in vivo* altera alguno de los parámetros productivos de los cerdos. Se observó que el FT utilizado a las condiciones experimentales propuestas en este trabajo no tuvo efecto en ninguno de los parámetros evaluados, sin embargo, se logró detectar un estado de aparente alteración del sistema inmunológico de los cerdos en el día 21, situación que se ha señalado en trabajos previos como una condición inmunológica cercana al destete y en etapas posdestete.

Las diferencias observadas en los resultados obtenidos aunque no significativas ($p < 0.05$) indican que es necesario continuar con el estudio del efecto del FT modificando las condiciones experimentales, hasta encontrar la dosificación óptima que ofrezca un efecto inmunomodulador satisfactorio, probablemente similar al encontrado en enfermedades infecciosas, inmunodeficiencias y neoplasias en humanos.

ABSTRACT

The mortality in piglets cause enormous economic losses in the pig industry, this has encouraged the search of therapeutic alternatives that helps to reduce such losses. To reach this goal, novel substances with the capacity of acting on the immunological system through immunomodulation mechanism denominated immunomodulators, have been used. Between those substances is the Transfer Factor (FT) wich has been considered as an immunotherapeutic agent.

In this study the effect of the FT was investigated on the immunologic response of piglets from 2 to 28 days of age. 32 Yorkshire x Landrace hybrid pigs were used and distributed into four groups with different treatments as follows: group A 8 Piglets treated with SSF (Control), group B 8 Pigs treated with bacterina against *Mycoplasma hyopneumoniae*. group C 8 Pigs treated with FT and group D 8 Pigs treated with FT + bacterina. Five heparinized blood samples were obtained from each pig along the duration of the study on days 2, 7, 16, 21 and 28. Percentages of cells that expressed the markers CD2, CD4 and CD8 by flow microfluorometry staining were determined. Lymphocyte proliferation were measured *in vitro* using cell cultures separated by ficoll gradient and was counted in a liquid sentillation spectrometer. IgM and IgA antibodies concentration were measured against *Mycoplasma hyopneumoniae* by ELISA. From each blood sample differential counts of blood cells were carried out and the body weight of the animals was registered weekly. Every test was made in order to evaluate if the treatment alters some of the productive parameters of the pigs under study. The FT used under the proposed experimental conditions did not cause an important effect in none of the evaluated parameters, however, it was possible to detect a state of apparent alteration of the immunologic system of the piglets on day 21, situation that has been pointed out in previous studies as an immunologic condition near the weaning age and in the post-weaning period. The differences observed in the results, although were not significant($p < 0.05$), they represent a base that could indicate that it is necessary to continue with the study of the FT

modifying the experimental conditions until the right dose is established and can offer a satisfactory effect probably similar to the one reported in human infectious diseases, immunodeficiencies and malignant neoplasms.

1. INTRODUCCIÓN

La producción porcícola del país enfrenta una serie de problemas que inciden directamente en sus costos, uno de ellos es el que significa la mortalidad y morbilidad en los animales lactantes y destetados en las granjas donde se presentan multitud de problemas, todos ellos relacionados con enfermedades, fundamentalmente, con la inmadurez inmunológica de los cerdos (Vega-López y col., 1993).

La mortalidad neonatal en cerdos es un área de la ciencia que está pobremente entendida y relativamente poco investigada. La industria porcícola está entre las más desarrolladas de todas las industrias de explotación de animales. A pesar de esto, la mortalidad es de cerca del 12% de todos los lechones y esto no se ha alterado substancialmente en los últimos años según los reportes realizados en Estados Unidos (Varley, 1995).

Las principales pérdidas productivas en la industria porcícola se observan principalmente desde el nacimiento hasta el destete (Varley, 1995). La mortalidad y bajo vigor de los cerdos durante el periodo neonatal se reportan en un rango del 8 al 30% con enfermedades neonatales atribuidas a rinitis atrófica, neumonía e infecciones gastrointestinales (English y Morrison, 1984; Tyler y col, 1990).

Existen algunos factores causales de la mortalidad de cerdos, principalmente en el periodo pre-destete destacando: factores humanos como el manejo en la granja, condiciones de higiene, nutrición (inanición y desnutrición), factores inmunológicos (Inmunidad pasiva y activa) factores medioambientales (temperatura, humedad, etc.), factores genéticos (diferencias de raza, tipo híbrido, etc.) y factores físicos (trauma) (Varley, 1995). Dichos factores causales resultan de numerosas interacciones entre el lechón y su nuevo medio ambiente así, la baja inmunocompetencia al nacimiento tiene un impacto significativo sobre la sobrevivencia de los cerdos recién nacidos, la cual es causada, por ejemplo, por una placentación epiteliochorial especializada que no permite el paso de anticuerpos maternos a los fetos y así el cerdo nace sin la seguridad de la protección inmune

pasiva, además, el sistema inmune del lechón recién nacido es también anatómica y funcionalmente inmaduro, siendo usualmente incapaz de montar respuestas inmunológicas intrínsecas efectivas haciéndolo, de esta manera, dependiente de la transferencia pasiva de anticuerpos maternos en calostro y leche (Stokes y Bourne, 1989). Por lo tanto, el cerdo recién nacido es dependiente para sobrevivir del balance entre la inmunidad pasiva y activa durante las primeras semanas de vida, restringiéndose al repertorio de anticuerpos para los cuales la madre haya desarrollado células B de memoria (Porter, 1986). Una respuesta humoral disminuida (Hammerberg y col., 1989) así como la alteración en los mecanismos celulares tales como respuestas mitogénicas bajas (Schwager, 1997) son características en los lechones. Así, los cerdos recién nacidos son especialmente vulnerables al desafío patogénico durante el periodo en el cual los niveles de anticuerpos han declinado en la leche y antes de que los mecanismos inmunes activos se desarrollen (Varley, 1995).

Los lechones se consideran inmunodeficientes cuando se comparan con los adultos, parte de este estado ha sido atribuido a la inmadurez de los compartimentos linfocíticos del sistema inmunológico (Murgita y Wigzell, 1981). Existen muchos factores que pueden contribuir a dicha "inmunodeficiencia", entre ellos está el cambio en las poblaciones de linfocitos T que tienen un papel importante en el control de la respuesta inmunológica. Se ha reportado que la proporción de linfocitos T circulantes es más baja en neonatos que en adultos (Outteridge y Dufty, 1981). La proporción de linfocitos T detectados por diferentes métodos es siempre baja al nacimiento y se incrementa con la edad, hasta que el sistema inmunológico está completamente maduro por lo que los neonatos son particularmente vulnerables a los patógenos (McCauley y Hartmann.,1984).

1.1 Sistema inmunológico del lechón

1.1.1 Inmunidad pasiva

Durante el desarrollo intrauterino, y por un intervalo variable después del nacimiento, la protección inmune de los mamíferos está basada en los componentes maternos adquiridos pasivamente; el principal mecanismo involucra la transferencia de anticuerpos maternos vía placentaria antes del nacimiento o a través del epitelio intestinal después del nacimiento, que es el caso de los cerdos, ya que estos poseen una placentación epiteliochorial especializada que no permite el paso de los anticuerpos maternos (Brambell, 1970; Gaskins y Kelly, 1995).

Al final del embarazo, las células linfoides incluyendo linfocitos T y B originados del denominado sistema mucosal común de la madre se acumulan en la glándula lactífera (Evans y col. 1982) de donde son transferidas vía calostro hacia el tracto digestivo del animal recién nacido (Seeling, 1980). Esto, aunado a que el sistema inmunológico del lechón es anatómicamente y funcionalmente inmaduro lo hace entonces dependiente de la transferencia pasiva de células y de anticuerpos maternos del calostro y la leche para sobrevivir (Stokes y Bourne, 1989; González y col., 1993; Tlaskalova-Hogenova, y col., 1994; Gaskins y Kelly, 1995).

La adquisición de una inmunidad rápida y efectiva en contra de patógenos presentes en el medio es esencial para la supervivencia del lechón. Esta protección proviene exclusivamente del calostro y la leche mientras madura su sistema de defensa (Tlaskalova-Hogenova y col., 1994).

El calostro de la cerda contiene aproximadamente 160 mg/ml de proteína total y de ella, más del 60% es gamaglobulina que representa la inmunidad protectora que la madre le transfiere al lechón; la absorción de gamaglobulina es muy importante en el primer día y posteriormente va disminuyendo absorbiéndose también otro tipo de proteínas (globulinas α y β) en los 2 días siguientes, estos podrían representar factores de maduración (Vega-López y col, 1993).

La proporción de las proteínas plasmáticas del lechón se va modificando de manera importante en la primera semana de vida, a fin de mantener la homeostasis del animal. Al nacimiento, el lechón tiene una baja concentración de proteína circulante (aproximadamente 30 mg/ml) que fundamentalmente consiste en albúmina (28%) y globulinas alfa (25%) y beta (43%). A las 24 horas de vida, la proteína plasmática se eleva a 3 ó 4 veces su concentración original (hasta 100 mg/ml y la proteína predominante es la gamaglobulina (41%) absorbida de calostro, seguida por la beta globulina (39%) y la albúmina (14%). La globulina alfa 1, a la que se la han descrito propiedades inmunosupresoras (**proteínas de inmadurez**), tiene una alta proporción al nacimiento y paulatinamente va desapareciendo siendo casi indetectable al séptimo día de vida, lo que correlaciona con la progresiva maduración del organismo del lechón (Vega- López y col, 1995).

Debido a que los anticuerpos calostrales son la primera fuente de protección inmunológica, entonces, la inmunidad del cerdo recién nacido está limitada por la cantidad y calidad de anticuerpos en calostro y por la cantidad que el neonato es capaz de consumir y absorber (Holland, 1990). Sin embargo, el repertorio de anticuerpos inicial del recién nacido está restringido a aquellos antígenos para los cuales la cerda ha desarrollado células B de memoria (Porter, 1986; Chappuis, 1998).

La absorción máxima de inmunoglobulinas en el intestino del lechón ocurre durante las primeras 4-12 horas después del nacimiento. Las inmunoglobulinas son absorbidas a través del epitelio yeyunal por los vasos linfáticos y entran a circulación por el conducto torácico (Weström y col., 1985; Porter, 1986). En general, la permeabilidad es más alta inmediatamente después del nacimiento y declina rápidamente dentro de las primeras 24 horas ya que existe maduración de las células intestinales, así como el establecimiento de la flora intestinal (Chappuis, 1998).

La IgG constituye el principal isotipo de inmunoglobulina en el suero, por lo tanto, el isotipo predominante en el calostro es también IgG; esta inmunidad pasiva está limitada por el hecho que muchos de los agentes patógenos enfrentados por el recién nacido se encuentran en la superficie mucosal donde los

anticuerpos IgG están raramente presente y no son efectivos. Quizá, en respuesta a esta limitación, las concentraciones de IgG decrecen rápidamente y la IgA llega a ser el principal isotipo en la leche de la cerda. Esta IgA resiste la degradación intestinal y provee de protección entérica a corto plazo, a pesar de esto, hasta que los mecanismos inmunológicos activos se establecen, el recién nacido está protegido solo contra aquellos antígenos para los que la cerda ha desarrollado previamente inmunidad. Así, hay un periodo corto pero crítico después del nacimiento cuando la alimentación con calostro de la cerda es crucial para la futura sobrevivencia de los lechones en las etapas siguientes de su desarrollo (Roth, 1999 ; Zimmerman y col., 2000).

El destete representa un cambio agudo en la fisiología del animal, pues aunado al retiro de los elementos protectores de la leche materna, hay un cambio drástico en la alimentación y un estrés causado por las nuevas condiciones ambientales a las que es sometido al animal. Este procedimiento en lechones jóvenes de 3 semanas de edad se asocia frecuentemente con el incremento de la susceptibilidad a alteraciones intestinales (diarrea post-destete) y una reducción en el crecimiento del animal (Rivera y col., 1978). El nivel de inmunoglobulinas séricas adquirido del calostro declina a la tercera semana de nacimiento (Curtis y Bourne, 1971). Además, la IgA intestinal local, derivada de la leche materna, se retira al momento del destete. Inmediatamente después de que los lechones son destetados muestran una habilidad reducida para reaccionar con el mitógeno para linfocitos fitohemaglutinina (PHA), tanto en reacciones intradérmicas o cuando los linfocitos son aislados para posteriormente cultivarlos *in vitro* (Blecha y col., 1983). También se ha reportado que la producción de anticuerpos específicos contra eritrocitos de carnero es menor en los lechones inoculados después de un día de destete comparados con los que tenían 2 semanas de destetados; esta aparente inmunosupresión sistémica puede estar involucrada en la etiología de la diarrea post-destete (Blecha y Kelly, 1981).

La inmunización sistémica pasiva no presenta ventaja para evitar infecciones del sistema digestivo. Las madres deben ser repetidamente vacunadas para que

puedan transferir el calostro y la leche, tan ricos como sea posible de inmunoglobulinas y de esta forma resulte la inmunidad lactogénica (Bohl y Saif, 1980).

1.1.2 Características de las inmunoglobulinas del cerdo

Las 6 capas de placentación epiteliochorial de el cerdo previenen el paso de inmunoglobulinas maternas hacia el feto y la ausencia de los trofoblastos para invadir tejido maternal probablemente signifique que incluso pequeños péptidos maternas no sean transferidos hacia el feto. Así, la fisiología materno-feto-neonatal influye en la distribución de inmunoglobulinas en los fluidos corporales y probablemente también en el desarrollo de células B. El aislamiento y caracterización de las principales inmunoglobulinas porcinas ocurrió en la mitad de 1960. Como en otros mamíferos, la IgG es la principal inmunoglobulina en suero y las cadenas γ , μ , α , λ y κ son similares en tamaño y peso molecular a sus homólogos en otros mamíferos. Existe evidencia de que la IgA sérica en cerdos es dimérica (Curtis y Bourne, 1971) en vez de monomérica como en humanos (Zimmerman y col., 2000).

No existe evidencia de la existencia de subclases de IgM e IgA para cerdo, aunque se han reportado alotipos de IgM . Estudios de anafilaxia pasiva cutánea sugieren la presencia de IgE, así como también estudios de liberación de histamina *in vitro* y los niveles elevados de Ig en suero en cerdos infectados con parásitos. La evidencia de una IgD putativa esta basada sobre el reconocimiento de un antígeno en la superficie celular usando anti- IgD humana (Butler y Brown, 1994).

1.1.3 Distribución fisiológica de las inmunoglobulinas de cerdo y células que secretan inmunoglobulinas

La IgG es la predominante en el suero porcino, pero también predomina en calostro. La IgG comprende cerca del 80% de las Igs en suero y el 80% de Igs en calostro. La IgG representa del 20-30% de las Igs en leche, aunque un amplio rango de niveles se ha observado con diferencias atribuibles a la edad, medio ambiente, estado de lactancia, diferencias individuales y de gestación (Klobasa y col., 1986).

La IgA comprende cerca del 3% de inmunoglobulinas en suero, 14% de Igs calostrales, pero 82% de inmunoglobulinas en leche, mientras que la IgM comprende cerca del 14% del total de inmunoglobulinas en suero pero 5-6% de inmunoglobulinas calostrales y 18% de inmunoglobulinas en leche (Butler y Beown, 1994).

Las células que contienen inmunoglobulinas son escasas o ausentes en el intestino del recién nacido, aunque IgM de superficie e IgA, pero no IgG están presentes en placas de Peyer. Así la IgM e IgA juegan un papel muy importante en el intestino del cerdo (Bianchi y col., 1992).

Las inmunoglobulinas absorbidas después de la ingestión de calostro es casi la fuente exclusiva de inmunoglobulinas en el suero de los lechones.

La composición de las secreciones lácteas cambia drásticamente durante la primera semana; en particular la IgA reemplaza a la IgG como la principal inmunoglobulina; por lo tanto la leche transfiere la experiencia inmunológica local (mucosal) de la madre mediante la IgA. La IgA también predomina sobre la IgG en secreciones nasales y traqueales por más de 24:1, mientras que la proporción en el tracto respiratorio bajo es de 0.7:1 (Butler y Brown, 1994).

1.1.4 Estructura del sistema inmunológico de los cerdos

En el cerdo, como en todos los mamíferos, la inmunidad activa puede ser conceptualizada como una serie de mecanismos extremadamente complejos que han evolucionado de acuerdo a la naturaleza de los agentes patógenos que atacan esta especie (Gaskins y Kelly, 1995).

Los tejidos linfoides secundarios en el cerdo, muestran algunas propiedades distintivas en su estructura y fisiología. El sistema inmunológico porcino consta de tres compartimientos funcionales: 1) tejido linfoide asociado a epitelios, especialmente mucosas, donde se encuentran los 4 tipos de placas de Peyer (PP), los tres tipos de amígdalas, el tejido linfoide asociado a bronquios y tejidos similares en otras superficies, 2) los ganglios linfáticos (GL) que drenan la linfa de otros tejidos y 3) el bazo el cual actúa como un ganglio linfático para el torrente sanguíneo. Estos órganos linfoides representan los sitios de captura más eficientes de material antigénico, la presentación se da principalmente a linfocitos de fenotipo CD45 RA/C por las células dendríticas con moléculas clase II encontradas en la piel, células de Langerhans, y células interdigitales en el tejido linfoide intrafolicular y células dendríticas foliculares (Rothkötter y col., 1991; Binns y Pabst, 1994).

Las amígdalas palatinas y placas de Peyer son los principales sitios inductores del MALT, los cuales juegan un papel primordial en el desarrollo de la inmunidad protectora contra agentes infecciosos y en la regulación de la respuesta inmunológica a antígenos de la dieta y medio ambiente (Zuckerman y Gaskins, 1996).

Diversos estudios han revelado la existencia de tres principales familias de linfocitos de sangre periférica de cerdos (PBL), las células B, células T y células Nulas o "Null". Estas familias de PBL han sido definidas identificando IgM de superficie para las células B, el receptor de eritrocitos de borrego CD2 para células T clásicas (Lunney y col., 1994) y la tercera familia, sIg- CD2- población "Null" que se caracteriza por su carencia de todos los marcadores (Binns, 1982, Licence y col., 1995; Zuckermann y Husmann, 1996).

Los cerdos jóvenes tienen altas cuentas de linfocitos comparadas con otros mamíferos (Aprox. 10^7 /ml). Arriba del 50% de estos linfocitos sanguíneos son células Null, las cuales carecen de todos los marcadores de superficie específicos para poblaciones linfocitarias (Binns, 1982). Las células Null presentan la peculiaridad de que no responden a mitógenos (Outteridge y col., 1982), no intervienen en respuestas de anticuerpos o citotoxicidad celular *in vitro* (Binns, 1982) y no recirculan (Binns y col., 1988).

El papel funcional y destino de esta gran población de linfocitos T null es completamente desconocido. La citotoxicidad espontánea de linfocitos de sangre para tumores o células infectadas con virus, ha sido descrita en algunas especies incluyendo al cerdo (Kim y Ichimura, 1986). Esto permite involucrar posiblemente a las células Null como células asesinas (NK) con una función potencialmente protectora en la sangre. Las poblaciones Null y NK⁺ en sangre de cerdos jóvenes claramente difieren de aquellas en la mayoría de otras especies porque i) la sangre contiene una inusual alta proporción de células Null ii) porque la actividad de células NK se encuentra predominantemente en pequeños linfocitos no granulados iii) Se muestra que las células Null son precursores de una población de células NK que se producen con un estímulo apropiado *in vivo* o *in vitro* (Pinto y Ferguson, 1988).

Es normal la coexpresión del marcador CD2 con CD4 o CD8, el 90% de linfocitos T periféricos expresan CD4 y/o CD8, sin embargo, se ha establecido que aproximadamente el 25% de los linfocitos T periféricos en el cerdo expresan los antígenos CD4 y CD8 al mismo tiempo, una situación que se encuentra solo en condiciones patológicas en el humano. Otra característica de las células T en el cerdo es que en comparación con el hombre, se puede detectar una proporción inversa de CD4/CD8, teniendo 25% de CD4 y 40% de CD8 lo que resulta en una proporción de 0.60 comparada con 1.5-2.0 en humanos (Pescovitz y col., 1985).

En resumen, las células T del cerdo presentan algunas propiedades exclusivas: 1) un alto porcentaje de células CD4⁺CD8⁺ doble positivas; 2) la proporción CD4⁺/ CD8⁺ es más baja que en otras especies; y 3) las células CD8⁺

expresan antígenos clase II. La significancia funcional de estas diferencias en las células T es aún desconocida (Lunney y Pescovitz, 1987).

1.1.5 Expresión de CD2 sobre linfocitos T porcinos

Como en otras especies, el análogo de CD2 porcino se caracteriza por su habilidad de unirse a eritrocitos xenogénicos (Hammerberg y Schuring, 1986), cerca del 10-50% de los linfocitos muestran el fenotipo CD2⁻ SWC⁺, esta subpoblación de linfocitos ha sido identificada como células Null porcinas (Binns y col., 1988). El cerdo posee el único ejemplo de linfocitos T extratímicos CD2⁺CD4⁺CD8⁺ y también el único ejemplo de subclases de CD2⁺ y CD2⁻ de linfocitos T CD4⁺CD8⁻ con la propiedad de migrar a tejidos linfoides (Zuckermann y Husmann, 1996).

La subclase de linfocitos CD2⁻ contiene una considerable cantidad de células que expresan en su superficie TcR γ/δ (Hirt y col., 1990; Thome y col., 1994).

1.1.6 Expresión de CD4 y CD8 sobre linfocitos T porcinos

Se ha establecido que del 5-30% de linfocitos T no expresan CD4 ó CD8 y estos se consideran progenitores tímicos, se contemplan 2 fracciones con el fenotipo de linfocitos T maduros, las cuales representan CD4⁺ CD8⁻ (2-18%) y CD4⁻ CD8⁺ (3-20%), la mayoría de los linfocitos porcinos pertenecen al fenotipo CD4⁺ CD8⁺ (36-90%). Las cuatro subpoblaciones se encuentran no solo en sangre periférica, sino también son predominantes en linfocitos T derivados de tejido linfoide (Saalmüller y col., 1989, 1994).

Nada se conoce acerca de la función *in vivo* e *in vitro* de la subpoblación de linfocitos CD4⁻CD8⁻. Sin embargo acerca de la subpoblación CD4⁺ CD8⁺ se ha establecido que se encuentran en la fracción de células T cooperadoras (Saalmüller y col. 1994), lo que podría indicar que esta subpoblación extratímica contiene células de memoria (Pescovitz y col., 1994, Saalmüller y col., 1994, Zuckerman y col., 1996).

Debido a la abundancia de los linfocitos doble positivos (DP) en la sangre periférica del cerdo es importante entender la significancia biológica de esta

subpoblación no convencional. Las células DP están normalmente presentes en el bazo, ganglios linfáticos y amígdalas en cerdo adulto. Estos datos son consistentes con la hipótesis de que esta población en el cerdo adulto incluye células T de memoria/efectora (Zuckerman y col., 1996).

Las células T doble negativas (DN), podrían ser células indiferenciadas que realizarían su maduración final en el intestino, donde el medio ambiente (dieta, estrés) podrían afectar su desarrollo (Vega López y col.,1995).

1.1.7 Células efectoras de la respuesta innata

Las principales células efectoras de la respuesta innata son los neutrófilos, macrófagos y las NK (Natural Killer) que son células cuya función es la citotoxicidad natural (Roth, 1999).

El neutrófilo del lechón es un potente efector celular de la citotoxicidad mediada por células. Así, en combinación con anticuerpos específicos de las inmunoglobulinas transferidas pasivamente, el neutrófilo juega un papel importante en la protección de la inmunodeficiencia relativa del lechón. Se reporta una ligera linfopenia B en los primeros 5 días después del nacimiento, la cual cambia a una linfocitosis después del destete (McCauley y Hartmann, 1984).

Finalmente, el desarrollo de la competencia funcional ocurre en paralelo con cambios en la estructura y composición de los elementos celulares del sistema inmunológico. Durante la ontogenia de las funciones inmunes, las interleucinas y citocinas son de importancia crucial para la maduración y diferenciación de los linfocitos T y linfocitos B (Fitch y col., 1993).

1.1.8 Desarrollo de la inmunidad activa

Los estudios dirigidos a evaluar el desarrollo de la inmunidad activa del cerdo indican que hay una reducida cantidad de células efectoras y una respuesta disminuida, lo que explica en parte la inmunodeficiencia de los cerdos jóvenes (Gaskins y Kelley, 1995)

La actividad leucocitaria durante las etapas tempranas de la vida del lechón, esta influenciada por los niveles de cortisol, prostaglandinas, leucotrienos y péptidos vasoactivos intestinales, por lo que algunos investigadores sugieren que el sistema inmunológico del neonato se encuentra "deprimido" más que inmaduro (Hoskinson y col., 1990)

Una gran proporción de células linfoides carece de los marcadores clásicos de linfocitos T y B, esta población no responde en cultivo con PHA o Con A ni tampoco a estímulos antigénicos, una proporción de estas células presenta TcR $\gamma\delta$ (Schwager y Schulze, 1997).

La respuesta humoral de los cerdos neonatos es deficiente hasta la cuarta semana de vida y demuestran tener una escasa producción de inmunoglobulinas *in vivo* por la inoculación de un antígeno T dependiente (lisozima de huevo), así como *in vitro* ante la estimulación con mitógeno de fitolaca americana, una lectina activadora de células B (pokeweed mitogen). Sin embargo, los linfocitos B son totalmente competentes si se les administra altas dosis del antígeno o si se enfrentan a antígenos timo independientes. La escasa respuesta humoral *in vivo*, quizá se debe a una sutil deficiencia en la cooperación con las células T (Hammerberg y col., 1987; Schwager y Schulze, 1997).

La proporción de linfocitos T y B maduros está disminuida durante la primera semana de vida y las células circulantes tienen una pobre capacidad de producir interleucinas y responder a mitógenos. La producción de IL-2 por células activadas con Con A está virtualmente ausente en los cerdos recién nacidos, mientras que a las 2 ó 3 semanas de vida ya se producen altas concentraciones de esta interleucina por los linfocitos T activados. En contraste, la IL-6 se produce en

la primera o segunda semana, por las células T activadas del sistema inmunológico del neonato. La IL-6 actúa en la activación y diferenciación de linfocitos T y B al igual que en la diferenciación de células hematopoyéticas (Schwager y Schulze, 1997).

En lo que respecta a los linfocitos T se ha encontrado una deficiencia en el número total de células (Hammerberg y col., 1987) y en cuanto a los dobles positivos, a la semana de nacidos representa menos del 2% del total de la población de linfocitos, al mes alcanza 4.6% y la población sigue aumentando hasta constituir 10% de los linfocitos de la sangre en cerdos de 5 meses y 15% en cerdos de 12 a 20 meses (Zuckermann y Husmann, 1996).

A diferencia de los linfocitos, los macrófagos, monocitos y granulocitos al nacimiento tienen totalmente desarrollada la capacidad de activarse durante la fagocitosis y liberar grandes cantidades de intermediarios reactivos de oxígeno que matan a los patógenos fagocitados, esta capacidad permanece constante hasta la semana 6 ó 7 (Schwager y Schulze, 1997).

En muchos casos, las enfermedades neonatales de los cerdos causan graves pérdidas económicas. Generalmente el animal neonato es deficiente para montar una respuesta inmunológica efectiva, pero desarrolla esta capacidad en las primeras semanas de vida; se sugiere que en esta etapa los lechones tienen un sistema inmunológico deprimido como mencionó Hoskinson en 1990 (Hoskinson y col., 1990; Vega-López y col., 1993).

Cualquier deficiencia de parte del lechón para montar una respuesta inmunológica efectiva los predispone a sufrir enfermedades infecciosas, el periodo de mayor susceptibilidad abarca las tres o cuatro semanas de vida, donde los mecanismos específicos celulares pueden estar deficientes ya sea por inmadurez o bien por la influencia de algunas sustancias fisiológicas, lo cual podría indicar una inmunosupresión transitoria debida al estrés de los animales en esta etapa de la vida que abarca nacimiento-lactancia-destete (Schwager y Schulze, 1997).

1.2 Inmunomoduladores

Se ha tratado por varios medios de hacer a los lechones menos susceptibles a las enfermedades en el periodo de la lactancia, ya sea estimulando tempranamente su sistema inmunológico por medio de adyuvantes oleosos, favoreciendo la colonización de su tracto digestivo por microorganismos saprófitos con acidificantes o lactobacilos o estimulando la absorción del calostro materno con suero sanguíneo oral. Los resultados obtenidos con estos tratamientos han sido variables pues en ocasiones son magníficos ya que los lechones, tienen más vigor, ganan más peso, tienen menos diarreas, mayor concentración de proteínas plasmáticas y más gammaglobulina circulante, sin embargo, a veces no ha sido posible detectar ninguno de estos efectos benéficos en los animales tratados. Al parecer, esta variabilidad en los resultados puede deberse a la influencia que las condiciones externas ejercen en los animales, es decir, cuando las condiciones ambientales de las granjas son aceptables, los tratamientos dados a los lechones funcionan bien y mejoran su estado general y en consecuencia su rendimiento. Cuando estas condiciones no son adecuadas los factores internos relativos al animal (homeostasis, nutrición, estado inmunológico, etc.), no pueden modificarse substancialmente por los tratamientos y por ello no se ven resultados satisfactorios (Vega-López y col., 1993).

De acuerdo a las condiciones ambientales de la granja en donde se encuentren los animales durante las primeras semanas de edad puede existir un aumento notable en la mortalidad y morbilidad de los lechones debido a que sus mecanismos adaptativos de defensa contra agentes externos no funcionan eficazmente (González Vega y col., 1993). Una posible solución para este problema es la administración de sustancias exógenas que puedan aumentar la respuesta inmunológica e incrementar la resistencia a infecciones. Los inmunomoduladores son sustancias de varios orígenes que tienen la capacidad de regular o modular una respuesta inmunológica, este término implica que dichas sustancias pueden incrementar, disminuir o suprimir una respuesta inmunológica. Otros sinónimos

para inmunomoduladores incluye: inmunoestimulantes, inmunopotenciadores y modificadores de la respuesta biológica. Algunos autores han compilado listas y estructuras químicas y han propuesto modos de acción de inmunomoduladores para su uso en animales domésticos de granja. (Mulcahy y Quinn, 1986; Blecha, 1988). Sin embargo, la aplicación terapéutica de drogas inmunomoduladoras en medicina veterinaria es aún limitada por los conocimientos incompletos de los efectos que producen y por lo tanto su potencial benéfico en general no ha sido completamente evaluado, aunque ya se han estudiado algunas funciones inmunológicas alteradas en el periodo perinatal en lechones. (Magnusson y Fossum, 1988).

Actualmente el interés en el tema de los inmunomoduladores se ha incrementado en el campo de las enfermedades infecciosas, terapia de cáncer, tratamiento de enfermedades autoinmunes tecnología de trasplantes y en medicina veterinaria (Mulcahy y Quinn, 1986; Fudenberger y Pizza, 1993).

El término inmunomodulación se emplea generalmente para describir la manipulación farmacológica, del estado de actividad del sistema inmunológico. Esta puede involucrar un incremento en la magnitud de la respuesta inmunológica "inmunoestimulación" o una disminución en la magnitud "inmunosupresión"; la inmunomodulación específica implica el cambio en la respuesta del sistema a un estímulo antigénico particular como el proceso de vacunación (inmunoestimulación específica) y desensibilización (inmunosupresión específica) (Mulcahy y Quinn, 1986).

Es claro que la manipulación farmacológica de cualquiera de los componentes puede modular la actividad del sistema inmunológico, sin embargo porque muchas de las drogas inmunomoduladoras disponibles actúan sobre más de un tipo de células activas inmunológicamente, el efecto puede depender del grado relativo de alteración de varios de los componentes (Mulcahy y Quinn, 1986).

1.2.1 Clasificación de los inmunomoduladores

Los inmunomoduladores se clasifican de acuerdo a su origen y Poli (1984) los ha categorizado como a) productos biológicos y b) inmunomoduladores químicos. Esta clasificación puede sustituirse por tres categorías definidas i) productos fisiológicos, ii) sustancias de origen microbiano y iii) compuestos sintéticos. Los dos primeros pueden a su vez considerarse dentro de los modificadores biológicos.

1.2.2 Modo de acción general de los inmunomoduladores

Tantas teorías de acción de inmunomoduladores se han propuesto como inmunomoduladores se han descrito, sin embargo no han sido elucidadas aunque se han avanzado pasos individuales en los mecanismos de acción de algunas drogas. En algunos casos, como el factor tímico humora, timopoyetina o factor de transferencia, es posible relacionar cambios en niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos en células inmunológicamente activas que provocan la alteración directa o indirectamente. En una revisión realizada por Coffey y Hadden (1985), se enlistaron sustancias fisiológicas y sintéticas que actúan sobre receptores de membrana de linfocitos, afectando los niveles de cAMP y cGMP dentro de las células involucradas.

1.2.3 Efectos de inmunomoduladores fisiológicamente importantes. Modificadores biológicos

La modulación fisiológica del sistema inmunológico puede involucrar mediadores locales secretados por células inmunológicamente activas que también pueden influenciar otras células en el mismo ambiente.

Estos mediadores locales son producidos por células del organismo tales como las del sistema inmunológico e incluyen las sustancias denominadas citocinas y miembros de la familia de los icosanoides (metabolitos del ácido araquidónico,

Ej. prostaglandinas), ambos de los cuales son modificadores biológicos de la respuesta altamente activos. La producción y liberación de estos mediadores locales son influenciadas por hormonas, interacciones celulares y estimulación antigénica. (Mulcahy y Quinn, 1986).

1.2.3.1 Hormonas tímicas. Las hormonas enlistadas por Coffey y Hadden (1985) incluyen timosina fracción-V, timosina $\alpha 1$, timopoyetina, factor tímico humoral y factor tímico sérico. De éstas, el factor tímico humoral incrementa el cAMP intracelular de los linfocitos y la timopoyetina y timosina fracción-V incrementan el cGMP

1.2.3.2 Citocinas. Un problema recurrente en el estudio o uso de citocinas, era el hecho de que su alta potencia biológica implica que incluso pequeñas cantidades son capaces de producir efectos celulares. Por lo tanto resultaba difícil definir si la actividad del preparado crudo era debida al factor que se investigaba (Mulcahy y Quinn, 1986). Ahora, la disponibilidad de citocinas purificadas ha fomentado la realización de estudios más definidos que tienen la finalidad de intervenir en la regulación del sistema inmunológico para incrementar o mejorar el estado inmunológico del animal. Aunque algunas citocinas porcinas ya han sido clonadas, los estudios para evaluar el empleo *in vivo* de citocinas en cerdos tienen todavía algunas limitaciones (Murtaugh, 1994).

En general, la inmunomodulación a través del uso de citocinas es empleada para corregir el estado inmunológico de los cerdos en diferentes etapas de la producción ya que se ha observado que estas poseen una importante función regulatoria tanto en estados de homeostasis como en alteraciones del estado del animal (Blecha, 1997).

Similar a otros sistemas biológicos, las proteínas producidas por las células del sistema inmunológico interactúan con receptores celulares y son esenciales para regular y modificar la reactividad inmunológica. Cuatro citocinas han sido utilizadas para investigar la capacidad de incrementar respuesta inmunológica o resistencia a enfermedades en el cerdo: IFN- α , IFN- γ , IL-1 e IL-2. Además, la

influencia fisiológica de la administración de citocinas proinflamatorias, tales como: IL-1, IL-6 y IFN- α en cerdos ha sido también estudiada (Murtaugh, 1994).

1.2.3.3 Interferón. Debido a que los glucocorticoides están asociados con el estrés y el incremento de la susceptibilidad a enfermedades, el modelo de inmunosupresión con glucocorticoides se ha empleado para evaluar la inmunomodulación por citocinas, estudiando el efecto inmunomodulador del interferón- γ porcino recombinante (rPoIFN- γ) en cerdos deprimidos inmunológicamente con glucocorticoides sugiriendo que la terapia con IFN- γ puede ser efectiva en cerdos inmunosuprimidos (Sauliner y col., 1991).

1.2.3.4 Interleucina-1 La función de los neutrófilos es baja en los cerdos neonatos. Se sugiere que la IL-1 puede inducir granulopoyesis, incrementando selectivamente la actividad antimicrobial de los neutrófilos y promoviendo la resistencia a la infección estreptococal en cerdos neonatales. Así, los defectos en la inmunidad no específica, asociados con la edad o el destete temprano pueden ser mejorados con la administración de IL-1 (Nakajima y col., 1992).

1.2.3.5 Interleucina-2. Algunos estudios *in vitro* han mostrado que la interleucina-2 humana recombinante (rHuIL-2) aumenta la respuesta proliferativa de linfocitos porcinos y la actividad de células NK (Nakajima y col., 1992). Blecha y col., en 1995 encontraron que en cerdos inyectados por 3 días consecutivos con interleucina-2 de bovino recombinante (rBoIL-2) se incrementa la actividad de células NK.

1.2.3.6 Interleucina-6. El tratamiento diario con IL-6 incrementa la concentración sérica de proteínas de fase aguda, haptoglobina y disminuye la concentración de zinc en suero. Estas respuestas están caracterizadas por las propiedades proinflamatorias de esta citocina multifuncional (Blecha y col., 1995).

En conclusión, citocinas tales como IFN- α , IFN- γ , IL-1 e IL-2 han mostrado su influencia en respuestas inmunológicas específicas y no específicas, sin embargo, pocas citocinas porcinas han sido usadas en cerdos *in vivo*.

1.2.4 Compuestos sintéticos con efectos inmunomoduladores

El conocimiento de la farmacodinamia de esta clase de compuestos es limitado debido al incompleto entendimiento de la inmunorregulación fisiológica.

1.2.4.1 Levamisol y Tiabendazol

El levamisol y tiabendazol, dos antihelmínticos comúnmente usados en ganado y cerdos también se han estudiado ampliamente como inmunomoduladores. La capacidad inmunomoduladora del levamisol fue reportada primero por Renoux y Renoux (1984). El levamisol claramente es un inmunopotenciador, sin embargo, la eficacia del levamisol en ganado y cerdos depende de la condición del animal (con más eficacia en animales estresados o inmunocomprometidos) (Brunner y Muscoplat, 1980). El levamisol disminuye la respuesta primaria de anticuerpos e incrementa la respuesta secundaria a eritrocitos de carnero en cerdos y normaliza la respuesta inmunológica celular en cerdos criados artificialmente (Hennessy y col., 1987).

1.2.4.2 Imutiol

El dietilditiocarbamato sodico (imutiol) es un inmunomodulador que ha mostrado efectos estimulatorios marcados sobre la función de linfocitos T *in vivo* (Renoux y Renoux, 1984). Las propiedades inmunoestimuladoras del imutiol sugieren que este compuesto pudiera ser un efectivo agente inmunoterapéutico en cerdos destetados. La literatura sugiere que el imutiol induce un incremento en la respuesta proliferativa y producción de IL-2 de linfocitos. Sin embargo, la estimulación de la blastogénesis se ha reportado que es retrasada o seguida de un periodo inicial de supresión. La razón del efecto inhibitorio del imutiol en cerdos destetados no esta clara aún (Chung y col., 1985).

La forma comercial de imutiol, **Inmodulen®** se ha probado en cerdos y ha mostrado tener una actividad co-estimuladora en la activación de

monocitos/macrófagos debido a una expresión de citocinas proinflamatorias (Álvarez y col., 1998).

1.2.5 Aplicaciones clínicas de algunos inmunomoduladores en medicina veterinaria

El énfasis en la manipulación inmunofarmacológica en humanos ha sido notorio en áreas como inmunoterapia de enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedades autoinmunes y trasplantes de órganos (Fudenberg y Pizza, 1993). Las dos primeras áreas pueden ser importantes en la práctica de la medicina veterinaria, ya que la inmunomodulación a través del uso de drogas para incrementar la resistencia no específica en animales de granja tiene un gran potencial. Con lo anterior se puede minimizar los efectos deletéreos impuestos por los modernos sistemas intensivos de producción (Mulcahy y Quin, 1986).

En general, el tratamiento clínico con levamisol tanto en medicina humana como en veterinaria, ha demostrado que tiene efecto en las variables inmunológicas celulares, no así sobre la producción de anticuerpos. Sin embargo hubo supresión en la respuesta primaria de anticuerpos cuando el levamisol fue administrado junto con o después del antígeno. Esto ha sido demostrado por Reynero y col. (1979).

En un trabajo, Flesh y col. (1982) encuentran efectos benéficos del levamisol en el manejo rutinario de becerros jóvenes, donde se observó disminución de bronconeumonía y diarrea.

El efecto del levamisol sobre el sistema inmunológico de aves fue investigado por Confer y Aldinger (1981) quienes reportaron incremento de las respuestas proliferativas a PHA en linfocitos de pollo. El uso prolongado del levamisol como inmunomodulador presenta efectos secundarios o adversos tales como granulocitopenia (Brunner y Muscoplat, 1980).

Se han buscado alternativas para proteger a los animales durante la lactancia; una de ellas es la complementación del calostro por medio de la

administración de inmunoglobulinas (López, 1989). Otra alternativa es la aplicación del FT en los momentos posteriores al nacimiento (Vega, 1989).

Mateos y col. (1992), reportaron un incremento en la respuesta leucocitaria de becerros lactantes tratados con factor de transferencia, lo cual se reflejó también en una disminución importante en la incidencia de diarreas y neumonías. Por su parte, Flores y col. (1992), señalan que cuando administraron el producto a becerros lactantes clínicamente enfermos, hubo una disminución en el número de días en que los becerros eran afectados por diarreas y neumonías.

1.2.6 Limitaciones de los inmunomoduladores

Muchos de los inmunomoduladores actualmente disponibles fueron descubiertos fortuitamente y comparten características que limitan su aplicación terapéutica. Estas pueden resumirse como sigue:

- i) La acción de los inmunomoduladores no es específica para tipos o subclases celulares.
- ii) Dosificaciones inapropiadas pueden producir resultados equivocados o incluso reacciones indeseables.
- iii) La regulación de la administración de la droga es crítica así que la eficacia del inmunomodulador varía con el ciclo de crecimiento de la célula blanco.
- iv) Son comunes efectos adversos o secundarios.
- v) Son considerables las variaciones individuales en la respuesta hacia un inmunomodulador.
- vi) En algunos casos en donde enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencias están comenzando, podría ser un peligro el mal uso de inmunomoduladores debido a una exacerbación de la condición.
- vii) No se han identificado efectos a largo plazo de algunos inmunomoduladores (Mulcahy y Quinn, 1986).

1.3 Factor de Transferencia (FT)

En 1949 Lawrence demostró que era posible transferir la respuesta inmunológica celular (RIC) en humanos, abriendo con esto nuevas ramas en la investigación y el inicio en el desarrollo de nuevas formas de inmunoterapia. En 1955, encontró que la hipersensibilidad cutánea tardía o DTH podía ser transferida utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 ml de sangre total. Al componente activo de estos extractos celulares se le llamó **factor de transferencia** (FT). Debido a sus características el factor de transferencia se considera como un potente agente inmunoterapéutico principalmente en estados de inmunodeficiencia mediada por células (Lawrence, 1955).

En la década de los 80 se realizaron numerosos estudios clínicos del efecto del FT en diversos padecimientos observándose en la mayoría de ellos efectos benéficos (Fudenberg y Pizza, 1993).

1.3.1 Definición de FT

El FT es un agente inmunoterapéutico derivado de una estirpe de leucocitos de la sangre (linfocitos T) que se define de las siguientes maneras:

- Extracto soluble de leucocitos de 20 ml de sangre capaz de transferir inmunidad (Fudenberg, 1989).
- Familia de moléculas hidrofílicas altamente polares de bajo peso molecular, las cuales son producidas en pequeñas cantidades por células linfoides y que poseen una potente actividad biológica (Kirkpatrick y col., 1992).
- El FT es una familia de péptidos proveniente de donadores inmunes que transfieren la respuesta de linfocitos T de una manera antígeno específica. Este trabajo se basa en la hipótesis de que el mecanismo de acción del FT sea la educación del sistema inmunológico para producir una clase de citocinas en respuesta a una estimulación antigénica (Kirkpatrick y col., 1992, 1993).

1.3.2 Características generales del FT

- Todos los FT son moléculas de bajo peso molecular entre 3,500 y 6,000 Daltons (Kirkpatrick; 1993).
- El FT es lábil al calor, pero estable al frío, puede ser almacenado por varios años a temperaturas entre -20°C y -70°C.
- El FT inmunológicamente específico no es inmunoglobulina, ni es inmunogénico; transforma linfocitos normales (no sensibles) *in vitro* e *in vivo* para que respondan al antígeno. (Padierna, Velasco y Estrada, 1967; Arala y Fundenberg, 1976; Fernandez, 1985).
- Una unidad internacional de FT se define como la cantidad derivada del extracto de 5×10^8 leucocitos colocada en un volumen final de 1ml o bien, una unidad de FT es aquella que se obtiene de los leucocitos de medio litro de sangre de un sujeto sano (Kirkpatrick y col. 1985).
- Poco se conoce acerca de la naturaleza molecular o el mecanismo de acción del FT. La molécula que da el efecto específico al FT parecen ser polipéptidos con peso molecular de 5000 Daltons. Esta se une a antígenos en una manera específica, esto fue demostrado por Kirkpatrick quien establece que el FT puede unirse específicamente al antígeno que le dio origen. Para ello empleó FT obtenido de ratones sensibilizados con ferritina, posteriormente incubó los dializados en superficies plásticas cubiertas con ferritina observando que, al recuperar el extracto, éste perdía su capacidad de transferir DTH. La actividad específica puede ser recuperada eluyendo el FT con urea 8M o acetonitrilo (Charles y Kirkpatrick, 1989 ;Kirkpatrick y col., 1985,1992,1993).
- Utilizando cromatografía de permeación en gel (Sephadex G-15) antes y después de pasarlo por columnas de cromatografía de afinidad en columnas con m-aminofenil y ácido borónico inmovilizado, se descubrió que el material conteniendo un grupo cis-diol podría ser el responsable de la actividad funcional del FT (Kirkpatrick, 1993) .

- Lo más reciente acerca del FT es que Kirkpatrick consiguió purificar y secuenciar FT murino y bovino. La secuencia obtenida LLYAQDL/VEDN se encontraba presente en todos los FT analizados, sin embargo, estos no son capaces de transferir DTH por sí solos, lo cual indica que no son suficientes para generar las propiedades inmunológicas que el FT produce (Kirkpatrick, 2000).

1.3.3 Estructura química del FT

La mayoría de los estudios realizados indican que el FT contiene pequeñas cadenas de ribonucleótidos unidos a péptidos, originando una estructura de oligorribonucleopéptido. Hubo cierta discrepancia entre diversos investigadores de todo el mundo en lo que se refería a esta estructura, llegándose a la conclusión de que dependía de la forma en la que se obtuviese el FT. Tal parece que el péptido y el oligorribonucleótido se unen *in vivo* y el rompimiento de esta unión aparentemente destruye su actividad biológica (Fudenberg 1993).

Considerando el peso molecular y la composición de los diferentes FT aislados hasta el momento, es factible que cada factor contenga por lo menos 40 aminoácidos; por lo tanto, si consideramos las posibles combinaciones con los 20 aminoácidos conocidos (aunque cabe mencionar que solo se han encontrado 18 de los 20, en FT purificados), entonces deben existir varios millones de variaciones en la estructura primaria, y por lo tanto varios millones de FT específicos para todos los diversos antígenos existentes (Kirkpatrick 1988,1992).

1.3.4 Mecanismos de acción propuestos para el FT

El estudio del FT se ha centrado por varias décadas en sus efectos clínicos, desafortunadamente hasta ahora no se ha logrado obtener FT con un alto grado de pureza para su análisis molecular, esto ha impedido que las investigaciones progresen y esto limita el entendimiento de los mecanismos de acción básicos de su funcionamiento (Kirkpatrick y col. 1992).

Aunque el mecanismo de acción exacto no se conoce, se han propuesto varias hipótesis para explicarlo: En 1975, Kirkpatrick estableció que el FT tiene diferentes sitios de acción tales como el timo, la interacción entre linfocitos-monocitos y linfocitos-linfocitos. Además, el FT presenta efectos directos sobre células presentes en el sitio inflamatorio. Sugiere también que la especificidad del FT está determinada por el estado inmunológico en el que se encuentra el sujeto receptor del FT más que por la información molecular del lisado. Finalmente propone que muchos de los efectos del FT pueden ser debidos a cambios intracelulares de nucleótidos cíclicos, principalmente por la acumulación de cGMP en células inmunológicamente activas (Kirkpatrick y col., 1974,1992).

El FT incrementa la actividad quimiotáctica de los granulocitos y débilmente la de los monocitos; también actúa como adyuvante (Vanderbark y col 1977).

También actúa como mitógeno acelerando la producción y diferenciación de las células del sistema inmunológico; regula así las respuestas de las mismas (Zapata y col., 1981).

El FT es una molécula de información que puede desbloquear o desreprimir poblaciones de linfocitos T y estimular la proliferación clonal, es decir, que provoca que los linfocitos T vuelven a funcionar y también activa a los macrófagos. Esta actividad se trata de explicar ya que la porción ribonucleotídica del FT que se encuentra presente en la superficie de la célula se podrá unir por complementariedad al DNA (demostrado por Cech en 1987) y una vez unidos son internalizados por medio de un receptor de DNA (Olsen y Krakowa, 1983; Estrada y col. 1998).

En 1988, Karhumaki y colaboradores establecieron, a partir de un estudio enzimático, que la mayor parte de la actividad protectora, tanto en dializados humanos como porcinos, es en base a la acción de estructuras de bajo peso molecular conteniendo péptidos y/o polinucleótidos que se pudieran obtener al cortarse FT, de manera que una porción de estas estructuras permanezca en la superficie celular y de esta manera formar parte del TcR (Kirkpatrick, 1993).

Se ha propuesto también que el FT forma parte del receptor del linfocito T (TCR) ya que el FT puede interactuar con la región variable de la cadena α y/o β del receptor de células T para cambiar su avidéz y afinidad por el antígeno en una forma que de otra manera podría ocurrir sólo después del encuentro con el antígeno (Dawer, 1996) , si esto es cierto, entonces este sería necesario para la activación de los linfocitos Th (Fundenberg, 1989, Kirkpatrick, 1993).

En 1996 se describieron las propiedades de una subfracción del FT: IMREG(R)-1, la cual se obtiene después de una segunda diálisis con una membrana de 3500 Daltons de corte. Esta subfracción tiene la habilidad de incrementar y acelerar la DTH contra el antígeno con el cual el donador fue sensibilizado y modifica la expresión *in vitro* de la subunidad p55 del receptor para IL-2 en linfocitos CD4 (Gottlieb y col., 1996).

Ninguna hipótesis ha sido comprobada haciendo falta realizarse más experimentos, para aceptar o descartar cualquiera, ya que ninguna de ellas explica todos los efectos que se le atribuyen al FT.

1.3.5 Aplicaciones del FT en medicina veterinaria

A nivel nacional, en medicina veterinaria, se ha usado el FT en algunas enfermedades como infecciones del aparato digestivo y respiratorio en becerros, enfermedad de Newcastle en aves, enfermedad de Aujeszky, rinitis atrófica, cólera porcino y colibacilosis en cerdos obteniéndose resultados satisfactorios (Mateos, 1992).

Se ha establecido que lechones de menos de tres a cuatro semanas de edad son particularmente susceptibles a infecciones, ya que los componentes constitutivos y funcionales necesarios para una respuesta inmunológica celular permanecen inmaduros (McCauley, 1984., Saalmüller, 1989., Hammerberg, 1989., Hoskinson, 1990., Becker, 1993., Tlaskalova-Hogenova, 1994., Scwager y Schulze, 1997), esta inmunodeficiencia es análoga a la hipogamaglobulinemia en bebés

humanos. Por esta razón, recientemente varios inmunopotenciadores se han desarrollado para su aplicación en humanos y en animales, entre estos se encuentra el extracto dializable de leucocitos (Factor de Transferencia) (Namioka y col.,1982).

El FT se ha empleado en forma profiláctica y terapéutica de enfermedades infecciosas en diferentes especies domésticas produciendo buenos resultados. Por ejemplo, en el tratamiento y prevención de colibacilosis en lechones al aplicar FT a las 6 horas postnacimiento disminuyó la presentación de diarreas y aumentó la ganancia diaria de peso a los 28 días (Rojas, 1987); de igual forma disminuyó la incidencia y mortalidad en cerdos por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* mejorando los parámetros productivos en forma significativa (Torres, 1994). La administración de FT bovino en pollos inicia la activación de una respuesta inmune celular en contra de enfermedades virales como laringotraqueitis e infección de la Bolsa de Fabricio protegiendo en forma similar a la inducida por las vacunas comerciales, sin importar la presencia de anticuerpos maternos (Wilson, 1988). Por otro lado, al aplicar el factor en forma terapéutica en perros infectados con el virus de moquillo se ha tenido alrededor de un 80% de éxito del total de animales tratados (Calzada, 2000).

Los factores de transferencia ofrecen una alternativa molecular en la inmunoterapia para deficiencias en inmunidad celular, esto basado en los buenos resultados que se han obtenido con la utilización del FT en una amplia serie de padecimientos en humanos así como también en animales, el uso de inmunomoduladores como FT en el campo del manejo de cerdos podría ser una herramienta terapéutica útil, específicamente en estrés, respuesta inmune, resistencia natural y desarrollo reproductivo (Blecha, 1988).

En virtud de la importancia de contar con inmunomoduladores efectivos, resulta importante continuar con la investigación del FT en el campo de la medicina veterinaria para evaluar su efecto principalmente enfocado a la parte clínica.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Estudios anteriores de los efectos del factor de transferencia sobre el sistema inmunológico, indican que es capaz de transferir inmunidad de un individuo a otro, incrementa los mecanismos de defensa en general y tiene la propiedad de regular al sistema inmunológico; no obstante, hasta la fecha no existen trabajos aplicados a corregir respuestas inmunológicas disminuidas en las primeras semanas de vida de los cerdos.

1.5 HIPÓTESIS

La inmadurez anatómica y funcional del sistema inmunológico propicia un estado de inmunodeficiencia transitoria en las primeras semanas de vida del lechón, incrementando así su susceptibilidad a agentes infecciosos, es por ello que la administración de una sustancia inmunológicamente activa como el factor de transferencia podría ayudar a mejorar el estado inmunológico del animal.

1.6 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos de la administración del factor de transferencia sobre la respuesta inmunológica celular y humoral en lechones desde el nacimiento hasta las cinco semanas de edad.

1.7 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estudiar *in vitro* si el factor de transferencia es capaz de modificar la respuesta proliferativa de linfocitos T hacia fitohemaglutinina.
2. Estudiar *in vitro* el efecto del factor de transferencia sobre el cambio fenotípico de las poblaciones de linfocitos T de sangre periférica.
3. Estudiar *in vitro* el efecto del factor de transferencia sobre la respuesta inmunológica humoral específica hacia una vacuna.
4. Evaluar el efecto del FT en los valores de cuentas diferenciales de sangre periférica de lechones durante el estudio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales de experimentación

Para la realización de este trabajo se eligió cuidadosamente una granja de ciclo completo, con sincronización de partos y con baja mortalidad durante la lactancia. Las 4 camadas que se eligieron provenían de la cruce de macho Yorkshire y hembra Landrace (de segundo parto). Los 32 cerdos fueron mantenidos con sus madres durante 21 días (destete) y 7 días más sin ellas, en la granja de origen.

Las condiciones de cuidado, manejo y alimentación fueron de acuerdo a las especificaciones establecidas por "Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Porcina". FMVZ UNAM situado en Jilotepec, Edo. de Méx.

Se trabajaron simultáneamente 4 camadas con ocho lechones cada una, los lechones de cada camada fueron identificados por muesqueo auricular con el fin de identificar y seleccionar los tratamientos a los que fueron sometidos.

De esta manera 2 lechones de cada camada se trataron mediante las siguientes especificaciones:

2.2 Diseño experimental

Los 32 cerdos utilizados en este estudio fueron divididos de la siguiente forma: Cada lechón perteneciente al lote A recibió SSF estéril vía intraperitoneal.

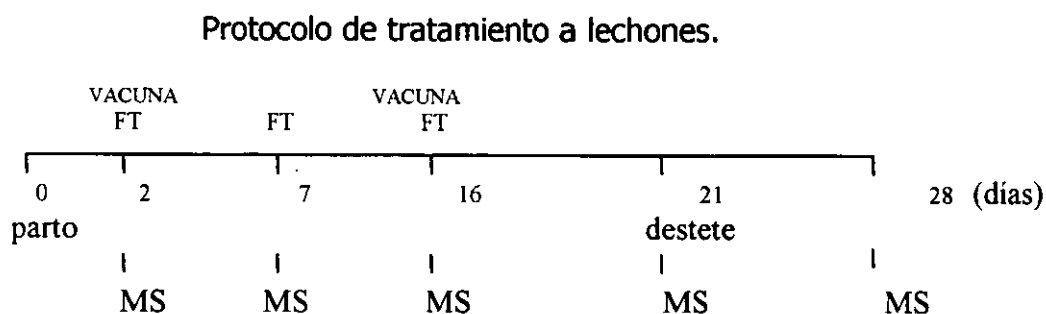
Cada lechón perteneciente a los lotes B y D fue vacunado intramuscularmente con dos dosis de la bacterina "Suvaxyn Respifen^{MR}" sin adyuvante (Fort Dodge Animal Health Lab., Cat. 1152/21A), contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en los días indicados en el esquema 1 (cada dosis de bacterina consistió de 1 ml equivalente a 3 mg de proteína).

Cada lechón de los lotes C y D recibió un total de tres dosis de factor de transferencia (FT) (1 dosis = 1U de FT, la cual es equivalente a la cantidad derivada del extracto de leucocitos de medio litro de sangre de un cerdo adulto

sano en un volumen final de 0.5 ml en SSF) administrada intraperitonealmente en los días indicados en el esquema 1.

Se obtuvieron muestras de sangre de todos los cerdos en tubos vacutainer con heparina como anticoagulante por venipuntura yugular en los días señalados en la figura 6.2.

FIGURA 1



- MS= Muestra de sangre.
- FT= Factor de transferencia
- Vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

GRUPO TRATAMIENTO

- A 8 Lechones tratados con SSF (control).
- B 8 Lechones vacunados contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- C 8 Lechones tratados con factor de transferencia.
- D 8 Lechones tratados con factor de transferencia y vacunados contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Figura 2.2. Protocolo de tratamiento a los 8 lechones de cada uno de los grupos trabajados

2.3 Producción del FT

La producción del FT se realizó de manera previa al desarrollo del experimento con la finalidad de tener disponibles dosis suficientes para trabajar un mismo lote a lo largo de toda la experimentación.

Se trabajaron 10 litros de sangre heparinizada obtenida de cerdos adultos sanos. Las células mononucleares se separaron en Histopaque (Sigma Diagnostics®, USA. Cat. 1077) por gradiente de centrifugación a 800 g durante 30 minutos (centrífuga Beckman J2-HS). Se realizó la lisis celular mediante 5 ciclos de congelación a 4°C y descongelación a 37°C, una vez lisadas las células se sometieron a diálisis contra agua estéril en membranas de celulosa (Sigma, D-9402) dejándola 24 horas a 4°C.

El producto resultante de la diálisis se esterilizó por filtración, se envasó en frascos de vidrio neutro blanco tipo 1 de 5 ml y se liofilizó (liofilizadora Labconco) hasta obtener una pastilla que es la que se resuspendió en 1ml de agua inyectable para ser administrado.

El FT liofilizado se guardó en congelación a -20°C para posteriormente usarlo.

Se consideró como una unidad de FT al dializado proveniente de 5×10^8 leucocitos

DIAGRAMA DE FLUJO

Metodología empleada para realizar la evaluación inmunológica de lechones de 2 a 28 días de edad.

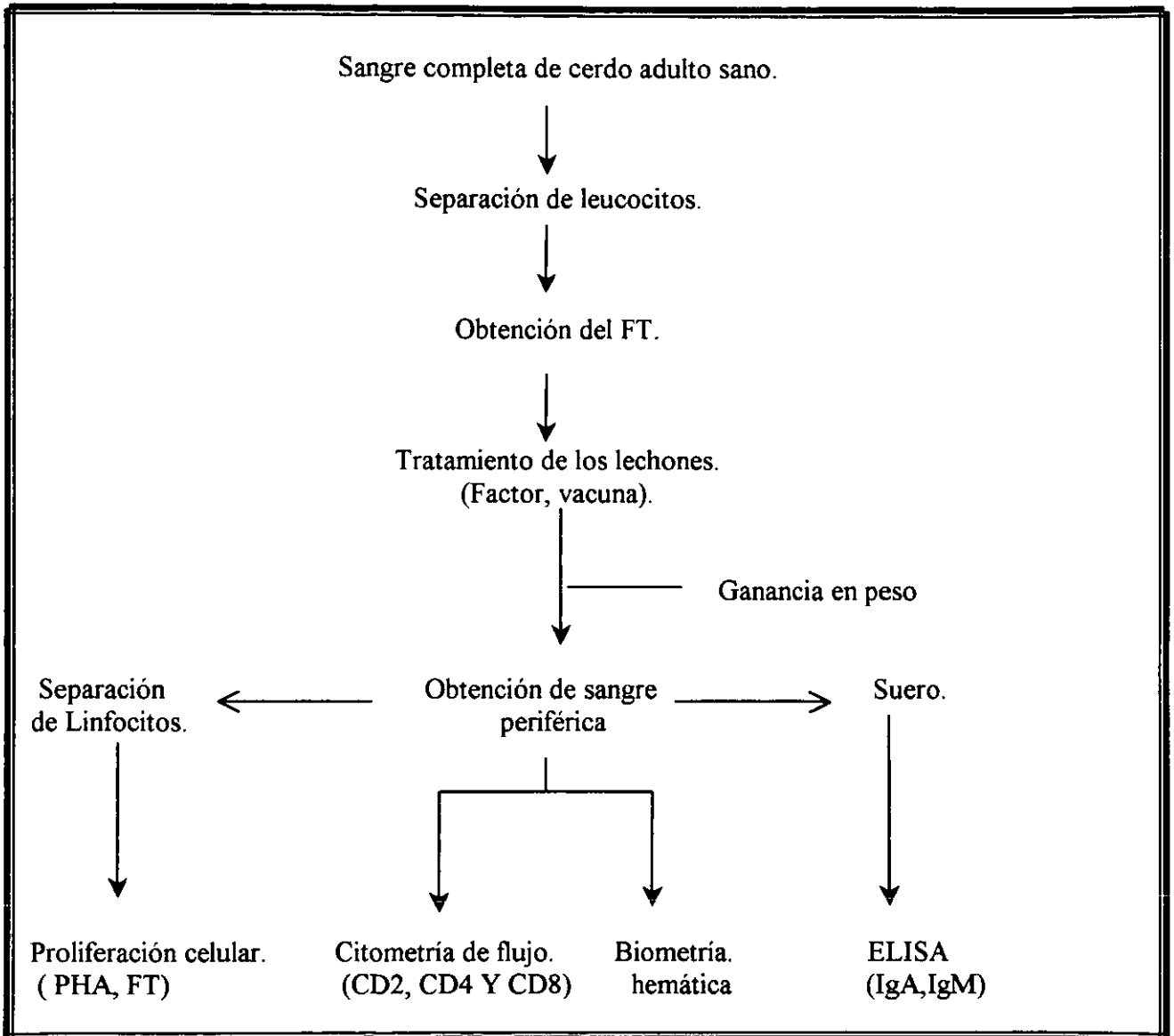


Fig. 3.3 Muestra las actividades realizadas durante el experimento de manera general.

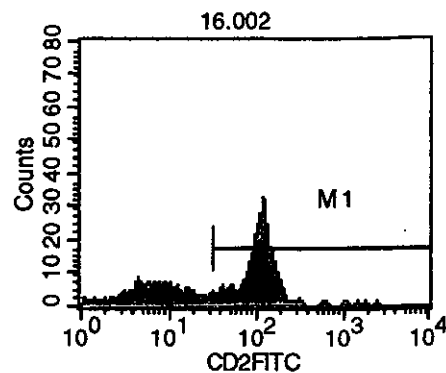
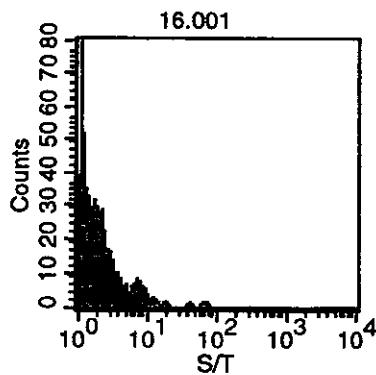
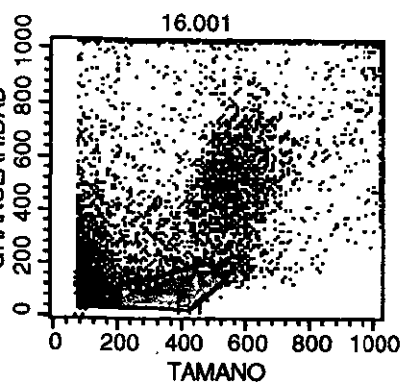
2.4 Proliferación *IN VITRO* de linfocitos T de sangre periférica

La respuesta proliferativa *in Vitro* se evaluó los días 16, 21 y 28 del experimento como se describió anteriormente por Schwager y Schulze (1997), con las siguientes modificaciones: Las células sanguíneas obtenidas a partir de la vena yugular se colectaron en tubos que contenían heparina y se separaron en Histopaque (Sigma Diagnostics®, USA. Cat. 1077) por gradiente de centrifugación a 800 g durante 30 minutos. Las células fueron lavadas tres veces en solución salina fisiológica estéril. El botón celular resultante fue resuspendido en medio AIM-V (GibcoBR, USA. Cat. 12055-0991); 1.5×10^5 células mononucleares por pozo se cultivaron por triplicado en placas de microtítulo de fondo plano con el mitógeno PHA ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma®, USA. Cat. L9017), FT (Dil. 1:50) durante 24 horas a 37°C con 5% CO_2 . Los cultivos fueron pulsados 7h con $0.5 \mu\text{Ci}$ de [^3H]metil timidina (74gbq mmol^{-1} ; Amersham, les Ulis, France) por pozo. Las células se cosecharon con un cosechador PHD™ (Cell harvester Cambridge Technology INC) y se colocaron en 2 ml de líquido de centelleo. Finalmente, la radioactividad se midió en un contador de centelleo (Beckman LS 6000 IC). Los resultados se estandarizaron como el índice de proliferación (IP) que se calculó de la siguiente manera:

$$\text{IP} = \frac{\text{CPM en el grupo tratado}}{\text{CPM del grupo control}}$$

2.5 Estudio de la expresión de los antígenos de diferenciación CD2, CD4 y CD8 mediante citometría de flujo

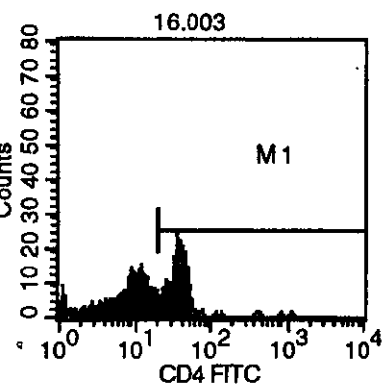
Treinta microlitros de sangre heparinizada contenida en tubos Falcon se mezclaron con 5 μ l de anticuerpo monoclonal correspondiente (mAb contra CD2 clona MSA4, CD4 clona 74-12-4 y CD8 clona 76-2-11 , VMRD, Inc.) en la dilución previamente establecida (ANEXO 1). Se incubaron 30 min. a 37 °C. Con el fin de eliminar glóbulos rojos, se adicionaron 200 μ l de solución de lisis para FACS™ (Becton-Dickinson, Cat. 349202) a cada tubo incubándose 10 minutos a 37°C protegidos de la luz. La solución de lisis se retiró por centrifugación a 800 g por 5 minutos. El botón resultante se lavó una vez con PBS (tampón salino de fosfatos, 0.15 M pH 7.2). Las células previamente resuspendidas en 30 μ l de PBS se trataron con 5 μ l del anticuerpo anti gamaglobulina total de ratón conjugado con FITC diluido 1:50 (isotiocianato de fluoresceína) (rata anti IgG de ratón, Zymed laboratories, Inc). Posteriormente, los tubos se incubaron 30 minutos a 37 °C en la oscuridad. Las células se lavaron con PBS y el botón se resuspendió en 1 ml de paraformaldehído (1% [p/v], pH 7.2). Las células se conservaron a 4°C en ausencia de luz hasta su adquisición y análisis en el citómetro de flujo. Para la adquisición citofluorométrica se utilizó un citómetro de flujo (Becton Dickinson, modelo FACSort), en el cual se establecieron los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) con base a los cuales se seleccionó la población de linfocitos a analizar. De cada muestra se analizaron 10,000 eventos, los valores relativos fueron tomados de los histogramas que se muestran en la figura 6.5.



File: 16.002
Gate: G1
Total Events: 10000

Sample ID: 16
Gated Events: 2260
X Parameter: FL1-H CD2FITC (Log)

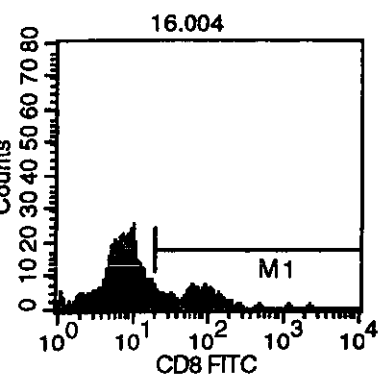
| % Gated | % Total |
|---------|---------|
| 100.00 | 22.60 |
| 67.83 | 15.33 |



File: 16.003
Gate: G1
Total Events: 10000

Sample ID: 16
Gated Events: 1921
X Parameter: FL1-H CD4 FITC (Log)

| % Gated | % Total |
|---------|---------|
| 100.00 | 19.21 |
| 47.16 | 9.06 |



File: 16.004
Gate: G1
Total Events: 10000

Sample ID: 16
Gated Events: 2519
X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log)

| % Gated | % Total |
|---------|---------|
| 100.00 | 25.19 |
| 18.98 | 4.78 |

Fig.2.5 Análisis de subpoblaciones de linfocitos por citometría, se utilizó un citómetro de flujo (Becton Dickinson, modelo FACSort), en el cual se establecieron los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) con base a los cuales se seleccionó la población de linfocitos a analizar. De cada muestra se analizaron 10,000 eventos, los valores relativos fueron tomados de los histogramas.

2.6 Determinación de anticuerpos específicos de isotipo IgM e

IgA

Para estudiar el efecto sobre la respuesta humoral en lechones tratados con factor de transferencia enfrentados a un antígeno bacteriano, se utilizó el suero obtenido de sangre periférica de lechones y se determinó el título de anticuerpos específicos de isotipo IgM contra *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Así, 100 µg/ml de proteína (extractos proteicos de cultivos de *Mycoplasma hyopneumoniae*) en regulador de carbonatos (Na₂CO₃ 20mM, en NaHCO₃ 20mM, pH 9.4) se colocaron en placas de poliestireno de fondo plano y se incubaron a 37°C durante 2 h. Al término de la incubación, las placas se lavaron repetidas veces con tampón salino de fosfatos-Tween 20 (Na₂PO₄ 20 mM, NaCl 0.15M, Tween-20 0.05%, pH 7.4). Posteriormente se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS a 4°C durante toda la noche. Se realizaron tres lavados como se describió anteriormente y se adicionaron los sueros problema diluidos 1:320 incubándose a 37°C durante 2 h. Se realizaron tres lavados y la unión específica del suero problema se detectó utilizando un anticuerpo anti IgM de cerdo conjugado con peroxidasa a una dilución 1:1000 previamente establecida. La reacción se dejó transcurrir durante 2 h a 37 °C y los pozos se lavaron tres veces como se describió anteriormente. Para el revelado se adicionó una solución sustrato-cromógeno (30% H₂O₂, 40% ortofenildiamina en Na₂PO₄ 100mM, pH 5) por espacio de 10 minutos. Finalmente, para detener la reacción enzimática, se adicionaron 100 µl/pozo de una solución ácida (HCl 6N). Las absorbancias de las placas se midieron en un lector de ELISA (Labsystem multiskan MS) a una longitud de onda de 492 nm.

Para determinar los anticuerpos de isotipo IgA se siguieron las mismas condiciones variando solo los anticuerpos utilizados que presentan las siguientes características:

Anticuerpo primario: ratón anti-IgA de cerdo diluido 1:4000 (J61 1B4, Serotec).

Anticuerpo secundario: Chivo anti inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:5000. Donado por el Dr. Marco Antonio Vega López adscrito al Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN).

2.7 Conteo diferencial

Los conteos diferenciales de leucocitos de sangre periférica se determinaron contando 200 células a partir de frotis sanguíneos previamente teñidos con colorante de Wright.

2.8 Incremento de peso semanal (IPS)

El peso corporal de los lechones se midió cada semana hasta al final del experimento (cuatro semanas de edad). Los resultados se reportaron como el porcentaje de incremento de peso semanal (%IPS) de la siguiente manera:

$$\% \text{ IPS} = \frac{(\text{Peso en gramos por semana} \times 100)}{(\text{Peso inicial en gramos [2 días]})} - 100$$

2.9 Análisis estadístico.

Todos los resultados reportados en las figuras de este estudio se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Las diferencias se analizaron usando la prueba estadística de Kruskal-Wallis por medio de un programa de computadora (SPSS10.0 para windows).

3. RESULTADOS

3.1 Proliferación *In Vitro* de linfocitos T de sangre periférica

Los linfocitos obtenidos de sangre periférica a los días 16, 21 y 28 del experimento se cultivaron para ser estimulados con el mitógeno correspondiente. La proliferación resultante se midió con base a la capacidad para incorporar [³H]metil timidina. No se trabajaron las muestras de los días 2 y 7 ya que no se contó con una cantidad de sangre suficiente debido al tamaño de los lechones GRUPO CONTROL.

El estudio realizado en el grupo control, indica que la estimulación linfocítica empleando FT 1/50 disminuyó significativamente ($P < 0.05$) comparada con aquella cuando se utilizó SSF. Cuando las células se cultivaron con PHA se observó una ligera proliferación de linfocitos en los días 16 y 28 (mostrando un IP=1.65 y 1.56, respectivamente), pero no al 21 (IP=1.23). Al emplear la combinación de FT + PHA para estimular a las células se observó que existió un incremento significativo ($P < 0.05$) para el día 28 alcanzando un valor de 3.18 como se ilustra en la figura 3.1. Este incremento no fue observado cuando se utilizó otra sustancia química.

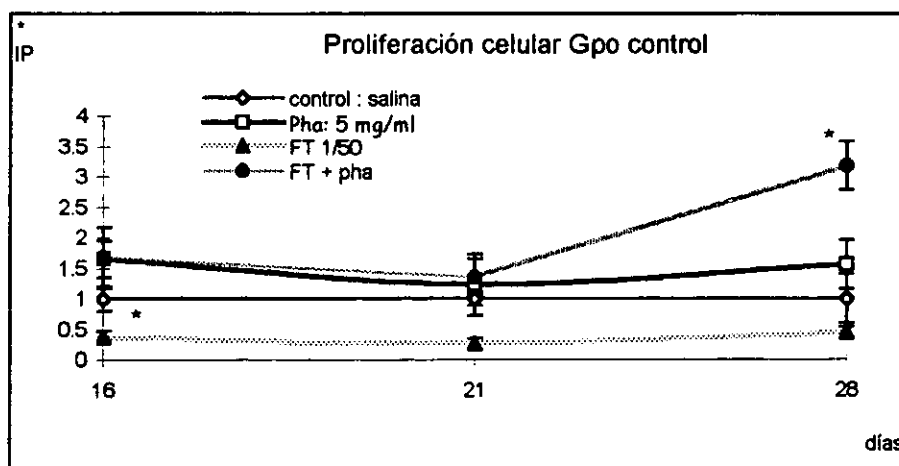


Fig. 3.1 Respuestas proliferativas indicada como el índice de proliferación (IP) de linfocitos cultivados *in vitro* obtenidos de 8 animales sin tratamiento (CONTROL) activados *in vitro* con PHA (5µg/ml en cada pozo, FT dil. 1:50 y PHA + FT). Las mediciones se realizaron mediante la incorporación de 0.5 µCi [³H]metil timidina * $P < 0.05$.

GRUPO TRATADO *IN VIVO* CON VACUNA

En el grupo de animales cuyo tratamiento *in vivo* fue con vacuna no se observaron cambios significativos en la respuesta proliferativa obtenida con cualquiera de las sustancias empleadas, sin embargo, la disminución en la respuesta proliferativa al emplear FT se repitió al igual que en el grupo de los animales control (IP=0.45) Figura 3.2.

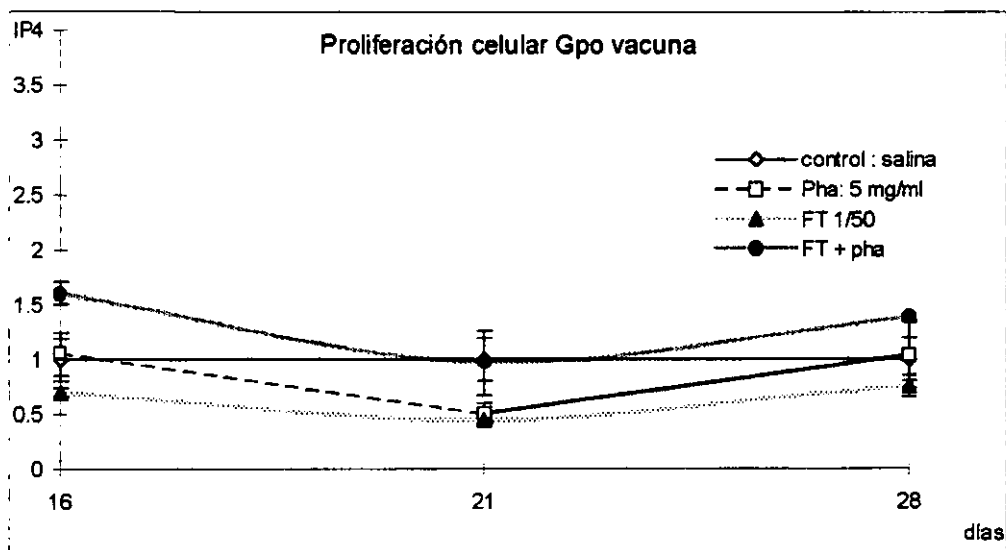


Fig. 3.2 Respuestas proliferativas indicada como el índice de proliferación (IP) de linfocitos cultivados *in vitro* obtenidos de 8 animales vacunados contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, activados *in vitro* con PHA (5 μ g/ml en cada pozo, FT dil. 1:50 y PHA + FT). Las mediciones se realizaron mediante la incorporación de 0.5 μ Ci [3 H]metil timidina

GRUPO TRATADO *IN VIVO* CON FT

Cuando el grupo de animales se trató *in vivo* con FT 1/50 se observó que al estímulo con FT la incorporación de timidina vuelve a disminuir con respecto a las células tratadas con salina (células control) acentuándose en el día 16 (IP=0.25)($P<0.05$). Sin embargo, al estimular las células con la mezcla FT + PHA se observó que la respuesta se incrementó siendo más alta en los días 21 del experimento (IP= 1.89) resultando estadísticamente significativo ($P<0.05$) (Figura 3.3).

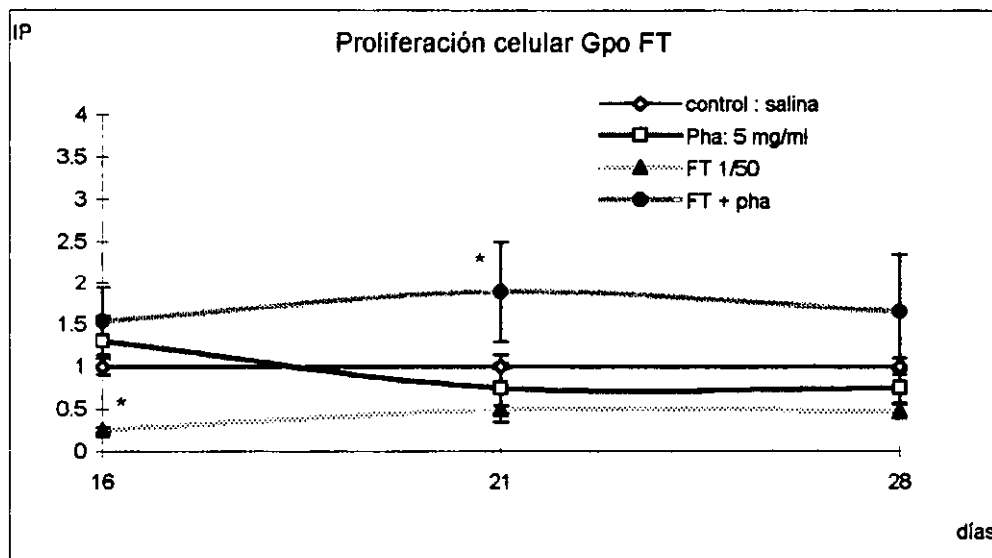


Fig. 3.3 Respuestas proliferativas indicada como el índice de proliferación (IP) de linfocitos cultivados *in vitro* obtenidos de 8 animales tratados con una dosis de FT cada cerdo, activados *in vitro* con PHA (5 μ g/ml en cada pozo, FT dil. 1:50 y PHA + FT). Las mediciones se realizaron mediante la incorporación de 0.5 μ Ci [3 H]metil timidina.

* $P < 0.05$.

GRUPO TRATADO *IN VIVO* CON VACUNA Y FT

El grupo que mostró un comportamiento diferente fue el compuesto por animales tratados *in vivo* con vacuna y FT, con todas las sustancias utilizadas para estimular los cultivos *in vitro* se observó que al día 21 se obtuvo una respuesta proliferativa ligeramente aumentada comparada con el control, sin embargo esta no fue estadísticamente significativa, lo interesante es que aquí no se observó que el FT *per se* provocara la disminución del IP aunque si se tiene un valor bajo al inicio el cual es significativo ($P < 0.05$). (Figura 3.4).

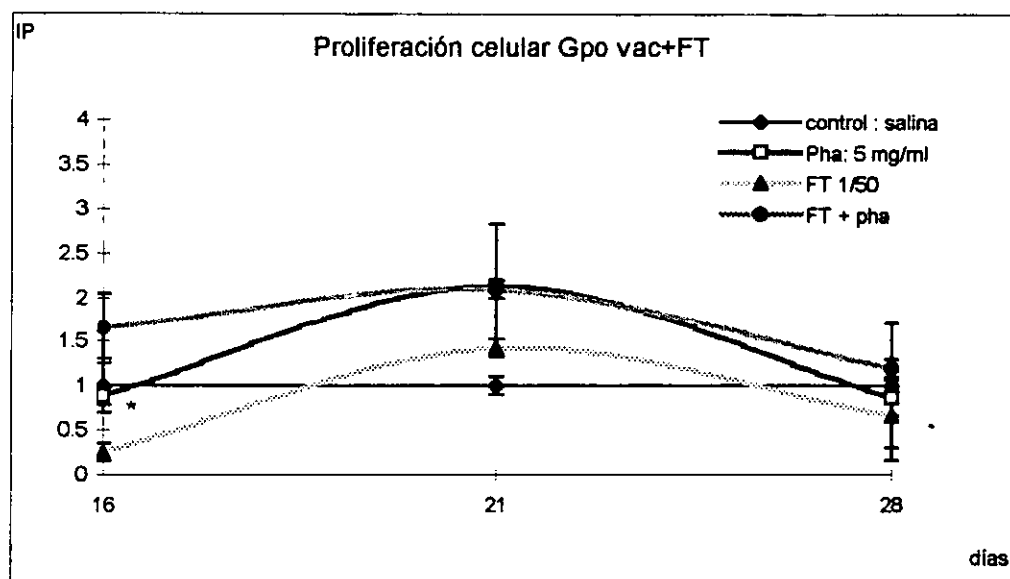


Fig. 3.4 Respuestas proliferativas indicada como el índice de proliferación (IP) de linfocitos cultivados *in vitro* obtenidos de 8 animales tratados con una dosis de FT y una dosis de vacuna cada cerdo, activados *in vitro* con PHA (5 μ g/ml en cada pozo, FT dil. 1:50 y PHA + FT). Las mediciones se realizaron mediante la incorporación de 0.5 μ Ci [3 H]metil timidina. * $P < 0.05$.

Las muestras de los días 2 y 7 no se trabajaron ya que el volumen de sangre obtenido estos días resultó insuficiente para realizar esta técnica.

3.2 Estudio de la expresión de los antígenos de diferenciación CD2, CD4 Y CD8 mediante citometría de flujo

Se usó el análisis de citometría de flujo para determinar marcadores de diferenciación (CD) sobre linfocitos de sangre periférica de lechones en muestras colectadas los días 2, 7, 16, 21 y 28 de edad. Las muestras se procesaron para su tinción con anticuerpos monoclonales contra CD2, CD4 y CD8 marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

El estudio indicó un efecto de la edad en la expresión de marcadores de superficie en los linfocitos T de sangre periférica en el grupo de animales tratados con solución salina (Grupo control) ilustrado en las figuras 3.5,3.6 y 3.7.

A los 2 días de edad, el 64.7% de los linfocitos expresaban CD2⁺ (Fig. 3.5), estos valores fueron disminuyendo significativamente con el tiempo hasta el día 21 ($P<0.05$) donde se alcanzó el valor más bajo de la expresión de este marcador (20.7%).

La expresión del marcador CD2 no se modificó con ninguno de los tratamientos aplicados a los lechones en el transcurso del experimento (Figura 3.5).

Detección de células CD2⁺ en sangre periférica

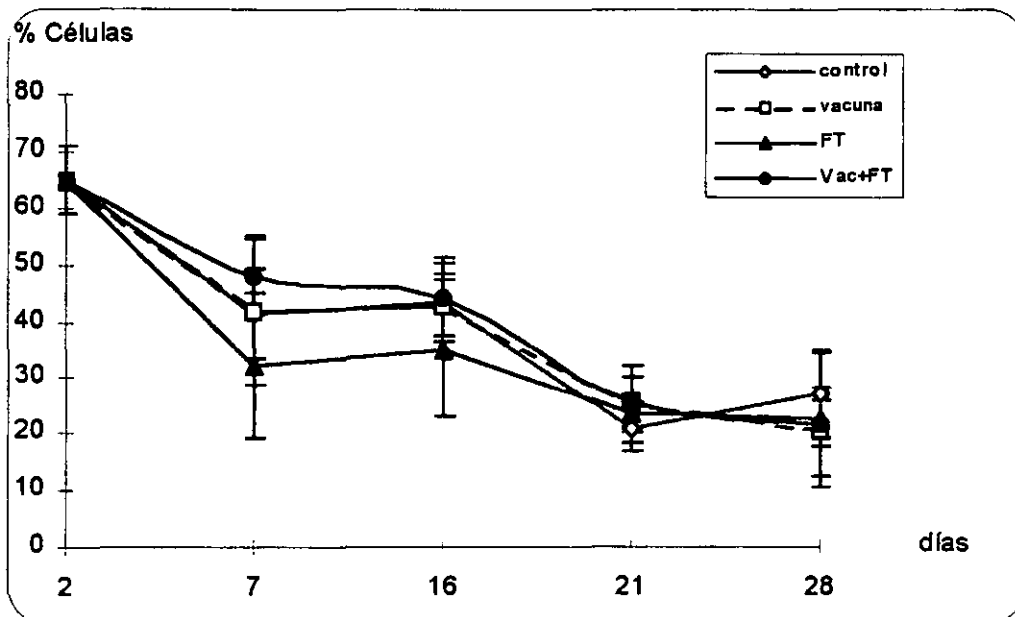


Fig. 3.5. Expresión de CD2 en células de sangre periférica de 4 grupos con 8 lechones cada uno, con diferentes tratamientos *in vivo*.

Grupo A Control (SSF) aplicado los días 2, 7 y 16.

Grupo B Vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* aplicada al los días 2 y 16.

Grupo C Una dosis de FT aplicada los días 2,7 y 16.

Grupo D Vacuna + FT aplicados conjuntamente los días 2, 7 y 16.

Las muestras de sangre fueron tomadas cada 7 días iniciando al día 2 y hasta los 28 días de edad de los animales.

La expresión del marcador se determinó mediante citometría de flujo.

Después del nacimiento, la expresión de CD4 (42%) se encontró en mayor porcentaje con respecto a la de CD8 (13%), sin embargo, ambos marcadores presentaron una progresiva disminución acentuándose al día 21 del experimento (1.9% en CD4 y 5.4% en CD8, respectivamente) como se indica en las figuras 3.6 y 3.7.

En contraste con la recuperación parcial del grupo de lechones control, la disminución en la expresión de CD8 continuó al día 28 ($P < 0.05$) en aquellos grupos de lechones que fueron tratados con el FT, la vacuna y la combinación de FT con la vacuna (2.6%).

Detección de células CD4⁺ en sangre periférica

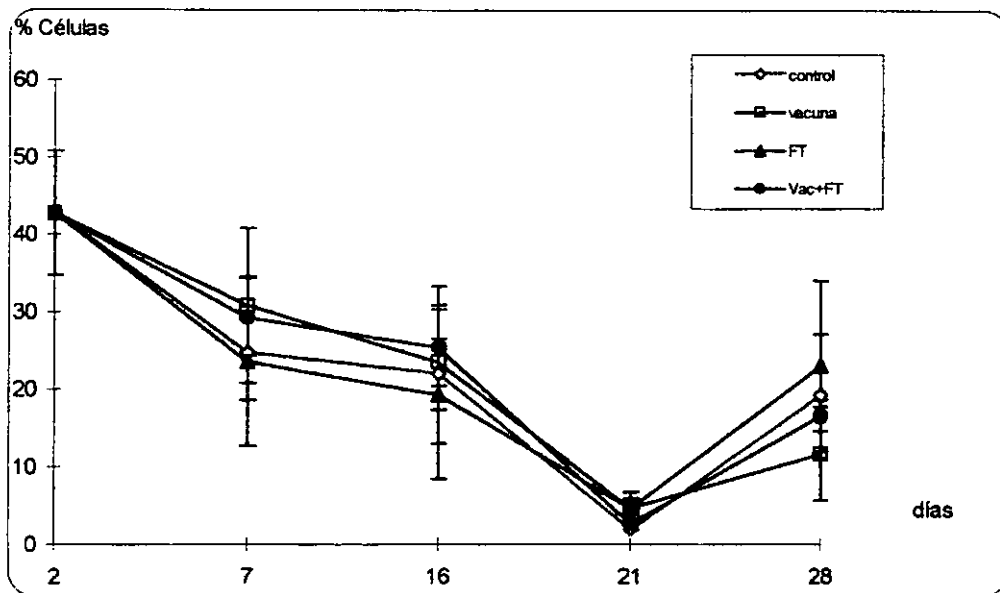


Fig. 3.6. Expresión de CD4 por células de sangre periférica de 4 grupos con 8 lechones cada uno, con diferentes tratamientos *in vivo* cada grupo. La expresión del marcador se determinó mediante citometría de flujo.

Detección de células CD8⁺ en sangre periférica

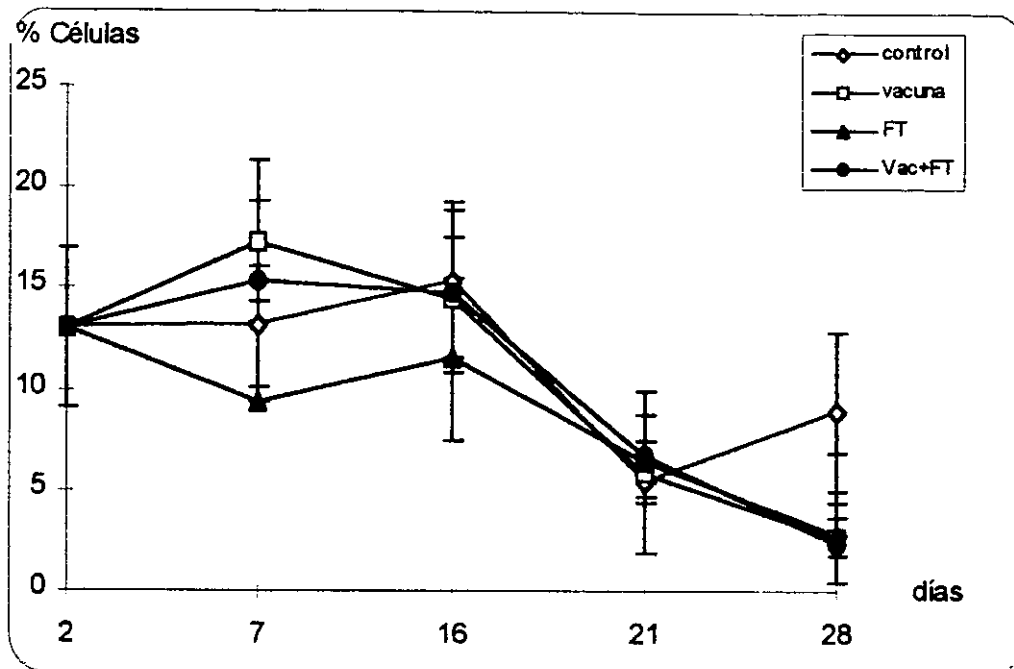


Fig. 3.7. Expresión de CD8 por células de sangre periférica de 4 grupos con 8 lechones cada uno, con diferentes tratamientos *in vivo* cada grupo. La expresión del marcador se determinó mediante citometría de flujo.

Se realizó el análisis longitudinal de los datos de citometría de flujo con los que se obtiene la siguiente información. En un periodo de 2 a 28 días de edad se observó una disminución significativa en la expresión de los marcadores CD2, CD4 y CD8 ($p < 0.005$) resultando más notoria al día 21 en todos los marcadores CD2 al día 21 ($p = 0.0001$), CD4 al día 21 ($p = 0.0003$) y CD8 al día 21 ($p = 0.005$).

Los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los lechones en este experimento no modifican el porcentaje de células CD2, CD4 y CD8 durante los días en estudio con respecto al grupo control. Las variaciones descritas anteriormente para cada grupo y para cada receptor no representan cambios tales que indique alguna diferencia estadística debida al tratamiento. Por otra parte, lo relevante en este estudio se centra en el hecho que existe una tendencia de todos

los lechones en todos los grupos estudiados a disminuir el porcentaje de células con estos marcadores con respecto al tiempo, tal comportamiento no ha sido reportado con anterioridad.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 1.

| Marcador | Porcentaje de células positivas | | | | |
|------------------|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 2 días | 4 días | 16 días | 21 días | 28 días |
| CD2 ⁺ | 64.7 ± 6 | 40.8 ± 8 | 41.3 ± 7 | 23.7 ± 4 | 22.0 ± 8 |
| CD4 ⁺ | 42.7 ± 8 | 27.0 ± 6 | 22.9 ± 9 | 3.5 ± 4 | 17.6 ± 8 |
| CD8 ⁺ | 13.0 ± 4 | 13.8 ± 3 | 14.0 ± 4 | 6.1 ± 1 | 4.3 ± 4 |

Cuadro 1. Análisis por citometría de flujo: distribución de poblaciones celulares linfoides que expresan CD2, CD4 y CD8 en sangre periférica, es el comportamiento de treinta y dos lechones estudiados en este experimento.

3.3 Determinación de anticuerpos específicos de isotipo IgA e IgM contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

Los resultados están expresados en densidad óptica (DO).

No hubo diferencias en ninguno de los grupos con los tratamientos administrados *in vivo* ni tampoco con la edad, aunque se observó una ligera tendencia a disminuir la cantidad de anticuerpos a lo largo del experimento, esto puede indicar que entonces conforme avanza la edad del animal los niveles séricos de IgM en lechones disminuyeron haciéndose más notorio en la etapa del destete y post-destete Figura 3.8.

Con respecto a la determinación de IgA se observó que no hubo variación significativa ni por el tratamiento *in vivo*, ni tampoco con la edad Figura 3.9.

Determinación de IgM

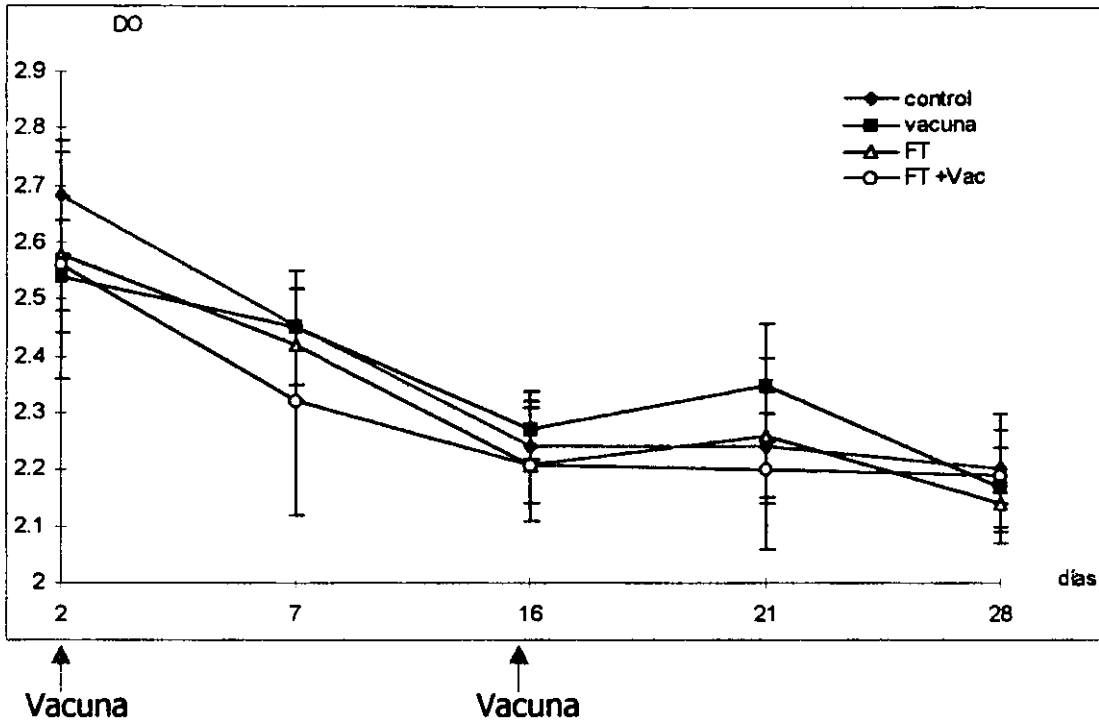


Fig. 3.8. Determinación de anticuerpos específicos de isotipo IgM detectados por ELISA en el suero de lechones de 2 a 28 días de edad vacunados contra *Mycoplasma hyopneumoniae* tratados o no con FT.

Determinación de IgA

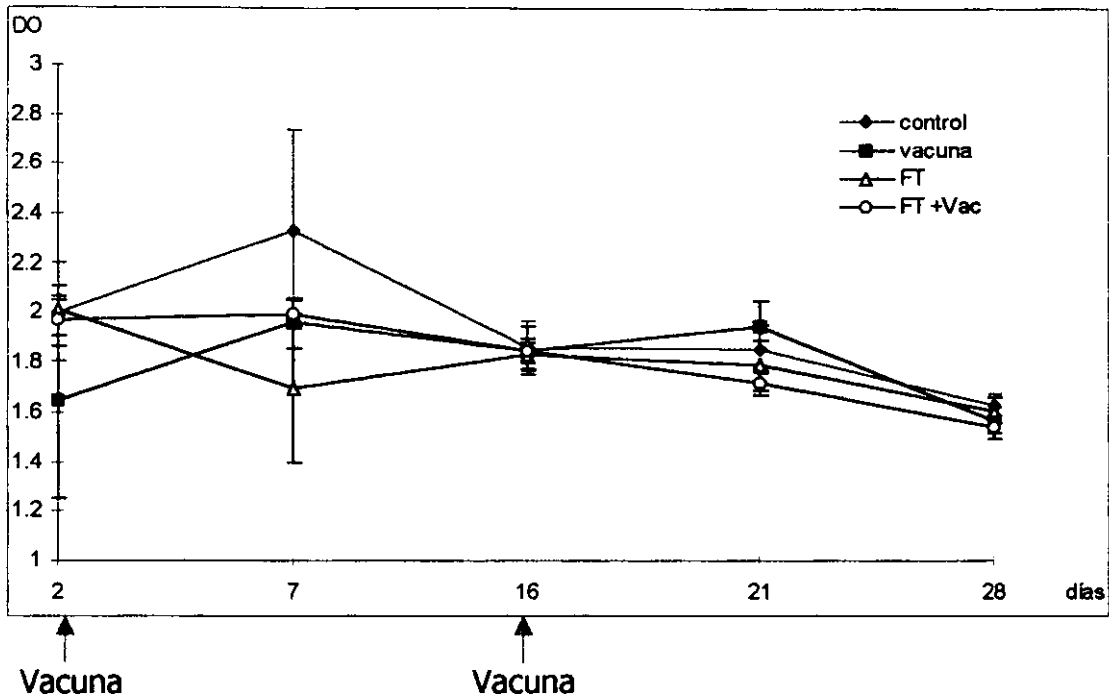
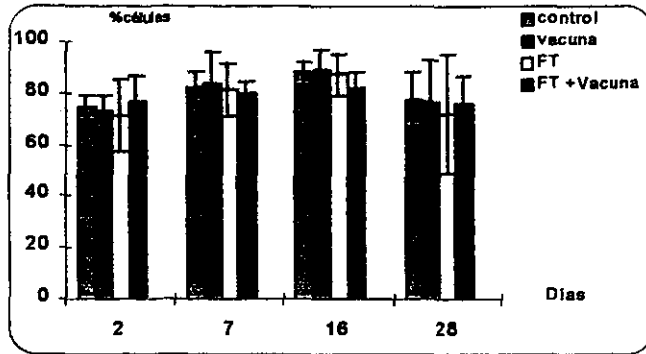


Fig. 3.9. Determinación de anticuerpos específicos de isotipo IgA detectados por ELISA en el suero de lechones de 2 a 28 días de edad vacunados contra *Mycoplasma Hyopneumoniae* tratados o no con FT.

3.4. Conteo diferencial

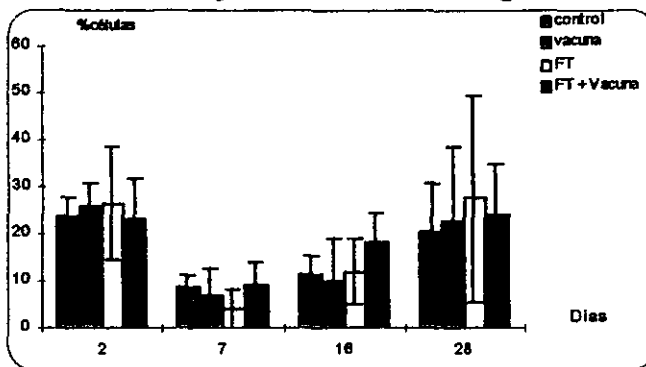
Los porcentajes de linfocitos entre el día 2 y el día 28 de edad fueron similares manteniéndose en niveles del 80% aproximadamente durante todo el experimento lo cual coincide con los valores normales reportados para el cerdo por Helmut Kraft (1998), en cambio los neutrófilos y monocitos mostraron un comportamiento poco constante con diferencias principalmente al séptimo día en donde se observa que los neutrófilos disminuyen aunque no es significativo y los monocitos aumentan resultando significativo cuando se compara con los días 16 y 28.

Porcentaje de linfocitos



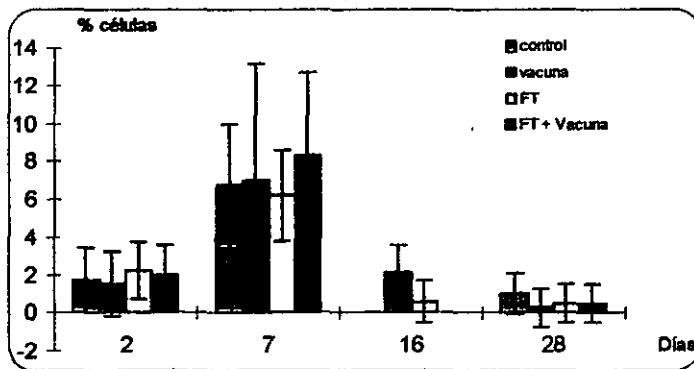
3.10a

Porcentaje de neutrófilos segmentados



3.10b

Porcentaje de monocitos



3.10c

Fig.3.10. Cuenta diferencial de 200 células de lechones a partir de frotis sanguíneos teñidos con Wright. Cada barra en la gráfica representa el promedio de 8 animales con diferentes tratamientos \pm la desviación estándar. En la figura 7.10a se representa el porcentaje de linfocitos, 7.10b porcentaje de neutrófilos segmentados y 7.10c porcentaje de monocitos.

3.5. Incremento de peso semanal

El porcentaje de incremento de peso semanal de los lechones se determinó sobre la base de las mediciones obtenidas durante los días 2, 7, 16, 21 y 28 del experimento. Dichas mediciones se analizaron por grupo de tratamiento; el incremento en peso se muestra en la Figura 3.11.

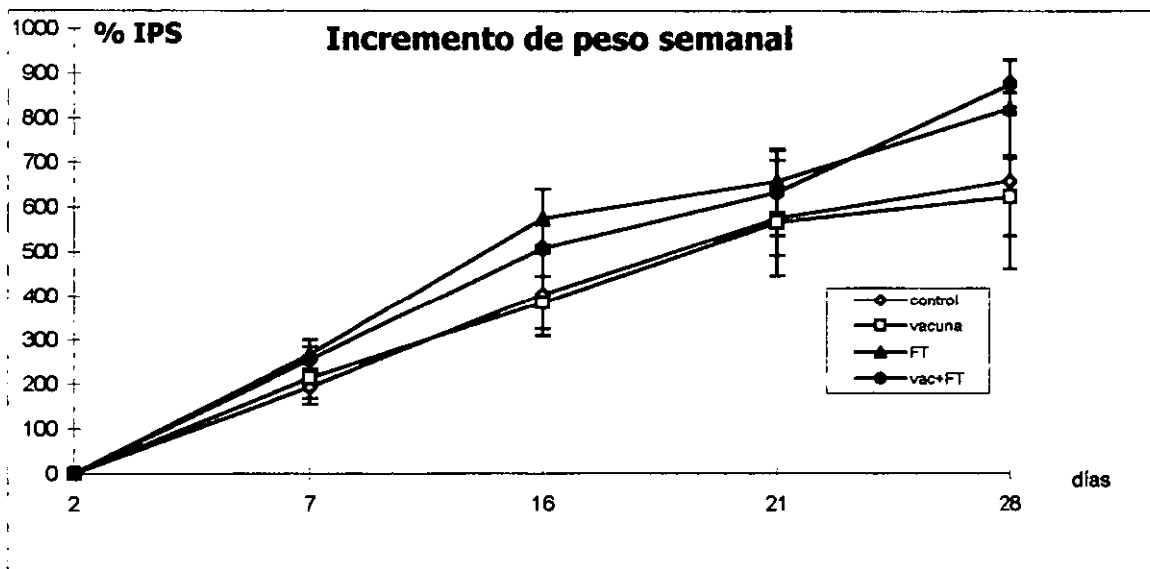


Fig. 3.11. Porcentaje de incremento en peso por tratamiento. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 8 animales por tratamiento \pm la desviación estándar

4. DISCUSIÓN.

El objetivo de esta tesis fue el estudio de la influencia del FT sobre el proceso de maduración de la respuesta inmunológica de los lechones. Trabajos previos, en donde se ha utilizado el FT en medicina humana, han mostrado que es útil en infecciones (Cabezas-Quiroga y col. 1990), padecimientos alérgicos (Navarro-Cruz y col. 1996), cáncer (Pilotti y col. 1996) y enfermedades parasitarias. Existen estudios del FT en medicina veterinaria donde se ha utilizado en forma profiláctica y terapéutica de enfermedades infecciosas en diferentes especies domésticas produciendo buenos resultados (Mateos, 1992., Namioka y col.,1982., Torres, 1994., Calzada, 2000). Sin embargo, estos trabajos no aportan evidencias contundentes de un efecto del FT sobre la madurez de la respuesta inmunológica, principalmente en animales jóvenes. Con toda esta información se consideró entonces importante investigar si el FT es capaz de influir en la maduración de la respuesta inmunológica de lechones que presentan normalmente inmadurez funcional y anatómica. Esta observación es importante, pues de ser así se podría apoyar o descartar la hipótesis acerca de su papel como inmunomodulador para poder ser empleado en etapas críticas de la producción porcícola en nuestro país.

Hasta la fecha existen pocos trabajos donde se estudie la respuesta inmunológica mediante el tratamiento con el FT en animales lactantes (Mateos, 1992., Namioka y col.,1982), por esta razón, para estudiar si el FT modula la maduración del sistema inmunológico en los lechones se tomaron como base los trabajos realizados por

Flores y col.,1992 quienes trabajaron con becerros lactantes tratados con una dosis de FT y observaron una disminución en la incidencia de diarreas y neumonías, el otro trabajo es el que presentaron Namioka y col.,1982 el cual está basado en la hipótesis de que cerdos de cuatro semanas de edad presentan pobres respuestas inmunológicas, entonces se desarrollo la estrategia del uso de inmunomoduladores, específicamente FT aplicando tres dosis en todo el tratamiento, encontrando resultados favorables. Por esta razón, la elección del modelo para este experimento se apoyó en el reportado por Namioka (Namioka y col., 1982; Flores y col., 1992).

Para evaluar el efecto del FT sobre el sistema inmunológico de los lechones, se utilizaron un conjunto de pruebas que incluyeron proliferación celular, determinación de subpoblaciones de linfocitos T CD2, CD4 y CD8, niveles de anticuerpos de isotipo IgA e IgM contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, cuentas diferenciales e incremento de peso semanal.

PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA.

En este proyecto se determinó la respuesta proliferativa de linfocitos de sangre periférica de lechones utilizando la técnica de incorporación de timidina y el resultado se expresó como índice de proliferación (IP).

Las respuestas de linfocitos porcinos de sangre periférica cultivados y estimulados con PHA *in vitro* no mostraron diferencias con ninguno de los tratamientos administrados *in vivo*. Los resultados obtenidos muestran que no hay

efectos significativos lo que se ajusta con lo reportado previamente por Brown-Borge y col. (1993) y Becker y Misferd (1993) quienes también reportan respuestas proliferativas de linfocitos bajas y además que algunas funciones celulares tales como actividad de células NK, producción de IFN- α se encuentran disminuidas. Además, reportes de Valpotic y col., (1989) y Becker y col., (1993) señalan respuestas limitadas a mitógenos aunque establecen que la información aportada acerca del status de la inmunidad celular durante el periodo de 1-30 días de edad esta incompleto. Por otro lado, Hoskinson (1990) encontró respuesta proliferativa alta a las 0.5 semanas, aunque ocurrió una disminución después de la primera semana de vida. Este comportamiento en la respuesta proliferativa se puede explicar sobre la base de que las primeras 3-4 semanas de vida son particularmente un intervalo susceptible para los lechones ya que los componentes constitutivos y funcionales necesarios para la respuesta celular inmunológica permanecen aún inmaduros (Schwager y Schulze, 1997). La disminución en proliferación esta casi siempre acompañada por la disminución en la producción de interleucina 2 (IL-2) en respuesta a mitógenos (Wattranng y col., 1998).

Esta condición en los lechones es la que se pretendía corregir con el uso del FT, sin embargo, en base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que el FT no ayuda a modificar la escasa respuesta proliferativa que se ha reportado por varios autores como una característica de la inmadurez de los lechones (McCauley, 1984.,Saalmüller, 1989., Hammerberg, 1989., Hoskinson, 1990., Becker, 1993., Tlaskalova-Hogenova, 1994., Schwager y Schulze, 1997).

Se ha sugerido que la respuesta inmunológica inducida por el FT puede ocurrir por inducción de proliferación clonal o bien, una desrepresión genética (la cual no se explica como se llevaría a cabo) de poblaciones celulares con un potencial latente de respuesta a antígenos a los cuales el FT es específico (Viza y col., 1986). En base a la hipótesis anterior, al no haber experiencia antigénica previa en los lechones, entonces el FT puede no ser efectivo bajo esta condición. Por otro lado también se ha propuesto que el factor de transferencia induce un incremento del GMPc intracelular en células inmunológicamente activas mejorando su funcionalidad reactiva (Kirpatrick, 1992). Si se considera que las células en esta etapa de vida del lechón se encuentran en un proceso de maduración, es probable que el FT no pueda ejercer este mecanismo intracelular sobre estas.

Un incremento en la respuesta proliferativa inducida con el FT no necesariamente implica un mejoramiento en la condición inmunológica del animal ya que entonces el FT provocaría la proliferación de células aberrantes.

La inmadurez del sistema inmunológico de los lechones hace difícil evaluar el efecto del FT *in vivo*, este hecho aunado a los efectos dependientes de dosificación que se suelen presentar cuando se trabaja con esta sustancia inmunomoduladora, ya que dosificaciones inapropiadas pueden dar resultados equivocados o incluso reacciones indeseables, representan un factor importante a considerar para analizar los resultados y obtener información completa.

Hasta ahora no se ha podido explicar el efecto biológico preciso del FT, esto ha provocado que no exista una posología bien establecida para esta sustancia.

En investigaciones recientes realizadas en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas por el grupo de la Dra. Iris Estrada García se observó que al estimular células de humanos adultos sanos con FT *in vitro*, se producía RNA mensajero para algunas citocinas, efecto que fue dependiente de la dilución utilizada. Entonces se intentó determinar la dilución ideal para obtener respuestas satisfactorias y se realizaron estudios preliminares en un modelo murino donde se estableció una serie de diluciones para probar cual de ellas mostraba efecto *in vitro* determinando la expresión de algunas citocinas como la osteopontina (OPN) medido por citometria de flujo determinando en ese momento la dilución 1:50 como candidato y esta fue la razón por la que se utilizó esta dilución en este experimento.

Resulta importante realizar un estudio de actividad biológica del FT y de esta forma estandarizar la dosis adecuada que contenga el número óptimo de moléculas de FT de tal forma que se consiga el mejor efecto.

EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN CD2, CD4 Y CD8

Muestras de sangre periférica heparinizada obtenida de lechones a diferentes edades se utilizaron para la determinación de células CD2, CD4 y CD8 por citometría de flujo. Los resultados indican que el tratamiento *in vivo* con el FT no ejerce un efecto en la proporción de células que expresan CD2, CD4 y CD8 con respecto al grupo control a lo largo del experimento.

Si bien no se han reportado mecanismos que indiquen que el FT sea capaz de modular el proceso de maduración y/o diferenciación de linfocitos T. las investigaciones se circunscriben a explicar que el FT mejora la calidad de respuesta en un antígeno determinado. Dawer (1996) ha propuesto que la interacción del FT con el receptor de células T cambia su afinidad por el antígeno en una forma parecida a la que ocurriría después de un primer encuentro antigénico. Si esto es cierto, resultará difícil explicar alguna participación en la modulación de células en proceso de maduración.

A pesar de no haber encontrado un efecto por el tratamiento administrado, si se observó un efecto en la proporción de células CD2, CD4 y CD8 en un análisis longitudinal.

Al día 2 del experimento se observó el mayor porcentaje de células que expresan CD2(64.7%), CD4(42.7%) y CD8 (13.0%) disminuyendo a medida que los lechones crecen. Algunos reportes apoyan la posibilidad que el origen de estas células es calostrales. Zimmerman y col.(2000) reportan que las secreciones mamarias contienen varios tipos de células maternas que pueden contribuir a la

inmunidad neonatal, fagocitos (neutrófilos y macrófagos), linfocitos (células T y B) y células epiteliales. Se describe que el 40% de las células que se encuentran en el calostro son linfocitos, de este porcentaje, del 70 al 90% son células T los cuales pueden atravesar el epitelio intestinal del neonato (Tuboly, y col. 1988) carente de complejo principal de histocompatibilidad clase I (SLA-I) (Le Jan , 1996) llegando así a la circulación periférica del lechón. Además, Becker y Misfeldt (1993) indican que animales de 1 día de nacidos sin recibir calostro no presentan células CD2, CD4 y CD8 en bazo, sangre y timo.

Desde el día siete del experimento se comenzó a observar una disminución progresiva, así para el día 7 se obtiene 40.8% de células CD2, 27% de células CD4 y 13.8% de células CD8, estos porcentajes coinciden con los reportados por Jpling y col. (1994) quien reporta 38% de CD2+, 25% de CD4+ y 13% de CD8+. Para el día 21 se observa el menor porcentaje detectado para todas las células estudiadas resultando para CD2 ($P < 0.0001$), CD4 ($P < 0.0003$) y CD8 ($P < 0.005$).

Es probable que la disminución de células CD2 en sangre periférica en este periodo pueda estar asociado con un alto porcentaje de células T $\gamma\delta$ reportado con anterioridad en cerdos jóvenes (Binns y col, 1992). Además Zuckerman (1998), quien mediante una comparación de los patrones de distribución de las poblaciones CD2+ y CD2- ha mostrado que la población de células CD2+ tiene baja proporción en sangre periférica de animales jóvenes y alta en bazo; en contraste la población de células CD2- es alta en sangre periférica y baja en órganos linfoides. Varley (1995) ha establecido que la expresión de CD2 para

linfocitos porcinos revela un patrón único de distribución celular (homing), esto implica que la expresión de CD2 podría ser indicio de la migración a órganos linfoides para repoblarlos o bien que algunos linfocitos maduren en sitios extratímicos. Además, Williams (1993) ha reportado que linfocitos calostrales absorbidos por el neonatos se localizan en hígado, pulmón, nódulos linfoides, bazo y tejido gastrointestinal a partir de la primera semana de vida. Estos investigadores han sugerido que los linfocitos derivados de calostro contribuyen a la inmunidad mediada por células de un sistema inmunológico en desarrollo.

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgA E IgM.

Por lo que respecta a la determinación de anticuerpos se decidió realizar mediante la técnica de ELISA ya que aunque la concentración de inmunoglobulinas se ha determinado principalmente por inmunodifusión radial (RDI) para estudios con suero de cerdos, esta técnica tiene varias restricciones, estas incluyen la disponibilidad y calidad de antisuero policlonal específico, en contraste, la ELISA en combinación con anticuerpos monoclonales (mAb) definidos ofrece condiciones de ensayo reproducibles (Bianchi, 1995).

Se planteó la detección de IgA e IgM debido a que estos isotipos ofrecen evaluar la respuesta inmunológica humoral de los lechones como una opción en la cual no intervengan isotipos de inmunoglobulinas externos como los que representa la IgG calostrales. Los resultados aquí obtenidos muestran niveles de

inmunoglobulinas IgA e IgM los cuales no fueron modificados por los tratamientos aplicados ni por el tiempo.

Un reciente trabajo reportó el efecto del FT sobre la respuesta humoral en cerdos vacunados con el virus de Aujeszky en el cual se probó que el FT no promueve un incremento de anticuerpos neutralizantes séricos (Calzada, 2000). Hammerberg y col (1989) han determinado que las células B del neonato son competentes sugiriendo entonces una deficiencia en componentes de células T la cual el FT exógeno no corrige. Por otra parte es probable que la cantidad de factor de transferencia de origen calostrual (Outteridge y Dufty, 1981) que pueda modular a un sistema inmunológico en proceso de maduración sea la adecuada; de ser así, el FT endógeno administrado no representa un modulador importante que logre competir suficientemente para lograr un efecto diferente al posiblemente producido en animales que pudieran estar desprovistos de calostro. Lamentablemente esta consideración no fue prevista en el diseño de este experimento.

Por otra parte, se piensa que el antígeno seleccionado para la determinación de anticuerpos no fue el óptimo. Las cerdas habían recibido una vacunación previa al parto con el antígeno al cual los lechones fueron vacunados. Resultaba crucial la determinación de IgG específicas en el suero de la madre y en calostro con el fin de inferir que los anticuerpos que llegan a circulación periférica del lechón puedan evitar el desafío antigénico necesario para lograr una respuesta humoral. Klobasa y Col. (1986) reportan que la inmunidad pasiva adquirida dada por los anticuerpos

maternales vía calostro y leche suprimen la secreción y circulación de anticuerpos. Esta situación pudo provocar que el lechón no desarrollara la capacidad de producir anticuerpos propios detectables por ELISA. Adicionalmente, Francis y col. señalan que esta supresión se debe al título de anticuerpos maternales presentes en los lechones al momento de la vacunación y que está perdura hasta la segunda e inclusive hasta la cuarta semana de edad del lechón. En los lechones nacidos de madres vacunadas, los anticuerpos por ella producidos tienen un efecto supresor sobre la vacunación temprana (Francis y Black, 1986), por esto la estrategia de vacunación utilizada en este trabajo pudo no tener el éxito deseado aún con la presencia del FT.

Lo que se sugiere es repetir el experimento considerando la utilización de un antígeno que la madre no conozca y el lechón no posea anticuerpos contra este, además de considerar los posibles mecanismos de acción que se han sugerido para el FT y de esta forma conseguir un resultado satisfactorio, ya que como se ha mostrado en todos los resultados obtenidos en este trabajo el FT no tiene la capacidad de ayudar a la maduración del sistema inmunológico del lechón, al menos en las condiciones experimentales aquí manejadas.

CONTEO DIFERENCIAL Y GANANCIA EN PESO.

Por lo que respecta a las cuentas diferenciales, se observó que las poblaciones de leucocitos no mostraron variaciones con los tratamientos durante el experimento ya que los porcentajes de las diferentes poblaciones de células

sanguíneas entre el día 2 y el día 28 de edad fueron similares (ver figura 7.10). Estos resultados coinciden con los reportados por Dolores González y col., 1993 quienes evaluaron el perfil inmunológico en lechones neonatales y tampoco encontraron variaciones significativas en el porcentaje de células sanguíneas. Además, comparando nuestros resultados con los valores estándar reportados para cerdos no se observaron variaciones con respecto a los valores normales para linfocitos, neutrófilos y monocitos (Helmunt Kraft, 1998).

El hecho que hay que resaltar es que al día 7 del experimento se observa que los neutrófilos disminuyeron ($p < 0.05$) y los monocitos disminuyeron al día 16 y 28 ($p < 0.05$) sin importar el tratamiento administrado *in vivo*

Finalmente se determinó el incremento en peso para establecer si el tratamiento *in vivo* con FT ayudaba en este aspecto y no se obtuvo ningún incremento (en porcentaje) obtenido semanalmente durante el experimento. El incremento de peso pudiera ser considerada como una medida indirecta del estado en que se encuentre el animal y si en los parámetros inmunológicos no se observó un efecto del FT, quizá por que los condición del animal era buena, entonces resulta lógico que tampoco la ganancia de peso se viera modificada.

El conteo diferencial y el incremento de peso semanal solo se tomaron como medida para evaluar el desarrollo del animal durante el experimento.

En conclusión, para poder evaluar el posible efecto del tratamiento *in vivo* con FT es necesario utilizar un modelo en el cual se pueda establecer un estado real de supresión del sistema inmunológico como en el caso de la fiebre porcina o

bien, enfermedad de Aujeszky. También es necesario hacer la búsqueda tanto de la dosis indicada, así como del periodo de tratamiento idóneo. Aunque el FT se aplica en pacientes inmunocomprometidos y mejora su condición clínica, no ha sido posible detectar en todos los casos cambios en las valoraciones inmunológicas ni antes, ni después del tratamiento.

Hasta el día de hoy, el mecanismo de acción exacto no ha sido descrito y esto se debe principalmente al desconocimiento de sus componentes. Es claro que aún falta mucho por investigar con respecto al FT, sin embargo, es importante sentar un precedente que sirva de base para futuras investigaciones del uso de FT en medicina veterinaria y que den la pauta para estudiar más profundamente la inmunología del cerdo.

5. CONCLUSIONES.

Bajo las condiciones experimentales llevadas a cabo en este trabajo se puede concluir:

1. El factor de transferencia (FT) no fue mitogénico *per se*, sin embargo fue posible observar una actividad estimuladora cuando los linfocitos de lechones tratados con FT *in vivo* fueron expuestos a dosis no mitogénicas de PHA.
2. El tratamiento *in vivo* con FT a la dosis utilizada por nosotros no provocó cambios en la cantidad de células que expresan CD2, CD4 y CD8 con respecto al grupo control.
3. El tratamiento *in vivo* con FT no provocó cambios en las cuentas diferenciales con respecto al grupo control.
4. El tratamiento *in vivo* con FT no fue capaz de modificar la producción de anticuerpos de isotipo IgA e IgM.

6. ANEXO 1

1. Parámetros hematológicos en el cerdo.

| Parámetro en cerdos | Valores estándar |
|-------------------------------|------------------|
| Hematocrito Vol % | 33-45 |
| Eritrocitos x 10 ⁶ | 5.8-8.1 |
| Leucocitos x mL | 11000-21000 |
| Granulocitos basófilos % | 0-2 |
| Granulocitos eosinofilos % | 0-6 |
| Neutrófilos encallados % | 0-7 |
| Neutrófilos segmentados % | 10-38 |
| Linfocitos % | 49-85 |
| Monocitos % | 2-4 |

Helmunt Kraft "Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos. Ed. Acribia. España 1998. 3° edición.

2. Anticuerpos monoclonales utilizados en la tinción para citometría de flujo.

Las líneas celulares así como las diluciones de los anticuerpos monoclonales utilizadas en este trabajo se muestran a continuación:

| LÍNEA CELULAR | ESPECIFICIDAD | DIL. UTILIZADA | LABORATORIO |
|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| MSA4 | CD2 | 1: 100 | VMRD, Inc. |
| 74-12-4 | CD4 (T helper cell) | 1: 100 | VMRD, Inc. |
| 76-2-11 | CD8 | 1: 50 | VMRD, Inc. |

7. REFERENCIAS

1. Álvarez B., Ezquerro, M., Gómez del Moral, Alonso, F., Táres, J., Marca, J. y Domínguez, J. 1998. Analysis of the *in vitro* effects of the compound inmodulen on several parameters of the pig immune response. Proceedings of the 15th IPVS congress, Birmingham, England, 5-9 July 2: 24
2. Arala, M.P y Fundenberg , H.H. 1976. Specificity of transfer factor. *Nature* 262: 155-156.
3. Becker B.A y Misfeld M.L.1993. Evaluation of the mitogen-induced proliferation and cell surface differentiation antigens of lymphocytes from pigs 1 to 30 days of age. *J. Anim. Sci.* 71: 2073-2078.
4. Binns,R.M. 1982. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3: 95-146 .
5. Binns, R.M., Pabst R. y Licence S.T. 1988. Subpopulations of T lymphocytes emigrating in venous blood draining pig thymus labelled in vivo with fluorochrome. *Immunol.* 63: 261-267.
6. Binns, R.M., Duncan, I.A., Powis, S.J., Hutchings, A. y Butcher, G.W. 1992. Subsets of null and $\gamma\delta$ T-cell receptor T lymphocytes in the blood of young pigs identified by specific monoclonal antibodies. *Immunol.* 77: 219-.
7. Binns, R.M y Pabst R. 1994. Lymphoid and lymphocyte trafficking in the pig, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 79-87.
8. Binns, R.M. 1994. The null/ $\gamma\delta$ TCR⁺ T cell family in pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 69-77.
9. Bianchi, A.T.J., Zwart, R.J., Jeurissen, S.H.M., y Moonen-Leusen, H.W.M.,1992. Development of the B and T cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life and immunohistological approach *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33: 201-221
10. Bianchi, A.T.J., Moonen-Leusen, H.W.M, Van Der Heijden, P.J. y Bokhout, B.A. 1995. The use of a double antibody sandwich ELISA and monoclonal antibodies for the assessment of porcine IgM, IgG and IgA concentrations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 309-317.
11. Blecha, F., y Kelly, K.W. 1981. Effects of cold and weaning stressors on the antibody-mediated immune response of pigs. *J. Anim. Sci.* 53 439-447.

12. Blecha, F., Pollmann, D.S. y Nicholls, D.A. 1983. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. *J. Anim. Sci.* 56: 396-400.
13. Blecha, F., Boyles, S.L y Railey, G.J. 1984. Shipping suppresses lymphocyte blastogenic response in angus and Brahman angus feeder calves. *J. Anim. Sci.* 59: 576-583.
14. Blecha, F., Pollmann, D.S. y Kluber, E.F. 1986. Decrease mononuclear cell response to mitogens in artificially reared neonatal pigs. *Can. Vet. Res.* 50: 522-525.
15. Blecha, F. 1988 Immunomodulation: A means of disease prevention in stressed livestock. *J. Anim. Sci.* 66: 2084-2090.
16. Blecha, F., Reddy, D.N., Chitko-McKown, C.G., McVey, D.S., Chengappa, M.M., Goodband, R.D. y Nelssen, J.L. 1995. Influence of recombinant bovine interleukin 1a and interleukin-2 in pigs vaccinated and challenged with *Streptococcus suis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 329-346.
17. Bohl, E.H. y Saif, L.J. 1980. Passive immunity against enteric viral infections of piglets. In: The mucosal immune system. Proceedings of a seminar in the EEC programme of coordination of agricultural research on protection of the young animal against perinatal diseases. September 9-11, 1980 (Ed F.J. Bourne). Martinus Nijhoff Publishers. Bristol, UK, pp.259-282.
18. Brambell, F.W.R. 1970. The transmission of passive immunity from mother to young. North-Holland, Amsterdam, pp. 385.
19. Brown-Borg, H.M., Klemcke, H.G and Blecha, F. 1993. Lymphocyte proliferation responses in neonatal pigs with high or low plasma cortisol concentration after stress induced by restraint. *Am. J. Vet. Res.* 54: 2015-2020.
20. Brunner, C.J. y Muscoplat, C.C 1980. Immunomodulatory effects of levamisol. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 1159-1162.
21. Binns, W.P.H. 1989. The null T cell in pig blood is not an NK cell. *Immunol.* 68: 392-395.
22. Butler, J.E. y Brown, W.R. 1994. The immunoglobulins and immunoglobulins genes of swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 5-12.

23. Cabezas-Quiroga, R., Estrada-Parra, S., Padierna, L., Fernández C. y López, P. 1990. inmunoterapia con factor de transferencia en pacientes con herpes zoster. *Biotecnología Aplicada* 7: 52-57.
24. Calzada, N.G. 2000. Uso en lechones de factor de transferencia y parapoxvirus inactivado (Baypamun) en la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky. Tesis de Maestría. ENCB- IPN. México, D.F. pp.36.
25. Charles, H. y Kirkpatrick, M.D. 1989. Biological response modifiers. Interferons, interleukins and transfer factor. *Annals of allergy*. 62: 170-176.
26. Chappuis, G. 1998. Neonatal immunity and immunisation in early age: lesson from veterinary medicine. *Vaccine*. 16(14-15): 1468-1472.
27. Coffey, R.G y Hadden, J.W. 1985. Neurotransmitters, hormones and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation. *Trends in pharmacological sciences*. 14: 169-174.
28. Confer, A.W. y Aldinger, W.K. 1981. The *in vivo* effect of levamisol on PHA stimulation in normal and Marek´s disease virus inoculated chickens. *Res. Vet. Sci.* 30: 243-245.
29. Curtis, J. y Bourne, F.J. 1971. Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochim. Biophys. Acta*. 236: 319-332.
30. Chung, V., Florentin, I. y Renoux, G. 1985. Effect of imuthiol administration to normal or immunodeficient mice on IL-1 and IL-2 production and immune responses regulated by these mediators. *Int. J. Immunopharmacol.* 7: 335-339.
31. Davis, W. C., Zuckermann, F. A., Hamilton, M.J., Barbosa, J.I; Salmüller, A., Binns, R.M. y License, S.T. 1998. Analysis of monoclonal antibodies that recognize $\gamma\delta$ /T Null cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60: 305-316.
32. Dawer, J.M 1996. Transfer factor in the age of molecular biology: a review. *Biotherapy*. 9(1-3):7-11
33. English, P.R. y Morrison, V. 1984. Causes and prevention of piglet mortality. *Pig News Info.*, 5: 369.
34. Estrada-Parra, S., Nagaya, A., Serrano, E., Rodríguez, O., Santamaría, V., Ondarza, R., Chávez, R., Correa, A., Monjes, A., Cabezas, R., y Estrada –

- García I. 1998. Comparative study of transfer factor and aciclovir in the treatment of herpes zoster. *Int. J. Immunopharm.* 20: 521-535.
35. Evans, P.A., Newby, T.J., Stokes, C.R. y Bourne, F.J. 1982. Study of cells in the mammary secretions of the sow. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3: 515-527.
36. Fernández, R.T Evaluación del efecto del Factor de transferencia mediante pruebas *in vitro*. Tesis de licenciatura. ENCB-IPN, México, D.F. 1985.
37. Fitch, F.W., Lancki, D.W. y Gajewski, T.F. 1993. T-cell mediated immune regulation. In: W.E. Paul, *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, pp. 733-761
38. Flores, C.R., Mateos, R.A., Posadas, M.E., Retana, R.A., Ordoñez, B.L. y Arvizu, U.R. 1992. El factor de transferencia como biológico en la inmunoterapia de becerros lactantes clínicamente enfermos. *Vet. Mex.* XXIII 4: 309-313.
39. Flesh, J., Hariel, W. y Nelken, D. 1982. Immunopotentiating effect of levamisol in the prevention of bovine mastitis fetal death and endometritis. *Veterinary record.* 111(3): 56-57.
40. Francis, M.J y Black, L. 1986. Response of young pigs to foot-and-mouth disease oil emulsion vaccination in the presence and absence of maternally derived neutralising antibodies. *Res. Vet. Sci.* 41(1): 33-39
41. Fudenberg H.H. 1989. Transfer factor: Past, present and future. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 29: 475-516
42. Fudenberg H.H y Pizza G. 1993. Transfer factor 1993: *New frontiers. Progress in Drug Research.* 42: 309-400.
43. Gottlieb A.A, Sizemore R.C, Gottlieb M.S y Kern C.H. 1995. Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease. *Biotherapy.* 9: 27-31.
44. Gaskins, H. R. y Kelly, K.W. 1995. Immunology and neonatal mortality. In Varley, MA. ed. The neonatal pig. Development and survival. Wallinford U.K; CAB International, pp. 39-49.
45. González, V.D., Cisneros, M.I., Vega L.M.A., y Morilla, G.A. 1993. Perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras 10 semanas de edad. *Vet. Mex.* 24(3): 217-221.

46. Hammerberg, C., Schuring, G.G y Ochs, D.L. 1989. Immunodeficiency in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 869-874.
47. Hennessy, K. J., Blecha, F., Pollmann, D.S. y Kluber. E.F. 1987. Isoprinosine y levamisol immunomodulation in artificially reared neonatal pigs. *Am J. Vet. Res.* 48: 477-480.
48. Helmunt Kraft "Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos. Ed. Acribia. España 1998. 3º edición.
49. Hirt, W., Saalmuller, A. y Reddehase, M.J. 1990. Distinct γ/δ T cell receptor define two subsets of circulating porcine CD2-CD4-CD8 T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 20: 265-269.
50. Holland, R.E. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 345-375.
51. Hoskinson, C.D., Chew, B:P. y Wong, T.S. 1990. Age-related changes in mitogen induced lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function In piglet. *J. Anim. Sci.* 68: 2471-2478.
52. Kim, Y.B. y Ichimura, O. 1986. Porcine natural killer (NK)/Killer (K) cell system. In: *The swine in biomedical research.* (ed.M.E Tumbleson). Plenum Press, NY, pp.1811.
53. Kirkpatrick, C.H. y Gallin, J.I. 1974. Treatment of infections and Neoplastic diseases with transfer factor. *Oncology* 29: 46-73.
54. Kirkpatrick C.H, Rozzo, S.J y Mascali, J.J. 1985. Murine transfer factor II. Transfer of delayed hypersensitivity to synthetic antigens. *J Immunol* 134: 1723-1727.
55. Kirkpatrick C.H, Rozzo, S.J. y Mascali, J.J. 1985. Murine transfer factor III. Specific Interactions between transfer factor antigen. *J Immunol* 135: 4027-4033.
56. Kirkpatrick C.H. 1988. Transfer factor. *J.Aller Clin Immunol* 81: 803-813.
57. Kirkpatrick C.H y Rozzo S.J. 1992. Purification of transfer factors. *Mol. Immunol* 29: 167-182.
58. Kirkpatrick C.H. 1993. Structural nature and functions of transfer factors. *Ann NY Acad. Sci* 685: 362

59. Kirkpatrick, C.H, Hamad, R y Morton, LC 1995. Murine transfer factors. Dose response relationships and routes of administration. *Cell Immunol* 164: 203-206.
60. Kirkpatrick, C.H. 2000. Transfer Factor: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Mol. Med.* 6: 332-341.
61. Klobasa, F., Butler, J.E., Werham, F. y Habe, F. 1986. Maternal-neonatal immunoregulation in swine II. Influence of multiparty *on novo* immunoglobulin synthesis by piglets. *Vet Immunol. Immunopathol.* 11(2): 149-159.
62. Lawrence, H, S. 1949. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71: 516-522.
63. Lawrence, H.S.1954. The transfer factor in humans of delayed skin sensitivity to the streptococcal M substance and tuberculin with disrupted leucocytes. *J- Clin. Invest.* 64: 219-230.
64. Lawrence, H, S. 1955. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J. Clin. Invest.* 34: 219-230.
65. Le Jan, Chevaleyre, C.1996. Reduced expression of SLA Class I antigens by intestinal epithelium of newborn piglets. *Vet. Immunol.Immunopathol.* 50: 167-172.
66. Licence S.T., y Binns, R.M. 1995. Major long-term changes in $\gamma\delta$ T cell receptor positive and CD2+ T cells subsets after thymectomy in the pig: longitudinal study lasting nearly 2 years. *Immunol.* 85: 267-284.
67. License, S.T., Davis, W.C., Carr, M.N y Binns, R.M. 1995. The behavior of monoclonal antibodies in the first international pig CD workshop reacting with $\gamma\delta$ / Null T lymphocytes in the blood of SLAB/B line pig. *Vet Immunol Immunopathol.* 47: 253-271.
68. López, A.J. El factor de transferencia como biológico en la inmunoterapia en becerros que presentan un cuadro clínico respiratorio, Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot Universidad Nacional Autónoma de México, México ,D.F., 1989.

69. Lunney, J.K., Walker;K., Goldman,T., Aasted, B., Bianchi, A, Binns, R., Licences, S., Bischof, R., Brandon, M. y Blecha, F. 1994. Overview of the first International Workshop to define swine leukocytes cluster of differentiation (CD) antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 193-206
70. Lunney, J-K. . y Pescovitz, M.D. 1987. Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17:135-144.
71. Mateos, R.A. 1992. Transfer factor immunotherapy in clinically sick lactating calves. *Vet. Mex. (Oct-Dic)* 23: 4-8.
72. Magnusson, U. y Fossum C. 1988. Variations in number and functional capacity of blood mononuclear cells during the peripartal period in the gilt. *J. Vet. Med. B.* 49: 856-859.
73. Mulcahy, G. y Quinn P.J. 1986. A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 9: 119-139
74. McCauley, P.E. y Hartmann, P.E. 1984a. Changes in the proportion and absolute number of T lymphocytes in piglets from birth until after weaning and in adults. *Res. Vet. Sci.* 37: 52-57.
75. McCauley, P.E. y Hartmann, P.E. 1984b. Changes in piglets leucocytes, B-lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. *Res. Vet. Sci.* 37: 234-241.
76. Morilla, A. Non-specific immunologic protection of the diarrheic syndrome of suckling pigs. In *Biotechnology in the Feed Industry*. Edited by Lyons, T.P., 2411-2601. *Alltech Technical publications*. Kentucky, 1990.
77. Murtaugh, M.P. 1994 Porcine cytokines *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 37-44.
78. Murgita, R.A. y Wigzell, H. 1981. Regulation of immune functions in the fetus and newborn. *Progress in allergy* 29:54-133.
79. Nakajima, K., Smith, C.V., Mixon,A., Sykes, M., Guzzeta, P.C., Spitzer, T.R. y Sachs, D.H. 1992. In vitro and in vivo effects of recombinant human interleukin-2 in naive miniature swine. *J. immunotherap.* 11: 169:175.

80. Namioka, S., Kumeda, Y., Kawano, T., Wang, T., Namba, Y. y Murakami, K.(1982). The influence of immunopotentiators on sucking piglets with special reference to the incidence of pig scour. *Br. Vet. J.* 138: 155-167.
81. Navarro-Cruz., Serrano-Miranda E., Estrada-Parra, S., Teran-Ortiz L., Gómez-Vera, J., Flores- Sandoval G. 1996. factor de Transferencia en dermatitis atópica moderada y severa. *Revista Alergia México XLIII* 5: 116-123.
82. Olsen, R.G. y Krakowa, S. Inmunología e inmunopatología de animales domésticos. El manual moderno, México, D.F. 1983.
83. Outteridge,P.M. , Binns, R.M. y Licence S.T. 1982. Subpopulations of pig blood E-rosette-forming lymphocytes and thymus-dependent null cells; separation by nylon wool columns, rosette formation and macrophage-dependent mitogen and antigen responsiveness. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 67: 18-24.
84. Outteridge, P.M. y Dufty, J.H. 1981. Surface markers for characterization of bovine blood lymphocytes population and changes in these from birth to maturity. *Res. Vet. Sci.* 31: 315-322.
85. Padierna, J., Velasco,C.O. y Estrada, P.S. Obtención de factor de transferencia específico para el tratamiento de pacientes con coccidioidomicosis. Memorias del primer congreso Nacional de Inmunología. Oaxtepec, Morelos, México 1967. 101-104. Sociedad Mexicana de Inmunología.
86. Pedraza, M. 2001. Empleo de FT de origen porcino como agente inmunoterapéutico en glioma. Tesis de licenciatura. ENCB-IPN. México D.F.
87. Pérez T. 2001. Efecto de los DLE'S sobre células mononucleares de sangre periférica. Tesis de maestría. ENCB-IPN. México D.F.
88. Pescovitz, M:D. Lunney, J.K. y Sachs, D.H. 1985. Murine anti-T4 and T8 monoclonal antibodies: Distribution and effects on proliferation and cytotoxic Tcells *J.Immunol.* 134: 37-44.
89. Pescovitz, M:D., Sakopoulos, A.G., Gaddy, J.A., Husmann, R.J y Zuckermann, F.A. 1994. Porcine peripheral blood CD4⁺/CD8⁺ dual expressing T cell. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 53-62.

90. Pilotti, V., Mastrorilli, M., Pizza, G., De Vinci C., palareti, A y Cavallari, A.1996. Transfer factor as an adjuvant to non- small lung cancer (NSCLC) therapy. *Biotherapy*. 9:117-121
91. Pinto A. y Ferguson F. 1988. Characteristic of Yorkshire swine Natural Killer cells *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20: 15-29.
92. Poli, G. 1984. Immunomodulators In Adjuvants, interferon and non-specific immunity. Ed. Cancellotti, F.M. and Galassi New York. pp.111-126.
93. Renoux, G. y Renoux, M. 1984. Diethyldithiocarbamate (dte) a biological augmenting agent specific for T cell In: R.L, Fenichel and M.A Chirigos (Ed.) Immune Modulation Agents and Their Mechanisms pp 7-20. Marcel Dekker, Inc NY.
94. Renoux G 1986. The ten commandments for immunotherapeutic drugs at the example of sulfur-containing agents. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.* 9:121-129.
95. Rivera. E.R., Armstrong, W.D., Clawson, A.J. y Linnerud, A.C. 1978. Effect of dietary oats and kaolin on performance and incidence of diarrhea of weaning pigs. *J. Anim. Sci.* 46: 1685-1693.
96. Rojas, B.S. 1987. Uso de suero hiperinmune y del factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colibacilosis neonatal en lechones. Tesis de licenciatura. FMVZ. UNAM, México. D.F.
97. Rodríguez, F.A. 2000. Efecto terapéutico del FT en el tratamiento de pacientes con dermatitis atópica severa. Tesis de licenciatura. ENCB-IPN. México. D.F.
98. Roth, J.A. 1999. Immune System. In Straw, B.E., D'Allaire, S., mengeling, W.L y Taylor, D.J. Eds. Diseases of Swine. Iowa USA: Iowa, USA State University Press.5(56):799-820.
100. Rothkötter, H.J., Ulbrich,,H. y Pabst, R.1991. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatr. Res.* 29: 273-241.
101. Saalmüller, A., Hirt, W. y Reddehase, M. 1989. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4+ CD8+ porcine T lymphocytes. *Eur. J.Immunol.* 19: 2011-2016

102. Saalmüller, A. y Bryant, J. 1994. Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. *Vet- Immunol. Immunopathol.* 43: 45-52.
103. Sauliner, D., Martinod, S. y Charley, B. 1991. Immunomodulatory effects in vivo of recombinant porcine interferon- γ on leukocyte functions of immunosuppressed pigs. *Annales de Recherches Vétérinaires.* 22: 1-9.
104. Seeling, L. L., Jr. 1980. Dynamics of leucocytes in rat mammary epithelium during pregnancy and lactation. *Biol. Report.* 22: 1211-1225.
105. Stokes, C.R., y Bourne, J.F. 1989. Mucosal immunity. In: Halliwell, R.E.W. (ed). *Veterinary Clinical Immunology.* Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, pp. 164-192.
106. Schwager J. y Schulze J. 1997. Maturation of mitogen responsiveness, and IL2 and IL6 production by neonatal swine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57 (1-2): 105-119
107. Sugauma, A; Ishizuka A.; Sakiyama, Maede Y Namioka, S. 1986. B lymphocytes differentiation and suppressor activity by T lymphocytes derived from neonatal and suckling piglets. *Res. Vet. Sci.* 40: 400-405.
108. Symons, D.B.A y Clarkson, C.A. 1979. Acinetobacter and E. Coli lipopolisaccharide preparations comparative mitogenicity and induction *in vitro* of immunoglobulin synthesis in adult and neonatal pig lymphocytes. *Immunology.* 38: 601-607.
109. Symons, D.B.A, Clarkson, C.A y Binns, R.M. 1983. Antibody response to dinitrophenil hapten by fetal, neonatal and young pigs. *Immunology.* 48: 703-711.
110. Torres, M.H. 1994. Efecto del factor de transferencia específico en contra de *A. Pleuropneumoniae* serotipo 5 y *P. Multicida* A en cerdos. Tesis de licenciatura. FMVZ. UNAM. México D.F.
111. Tlaskalova-Hogenova, Mendel, H., Trebichavsky, Y., Koravu, F., Barot, R y Sterzl, J. 1994. Development of immune response in early pig ontogeny. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 35-142.
112. Thome, M., Hirt, W. y Pfaff, E. 1994. Porcine T-cell receptors: molecular and biochemical characterization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 13-17.

113. Tuboly, S.S, Bernath, R., Glavitis, R. y Medveczky, I. 1988. Intestinal absorption of calostrical lymphoid cells in newborn piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20: 75-85.
114. Tyler, J.W., Cullor, J.S., Thurmond, M.C., Douglas, V.L., y Parker, K.M. 1990. Immunologic factors related to survival and performance of neonatal swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 51: 400-405.
115. Valpotic, I., Gerencer, M y Basic, I. 1989. *in vitro* modulating effect on porcine immunoglobulin G on mitogen-induced lymphocyte response in precolostral, suckling and weaned piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22: 113-122.
116. Vanderbark, A.A., Burger, D.R. y Veto, R.M 1977. Human transfer factor activity in the guinea pig. Absence of antigen specific. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 8: 7-16.
117. Varley, M.A. 1995. The Neonatal Pig. Development and survival. Cab International (ed.). U.K. 1-55 pp.
118. Vega-López, M.A, Telemo, E., Bailey, M. y Stokes, C.R. 1993. Immune cell distribution in the small intestine of pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37: 49-60.
119. Vega-López M.A, Telemo, E., Bailey, M. y Stokes, C.R. 1995. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet Immunol. Immunopathol.* 44: 319-327.
120. Vega, G.M. Efecto del factor de transferencia sobre la respuesta inmune celular en becerros lactantes. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot UNAM, México, D.F., 1989.
121. Viza, D., Vich, J.M., Rosenfeld, F y Davies, D.A. 1986. Specific transfer factor protects mice against letal challenge with Herpes simples virus. *Cell Immunol.* 100: 555-562.
122. Wattranng E, Wallgren P, Lindberg A y Fosum C. 1998. Signs of infections and reduced immune functions at weaning of conventionally reared and specific pathogen free pigs. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 45:7-17.

123. Weström, B.R., Ohlsson, B.G., Svendsen, J., Tagesson, C y Karlsson, B.W. 1985. Intestinal transmission of macromolecules (BSA and FITC-Dextran) in neonatal pig: enhancing effect of colostrum, proteins and proteinase inhibitors. *Biol. Neonate*. 47: 357-366.
124. Williams, P. 1993. Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostral leukocytes by neonatal pigs, *Can. J.Vet. Res.* 58: 1-8.
125. Wilson, G., Welch, T. y Fudenberg, H. 1976. Human transfer factor in guinea pigs: partial purification of the active component. In *Transfer Factor: Basic Properties and Clinical Applications*, ed.M. S. Ascher, A.A. Gottlieb, C.H., Kirkpatrick, New York Academic Press. pp. 409-423.
126. Wilson, G.B. 1988. De Novo initiation of specific cell-mediated immune responsiveness in chickens by transfer factor (specific immunity inducers) obtained from bovine colostrums and milk. *Acta Virol.* 32: 6-18.
127. Zapata, J.D., Saúl, A., Roque, J., Padierna, J., Rojas, E.O., Jimenez, L. y Estrada, P.S. 1981. Immunotherapy of two leprosy patients with specific transfer factor. National Congress of Immunology. Abstrac IV. Oaxtepec. Morelos, México, D.F.
128. Zimmerman, J., Wastrong, E.A y Ion, K. 2000. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral. Immunol.* 13(3): 383-397.
129. Zuckerman, F.A, y Husmann, R.J. 1996a. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. *Immunol.* 87: 500-512.
130. Zuckerman, F.A y Gaskin, H.R. 1996b. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues *Immunol.* 87: 493-499.