



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**“DETERMINACIÓN DE LOS LINFOCITOS B Y T
EN ÓRGANOS LINFOIDES DE CERDOS
RECIÉN NACIDOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

MARIANA CORDERO HERNÁNDEZ

**ASESOR: M EN C CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE
COASESOR: M EN C CRISÓFORO MERCADO MÁRQUEZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

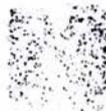


SECRETARÍA NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN



MARZO 2004
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Determinación de linfocitos B y T en órganos
linfoides de cerdos recién nacidos.

que presenta la pasante: Mariana Cordero Hernández
con número de cuenta: 9512316-7 para obtener el título de
Medica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Marzo de 2004

PRESIDENTE M en C Carlos Ignacio Soto Zárate

VOCAL MVZ. Raúl García Tinajero

SECRETARIO MVZ. Román Javier Martínez Ramírez

PRIMER SUPLENTE M en C Juan Sebastián Barrientos Padilla

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

Ma. Del Rosario Hernández Acosta y Alejandro Cordero Pérez.

Por todo el apoyo y el cariño que me brindaron a lo largo de la carrera y durante la realización de este trabajo. Han sido y serán un ejemplo para superarme día a día.

A mis hermanos.

Alejandro, Rosario y Pablo.

Que además de ser mis hermanos son mis amigos y siempre han confiado en mí.

A mis sobrinos.

Paulette, Cristina y Emiliano.

Porque son mis hermanos menores a quienes amo y espero servir de ejemplo para que sean mejores aún.

A mis amigos.

Prefiero no mencionarlos porque se me puede olvidar alguien, pero ellos saben a quienes me refiero, aquellos que me brindaron su amistad sin esperar algo a cambio.

A mis asesores.

Carlos Ignacio Soto Zárate y Crisóforo Mercado Márquez.

Gracias por su ayuda, sus conocimientos y la paciencia que me brindaron.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo de:

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT): Proyecto "Análisis de proteínas relacionadas a los rearrreglos del citoesqueleto de actina durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena" (IN202301) y Catedra de Investigación "Morfología Veterinaria y Biología Celular". Sección de Ciencias Morfológicas Agropecuarias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Tipos de inmunidad.....	3
1.1.1 Inmunidad Innata.....	3
1.1.2 Inmunidad Adaptativa.....	3
1.1.3 Inmunidad Humoral.....	4
1.1.4 Inmunidad Celular.....	4
1.2 Órganos linfoides.....	6
1.2.1 Órganos linfoides primarios.....	6
1.2.2 Órganos linfoides secundarios.....	7
1.3 Células del tejido linfoide.....	10
1.3.1 Linfocitos.....	10
1.3.2 Linfocitos B.....	10
1.3.3 Linfocitos T.....	11
1.3.4 Marcadores de las células B y células T.....	11
1.4 Sistema inmune del cerdo recién nacido.....	13
1.5 Enfermedades que pueden afectar al recién nacido.....	14
2. Objetivos.....	15
3. Material y métodos.....	16
4. Resultados.....	20
5. Discusión.....	31
6. Conclusiones.....	34
7. Anexo (Soluciones).....	36
8. Bibliografía.....	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Citocinas de las células linfoides (interleucinas).....	5
Tabla 2. Distribución y función de los marcadores (CD) de las células T.....	12
Tabla 3. Distribución y función de los marcadores (CD) de las células B.....	13
Tabla 4. Localización y cuantificación de los linfocitos B.....	29
Tabla 5. Localización y cuantificación de los linfocitos T.....	29

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Timo.....	21
Figura 2. Bazo.....	22
Figura 3. Yeyuno.....	24
Figura 4. Íleon.....	25
Figura 5. Linfonodo Mesentérico.....	27
Figura 6. Linfonodo Cervical Superficial.....	26
Figura 7. Conteo de linfocitos B y T.....	30

RESUMEN

Con el fin de conocer la cantidad de linfocitos B y T presentes en los órganos linfoides de lechones recién nacidos, recolectamos muestras de; timo, bazo, yeyuno, íleon, linfonodo mesentérico y linfonodo cervical superficial en cinco lechones de dos días de nacidos provenientes de una granja comercial. Todas las muestras siguieron dos procesos; inclusión en parafina y corte por congelación. En los cortes procesados por inclusión en parafina realizamos la tinción de rutina con H-E y la tinción con verde metil pironina (VMP) para identificar a los linfocitos B activados, mientras que las muestras procesadas por congelación fueron usadas para detectar a los linfocitos T mediante inmunohistoquímica con el uso de un anticuerpo marcador murino anti-CD3. El promedio de linfocitos B presentes en las preparaciones teñidas con VMP fueron; timo (1.0), bazo (3.8), yeyuno (2.2), íleon (3.9), linfonodo mesentérico (4.4) y linfonodo cervical superficial (2.5). Con la aplicación del anticuerpo murino anti-CD3 de humano determinamos la cantidad de linfocitos T presentes en los órganos estudiados; timo (37.7), bazo (18.1), yeyuno (23.0), íleon (17.0), linfonodo mesentérico (15.4) y linfonodo cervical superficial (18.1). Con el fin de determinar la distribución de los linfocitos en los órganos estudiados evaluamos la cantidad de linfocitos periarteriolares en timo (15.7), bazo (16.3), linfonodo mesentérico (15.2) y linfonodo cervical superficial (14.9). También determinamos el número de domos y de linfocitos intraepiteliales; encontramos 17.6 y 17.2 domos en yeyuno e íleon, mientras que el número de linfocitos intraepiteliales fue de 12 y 15.4, respectivamente. En todos los órganos estudiados encontramos una menor cantidad de linfocitos B en comparación con los linfocitos T, sin embargo este resultado es preliminar y puede ser atribuido, en parte, a los métodos utilizados. Corroboramos la presencia de una menor cantidad de linfocitos T y B en los órganos linfoides de lechones recién nacidos (dos días de edad, en este estudio). La cantidad de linfocitos B y T encontrada en íleon fue similar a la presente en el linfonodo mesentérico y esto lo atribuimos a su relación anatómica. El número de linfocitos B y T presentes en estructuras linfoides relacionadas con el aparato digestivo (yeyuno, íleon y linfonodo mesentérico) fue similar al encontrado en órganos linfoides relacionados con un

estado sistémico (bazo y linfonodo cervical superficial) donde podría esperarse la presencia de un mayor número de células, este resultado sugiere que los linfocitos de los animales estudiados presentaban una aparente disminución en su capacidad de proliferación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TIPOS DE INMUNIDAD

1.1.1 Inmunidad innata

Está formada por barreras físicas, factores humorales y algunas respuestas celulares (Halliwell, 1989; Roth, 1999). Dentro de las barreras físicas encontramos a la piel y a las mucosas, que en conjunto se oponen a la penetración de los agentes patógenos (Halliwell, 1989). En asociación con estas barreras actúan, a diferentes niveles, algunos factores inespecíficos, principalmente enzimas, como la lisozima (Halliwell, 1989; Stites, 1993; Roth, 1999).

Los factores humorales constituyen una parte integral e importante del sistema inmune innato (Roitt, 2001). Aquí tenemos a las proteínas plasmáticas del sistema del complemento, a las proteínas de fase aguda y a los diferentes tipos de interferón (Stites, 1993; Gartner, 2002). Además de contribuir a la eliminación directa de agentes patógenos, algunos de estos factores estimulan la migración de células inflamatorias al punto del tejido donde se localiza la agresión (Roth, 1999).

1.1.2 Inmunidad adaptativa

En el cerdo, como en el resto de las especies domésticas, este tipo de inmunidad tiene a su cargo eliminar las amenazas provocadas por los microorganismos invasores. Esta inmunidad muestra cuatro propiedades: especificidad, diversidad, memoria y reconocimiento de lo propio. Los linfocitos T, los linfocitos B y las células presentadoras de antígeno inician y participan en este tipo de respuesta inmune (Gartner, 2002). La participación de estas células es esencial en todas las respuestas adaptativas, ya que reconocen de forma específica patógenos individuales, independientemente de que estos se localicen en el interior de las células del huésped o en el exterior de las mismas, en los líquidos tisulares o en la sangre (Roitt, 2001). La respuesta inmune adaptativa tiene la capacidad de responder con mayor eficacia y rapidez a exposiciones subsecuentes con el mismo agente, lo cual se conoce como capacidad de memoria (Halliwell, 1989).

La respuesta inmune adaptativa es el resultado de una serie de procesos complejos pero altamente organizados que implican la producción de interacciones linfocitarias como consecuencia del reconocimiento del antígeno específico. Dichos procesos dan lugar a la producción de inmunoglobulinas (anticuerpos) o a la acumulación de linfocitos (T y/o B) y células inflamatorias (neutrófilos, etc.). Estos dos diferentes tipos de respuesta han sido denominadas clásicamente como; inmunidad humoral e inmunidad mediada por células, ya que se creía que se trataba de entidades totalmente separadas (Halliwell, 1989). Hoy sabemos que ambos tipos de respuesta participan de manera conjunta, sin embargo su estudio por separado facilita su comprensión.

1.1.3 Inmunidad Humoral

La inmunidad humoral del cerdo está mediada por anticuerpos de diferentes clases (Halliwell, 1989; Weir, 1999). La producción de anticuerpos requiere de la activación de los linfocitos B y su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Morilla, 1989). Éstos ejercen su función protectora cuando al unirse a un microorganismo lo inmovilizan y facilitan su eliminación por fagocitosis o su lisis por complemento. La actividad de los anticuerpos no siempre es benéfica; en ocasiones, los anticuerpos causan daño en lugar de protección. La interacción entre antígenos y anticuerpos homólogos pueden ser causa de activación del complemento, inflamación y daño tisular (Rojas-Espinosa, 2001).

1.1.4 Inmunidad celular

La respuesta inmune mediada por células es la que depende fundamentalmente de los linfocitos T y en la que los anticuerpos juegan un papel secundario. Las respuestas mediadas por células son difíciles de definir, ya que las defensas del individuo contra el material extraño incluyen la acción coordinada de reacciones humorales y celulares; la producción de inmunoglobulinas depende de los factores generados por los linfocitos T y macrófagos; y las funciones efectoras de varias células dependen de los anticuerpos (Rojas-Espinosa, 2001).

La respuesta inmunitaria celular específica está mediada por dos tipos diferentes de linfocitos T. Las células que tienen la molécula CD8 en su superficie reconocen fragmentos de antígeno en relación con MHC clase I en una célula blanco provocando su lisis. Los linfocitos T que tienen el marcador CD4 en su superficie restringen su reconocimiento a moléculas asociadas al MHC clase II, estas células secretan moléculas activas conocidas como citocinas (interleucinas), cuando son estimuladas por dicho complejo.

Tabla 1. Citocinas de las células linfoides (interleucinas)

Nombre	Origen	Blancos principales
IL-1	Macrófagos	Células Th2 y células B
IL-2	Células Th1, células NK	Células T y células B
IL-3	Células T.	Células hematopoyéticas y germinativas
IL-4	Células Th2	Células T, B y células cebadas
IL-5	Células Th2	Células T y células B
IL-6	Fibroblastos, células T	Células B
IL-7	Células del estroma	Linfocitos inmaduros
IL-8	Macrófagos	Células T, neutrófilos
IL-9	Células Th2	Células T
IL-10	Células Th2 y células B	Células Th 1
IL-11	Células del estroma	Células B
IL-12	Macrófagos y células B	Células Th1 y células NK
IL-13	Células Th2	Células B
IL-14	Células B	Células B
IL-15	Mononucleares	Células T
IL-16	Células T CD8 ⁺	Células T CD4 ⁺
IL-17	Células T CD4 ⁺	Fibroblastos

(Tizard, 1998)

Los linfocitos T CD4 tienen dos actividades principales, ambas mediadas por las citocinas que generan: 1) Ayudan a la eliminación de material extraño al reclutar y activar a otros leucocitos y promover una respuesta inflamatoria y 2) Generan y controlan una respuesta inmune ya que algunas de las citocinas producidas son factores de crecimiento y diferenciación para los linfocitos T y B (Weir, 1999). Algunas de las principales citocinas (interleucinas) se mencionan en la tabla 1.

En el cerdo las células T presentan algunas propiedades exclusivas: 1) un alto porcentaje de células CD4 y CD8 doble positivas; 2) la proporción CD4/CD8 es más baja que en otras especies; 3) las células CD8 expresan preferencialmente antígenos asociados a moléculas MHC clase II. El significado funcional de estas diferencias en la expresión de antígenos en las células T es aún desconocido (Roth, 1999).

1.2 ÓRGANOS LINFOIDES

Con el fin de optimizar su función, las células del sistema inmune se encuentran organizadas en estructuras tisulares agrupadas dentro del sistema linfoide. De acuerdo con su función los órganos involucrados se suelen dividir en órganos linfoides primarios y secundarios. Los primarios son los sitios de producción autónoma de nuevos linfocitos (Cormack, 1988), tienen a su cargo el desarrollo y la transformación de linfocitos en células maduras con capacidad inmunitaria (Gartner, 2002). Los secundarios se encargan de mantener el ambiente apropiado para que las células con capacidad inmunitaria puedan reaccionar entre sí y, también, con antígenos y otras células con el fin de montar una respuesta en contra de antígenos o patógenos invasores (Roitt, 2001; Gartner, 2002).

1.2.1 Órganos Linfoides Primarios

Médula ósea

Es la fuente de elementos hematopoyéticos, incluyendo a los linfocitos, y está localizada principalmente en las cavidades medulares de los huesos largos en desarrollo (Halliwell, 1989). Dicha cavidad está llena por una red de sostén de células primitivas que producen reticulina, colágena y tejido adiposo. Alojados en esta red hay nidos de eritrocitos, granulocitos, monocitos y linfocitos. El tejido está ricamente

abastecido con vasos linfáticos y capilares. Los numerosos linfocitos de la médula ósea se derivan principalmente de divisiones mitóticas de linfoblastocitos o prolinfocitos. Después de un cierto número de divisiones en este sitio, los linfocitos dejan la médula ósea, principalmente por los vasos linfáticos eferentes. Los linfocitos que salen de la médula ósea están programados para realizar un desarrollo posterior en alguno de los dos sitios de localización; a) los linfocitos relacionados con la producción de anticuerpos emigran al bazo y b) aquellos linfocitos relacionados con la inmunidad celular primero deben transitar a través del timo y después a los linfonodos periféricos (Stites, 1993). En los animales domésticos, incluyendo el cerdo, la mayor parte de esta migración celular ocurre antes del nacimiento, por lo que el tejido linfático está bien desarrollado en el animal recién nacido (Halliwell, 1989).

Timo

Es un órgano linfoepitelial que posee una estructura multilobulada, está localizado dentro de la cavidad torácica, desde el borde craneal del corazón hasta la entrada del tórax. El timo alcanza su máximo desarrollo en el animal joven, luego de lo cual emprende una involución progresiva con la edad (Halliwell, 1989).

La parte periférica de cada lobulillo tímico (Adams, 1995) recibe el nombre de corteza y la región central es la médula (Cormack, 1988). En la corteza se agrupan densamente los timocitos inmaduros, intermedios y maduros, también hay infiltración de macrófagos y células dendríticas, aunque la mayor parte de estas últimas están confinadas en la médula (Cormack, 1988; Roitt, 2001). Las células que llegan al timo pasan por una migración que va de la corteza a la médula y, en este proceso, se diferencian; adquieren nuevas funciones y nuevos antígenos de superficie, posteriormente migran del timo a los órganos linfoides secundarios (Stites, 1993).

1.2.2 Órganos Linfoides Secundarios

Son los lugares donde se producen las interacciones celulares que tienen lugar en respuesta a una sensibilización antigénica. Entre ellos se incluyen los linfonodos, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas (TLAM). En general, estas estructuras

están compuestas por poblaciones mixtas de linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas (Halliwell, 1989).

Bazo

El bazo es el órgano linfático cuya estructura facilita las respuestas inmunitarias a antígenos que han llegado a la sangre circulante. El bazo lleva a cabo dos funciones principales; produce anticuerpos humorales contra antígenos presentes en la corriente sanguínea. La segunda función es destruir elementos figurados defectuosos o viejos de la sangre (Cormack, 1988). El parénquima del bazo consta de dos tipos principales de tejido, la pulpa blanca y la pulpa roja (Roitt, 2001). La pulpa blanca está compuesta por la vaina linfática periarterial que aloja células T y nódulos linfoides, que contienen células B; y la zona marginal que aloja células B especializadas en reconocer antígenos independientes del timo. La pulpa roja está compuesta por senos y cordones esplénicos (Gartner, 2002), esta pulpa eritroide sirve como filtro para eritrocitos dañados o envejecidos, y como reserva para la hematopoyesis extramedular (Stites, 1993).

De acuerdo con la proporción de células presentes en este órgano, se describen tres tipos de bazo: de defensa (gran cantidad de tejido linfoide), de almacenamiento (mayor cantidad de trabéculas y fibras musculares y poca pulpa blanca) e intermedio. El cerdo presenta este último tipo aunque las diferencias mencionadas no implican cambios funcionales (Banks, 1996).

Linfonodos

Son estructuras parenquimatosas rodeadas por una cápsula de tejido conectivo colágeno compacto irregular; debajo de la cual se encuentran los senos subcapsulares, con gran cantidad de células dendríticas y macrófagos. Por debajo de ellos, se observa la corteza, la paracorteza y la médula. Los vasos linfáticos aferentes penetran por el hilio y conectan directamente con el seno paratrabecular, que se introduce en el centro del linfonodo y sale por los vasos eferentes situados en la superficie del mismo. La corteza, localizada en posición central en los porcinos, posee folículos distribuidos con una base de tejido conectivo hacia las trabéculas. La

paracorteza contiene a la mayoría de las células T, así como a las vénulas postcapilares. La médula está localizada junto a la paracorteza (Halliwell, 1989). Y a diferencia del resto de las especies domésticas no presenta una población importante de linfocitos pero si una gran cantidad de tejido conectivo. Diversas experiencias han demostrado que la migración de linfocitos a través de la médula es insignificante en el cerdo, lo que pone de manifiesto el carácter tan particular de la recirculación de los linfocitos en esta especie (Morilla, 1989).

Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (TLAM)

En el cerdo los tejidos linfoides de distribución difusa, no encapsulados, de las superficies mucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y urogenital, se denominan en forma colectiva tejido linfoide asociado con mucosas (TLAM). Los mejores ejemplos de estas acumulaciones linfocitarias son; el tejido linfoide asociado con el tracto gastrointestinal (TLAG), el tejido linfoide asociado con los bronquios (TLAB) y las amígdalas (Banks, 1996; Roitt, 2001; Gartner, 2002). El TLAG está constituido por los nódulos linfoides solitarios y los nódulos linfoides agregados (placas de Peyer) que se encuentran predominantemente en la submucosa del colon. Las células linfoides también están distribuidas ampliamente a través de la lámina propia, entre las células epiteliales intestinales y, pocas, en el lumen intestinal. Los nódulos linfoides agregados consisten de agregados linfoides con un folículo central dependiente de célula B y rodeados de regiones dependientes de células T y macrófagos, que sirven como células presentadoras de antígeno. Las células B son heterogéneas y pueden expresar cualquiera de los isotipos de las inmunoglobulinas. Las células T son, predominantemente, reguladoras y citotóxicas. Estas placas tienen linfáticos eferentes que drenan hacia los linfonodos mesentéricos pero no tienen linfáticos aferentes (Stites, 1993). En el tracto gastrointestinal el epitelio que recubre los nódulos linfoides agregados está especializado ya que posee delgadas células M que transportan al antígeno desde la luz intestinal hasta el tejido linfoide (Chu R M, 1979a; Halliwell, 1989; Jepson Mark, 1998).

1.3 Células del tejido linfoide

1.3.1 Linfocitos

En todas las especies domésticas, incluyendo el porcino, la participación de los linfocitos es esencial en todas las respuestas inmunitarias adaptativas, ya que reconocen de forma específica patógenos individuales aún cuando se encuentren en el interior de las células del individuo o en el exterior de las mismas (Roitt, 2001).

Existen dos tipos de linfocitos, las células B y las células T. Estos términos proceden de experimentos de la inmunología que demostraron que, en las aves, un tipo de linfocitos eran madurados en la bolsa de Fabricio (células B), mientras que otro tipo lo hacían en el timo (células T) (Halliwell, 1989).

Los linfocitos son las únicas células capaces de reconocer específicamente a los agentes patógenos y, por tanto, son los encargados de iniciar la respuesta inmune adaptativa. Todos los linfocitos proceden de las células pluripotenciales de la médula ósea, y su maduración se lleva a cabo en el timo para los linfocitos T, mientras que los linfocitos B maduran en la misma médula ósea (Roitt, 2001).

1.3.2 Linfocitos B

Los linfocitos B que se originan y adquieren capacidad inmunitaria en la médula ósea; tienen a su cargo la respuesta inmunitaria humoral (Gartner, 2002). Estos linfocitos nacen de una célula linfoide primordial común, derivada de las células germinales pluripotenciales. En la vida fetal temprana, el hígado es el principal depositario de los progenitores de células B (Stites, 1993). Dada su función de productor de anticuerpos, los linfocitos B maduros no estimulados tienen moléculas de inmunoglobulinas en la superficie de su membrana que funcionan como receptores de antígeno. Estas moléculas de inmunoglobulinas son anticuerpos preformados de las clases IgM e IgD; los linfocitos B inmaduros carecen de inmunoglobulinas superficiales pero contienen las cadenas ligeras y pesadas en su citoplasma (Rojas-Espinosa, 2001; Halliwell, 1989).

1.3.3 Linfocitos T

Las células T se modifican a lo largo de su progresión en el timo (Halliwell, 1989). Los linfocitos pre-T migran de la médula ósea al timo para completar ahí su maduración. Por la influencia de las hormonas tímicas, las células T ordenan y activan sus genes responsables de la síntesis de los receptores para antígeno (TCR) y de las moléculas de diferenciación CD2 (Pescovitz, 1994), CD3 (Bullido, 1999; Chianini, 2001), CD4 y CD8 (Bianchi, 1992; Becker, 1993) entre muchas otras (Rojas-Espinosa, 2001).

A diferencia de las células B, las células T no producen anticuerpos sino que actúan como coordinadoras de la respuesta inmune y como células efectoras de la inmunidad mediada por células. Las diversas funciones de las células T dieron origen a su clasificación en clases y subclases. En la actualidad se acepta que las clases principales son las células T cooperadoras (CD4⁺) y citotóxicas (CD8⁺) (Bianchi, 1992; Saalmüller, 1994). Las primeras actúan para lograr que el antígeno procesado sea reconocido y colaboran en la coordinación de la respuesta inmune. Las células citotóxicas son células efectoras del sistema inmune y juegan un papel central en la eliminación de células infectadas por virus, parásitos o bacterias intracelulares (Halliwell, 1989).

1.3.4 Marcadores de células B y células T

Los linfocitos expresan un gran número de moléculas de superficie, que se pueden utilizar para identificar los diferentes estadios de estas poblaciones celulares (Roitt, 2001). Se ha desarrollado un método sistemático de nomenclatura, denominado sistema CD (*cluster of differentiation*) que está determinado por la estirpe celular y el grado de diferenciación, de maduración o de activación (Rojas-Espinosa, 2001).

Marcadores de las células T

Todas las células T tienen, hasta donde se sabe, moléculas TCR (*T-cell receptor*), que es el receptor que reconoce los complejos péptido-molécula del MHC. La molécula CD3 es un complejo pentamolecular asociado al TCR y relacionado con la transducción de señales.

Otros marcadores importantes son; CD2, CD4, CD8, CD25 y CD45 cuya función y distribución se mencionan en la tabla 2 (Bullido, 1999; Rollins, 1994; Zuckerman, 1998).

Tabla 2. Distribución y función de los marcadores (CD) de las células T en cerdos

Marcador	Distribución	Función propuesta
CD2	Todos los linfocitos T	Receptor para actuar como coestimulador de CD58
CD3	Todos los linfocitos T	Transducción de señales como resultado del reconocimiento del antígeno
CD4	Linfocitos T cooperadores, monocitos y macrófagos	Unión a moléculas MHC clase II
CD8	Linfocitos T citotóxicos	Receptor preferencial para MHC clase II
CD25	Linfocitos T activados	Receptor de interleucina-2
CD45	Todos los linfocitos T	Antígeno común de linfocitos

(Bullido, 1999; Rollins, 1994; Zuckerman, 1998)

Marcadores de las células B

Al igual que otras células, los linfocitos B exhiben moléculas o antígenos de diferenciación, algunos de los cuales son exclusivos de los linfocitos B, en tanto que otros se encuentran también en otras células. Algunos de estos antígenos son el CD34, CD10 (Stites, 1993), CD40 (Roitt, 2001, Boersma, 2001), CD1 y CD21 (Boersma, 2001; Bullido, 1999). Asimismo, los linfocitos B tienen en su membrana celular receptores para C3b, uno de los componentes del sistema del complemento (Rojas-Espinosa, 2001). Algunos de los marcadores más importantes se mencionan en la tabla 3.

Otra forma de identificar a los linfocitos B activados es procesar las muestras por inclusión en parafina y realizando la tinción Verde metil pironina (VMP). En esta técnica, bajo condiciones controladas, la pironina se une de manera específica al RNA y permite la observación de un citoplasma fuertemente teñido de color rosa, esto se relaciona con una célula que esta desarrollando una síntesis proteica intensa, en este caso los linfocitos B activados (Estrada, 1982; Franco, 1999; Cortés, 2003).

Tabla 3. Distribución y función de los marcadores (CD) de las células B en cerdos

Marcador	Distribución	Función propuesta
CD1c	Todos los linfocitos B	Interviene en la presentación de antígenos no peptídicos
CD10	En células pro-B	Endopeptidasa neutra, se expresa transitoriamente en los progenitores menos diferenciados
CD21	Todos los linfocitos B	Receptor de complemento
CD34	Células progenitoras	Molécula de adhesión y marcador de células madre
CD40	Célula pre-B hasta célula B de memoria	La unión de CD40 al receptor de CD40 permite que la célula T cooperadora active a la célula B para que prolifere en célula B de memoria y en células plasmáticas, permanece toda la vida

(Boersma, 2001; Bullido, 1999; Chun 1999, Shailubhai 1997)

1.3.4 Sistema Inmune del Cerdo Recién Nacido

Todos los componentes del sistema inmune innato y adquirido se desarrollan en el útero y son funcionales al nacimiento. De cualquier forma éstos son generalmente menos eficientes que en el adulto (Roth, 1999), parte de esta inmunodeficiencia ha sido atribuida a la inmadurez de los compartimentos linfocíticos del sistema linfoide (Murgita y Wigzell, 1981).

La placentación epiteliocorial de la cerda mantiene varias capas tisulares entre la circulación materna y la fetal, lo cual impide la transferencia de anticuerpos. En la cerda, como en las demás especies domésticas, la transferencia pasiva de anticuerpos de la madre a la cría ocurre a través del calostro. La concentración de anticuerpos en el calostro de la cerda ocurre en los últimos días de gestación. Estos anticuerpos son transferidos a través de las células intestinales intactas a la circulación del recién nacido (Roth, 1999).

La inmunidad del recién nacido está limitada por la cantidad y calidad de anticuerpos en calostro y por la cantidad que el neonato sea capaz de absorber (Holland, 1990), además de que el repertorio de anticuerpos 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 la circulación sistémica por el conducto torácico (Weström et al., 1985; Porter, 1986). En general, la permeabilidad del epitelio intestinal es mayor inmediatamente después del nacimiento y declina rápidamente dentro de las primeras 24 horas por la maduración de las células intestinales, así como por el establecimiento de la flora intestinal (Chappuis, 1998; Rooke, 2002).

1.3.5 Enfermedades del recién nacido

Los cerdos recién nacidos pueden verse afectados por diversos padecimientos, lo cual se manifiesta principalmente con emaciación y falta de desarrollo; esto puede deberse por lo general a trastornos en el aparato digestivo con signos como diarreas y vómitos, provocados por colibacilosis, gastroenteritis epizoótica transmisible, *Clostridium perfringens*, diarrea epidémica porcina y parásitos internos, entre otras. Los padecimientos del aparato respiratorio también afectan el crecimiento del cerdo provocando signos de disnea, tos y estornudos como en el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), influenza porcina, seudorrabia, toxoplasmosis, rinitis atrófica e infección por citomegalovirus porcino. Podemos encontrar signos del sistema nervioso en casos de; hipoglucemia, seudorrabia, meningitis estreptocócica, malformaciones congénitas, ojo azul y encefalomielitis hemoaglutinante.

La anemia es un signo importante en los lechones recién nacidos y puede ser causada por; deficiencia de hierro, síndrome mastitis metritis agalactia (SMMA), eperitrozoonosis y hemorragia umbilical.

Por lo general los signos clínicos de los problemas de cojera son de fácil detección y pueden ser provocados por padecimientos como; poliartritis infecciosa, traumatismos, patas abiertas e inyecciones mal aplicadas.

2. OBJETIVOS

- a) Determinar la presencia de los linfocitos B activados y linfocitos T en timo, bazo, linfonodos mesentéricos, linfonodos cervicales superficiales, yeyuno e íleon en lechones de dos días de edad.

- b) Describir la distribución de los linfocitos B y T en los órganos linfoides señalados.

- c) Sentar las bases que permitan realizar estudios adicionales sobre el sistema inmune del cerdo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Utilizamos cinco lechones generados por la cruce de las razas Landrace x Yorkshire de dos días de edad provenientes de una granja comercial localizada en el municipio de San Juan Zitlaltepec, Estado de México. Cada lechón fue sacrificado mediante la aplicación de 5 ml de pentobarbital sódico (Anestosal, Pfizer) por vía intracardiaca. Tomamos dos muestras de cada órgano, a saber; timo, bazo, yeyuno, ileon, linfonodo mesentérico y linfonodo cervical superficial. Las muestras fueron divididas en dos partes; una de ellas fue colocada en un crioprotector (2-metil butano) y congelada en nitrógeno líquido y la otra en fijador de Zenker. Las muestras congeladas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de ser cortadas.

En el momento de obtener las muestras realizamos la inspección del resto de los órganos y anotamos los hallazgos macroscópicos.

Realización de cortes por congelación e inmunohistoquímica (detección de linfocitos T)

- a) De las muestras obtuvimos cortes de $10\ \mu\text{m}$ de grosor en el criotomo (Leica), los cortes fueron montados en portaobjetos recubiertos con gelatina al 0.5%.
- b) Inmediatamente después fueron almacenados a -20°C .
- c) Para la inmunohistoquímica permitimos que la muestra se descongelara a temperatura ambiente y para evitar su deshidratación la mantuvimos durante este tiempo en PBS 100 mM (Amortiguador de fosfatos).
- d) Posteriormente fijamos con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y lavamos con PBS durante cinco minutos, tres veces.
- e) Bloqueamos con suero normal de ratón al 7% durante 20 minutos y lavamos con PBS durante cinco minutos, tres veces.
- f) Expusimos el corte al anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD3 de linfocitos de humano (marca Serotec, F0818) y que reconoce el CD3 de porcino (Chianini F, 2001). Este anticuerpo fue aplicado a una dilución de 1:10 en PBS y se incubó durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C .

- g) Lavamos con PBS durante cinco minutos, tres veces y, finalmente, una vez más con agua desionizada.
- h) Finalmente montamos la muestra con gelvatol, al cual le adicionamos 50 μ l de parafenilendiamina al 1% y lo protegimos con un cubreobjetos.
- i) Observamos y cuantificamos al microscopio de epifluorescencia.

Inclusión en Parafina

- a) Sumergimos las muestras en fijador de Zenker por 24 horas.
- b) Lavamos con agua destilada durante 10 minutos.
- c) Deshidratamos e infiltramos en parafina:
 - Deshidratamos en un gradiente de alcohol etílico (60°, 70°, 95° y 100°). La muestra permaneció 15 minutos en cada graduación. En cada cambio el alcohol fue calentado en un horno de microondas (45-55°C durante 2 min).
 - Sumergimos las muestras en monómero de estireno durante 24 horas.
 - Infiltramos en parafina por 60 minutos, dos cambios.
- d) Inclusión en parafina.
- e) Realizamos cortes en microtomo (Leica) a un grosor de 5 μ m.
- f) Finalmente montamos los cortes en el portaobjetos.

Tinción Hematoxilina-Eosina

- a) Colocamos en xilol durante 15 min, dos veces.
- b) Colocamos en alcohol etílico durante 30 segundos.
- c) Rehidratación de la muestra:
 - Rehidratamos en un gradiente de alcohol etílico (100°, 96°, 96° y 80°). La muestra permaneció 30 segundos en cada graduación.
- d) Lavamos en agua destilada.
- e) Colocamos en lugol durante 15 min.
- f) Lavamos con agua corriente.
- g) Colocamos en Tiosulfato de Sodio durante 15 min.
- h) Lavamos con agua destilada.
- i) Teñimos en el colorante de Hematoxilina durante 15 min.

- j) Lavamos con agua corriente.
- k) Colocamos en alcohol ácido durante 10 seg.
- l) Lavamos con agua destilada.
- m) Colocamos en carbonato de litio durante 30 seg.
- n) Lavamos con agua corriente.
- o) Teñimos en el colorante Eosina durante 10 min.
- p) Deshidratamos en alcohol etílico de 96° durante 30 segundos, dos veces.
- q) Deshidratamos en dos pasos de alcohol absoluto; por un minuto en el primero y por dos minutos en el segundo.
- r) Realizamos dos pasos de xilol; por un minuto en el primero y por cinco minutos en el segundo.
- s) Cubrimos la laminilla, la observamos al microscopio y realizamos la evaluación respectiva.

Tinción Verde Metil Pironina (Para detección de linfocitos B)

- a) Para eliminar la parafina enjuagamos los cortes en Xilol, dos veces.
- b) Para hidratar las muestras las colocamos en alcohol etílico, dos veces.
- c) Pasamos a alcohol etílico 96%, dos veces.
- d) Colocamos en alcohol etílico al 80%.
- e) Enjuagamos con agua destilada.
- f) Colocamos en lugol durante 15 minutos.
- g) Enjuagamos con agua destilada.
- h) Colocamos en una solución de tiosulfato de sodio durante 15 minutos.
- i) Enjuagamos con agua destilada.
- j) Lavamos con acetato de sodio (pH 4.4).
- k) Teñimos con pironina durante 40 minutos.
- l) Enjuagamos con agua destilada.
- m) Teñimos con verde de metilo durante 20 minutos.
- n) Enjuagamos con acetona.
- o) Enjuagamos con metanol.

- p) Dejamos secar al aire.
- q) Humedecemos en xilol y colocamos el cubreobjeto.
- r) Observamos y cuantificamos al microscopio óptico.

OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS

Revisamos los cortes teñidos con H-E en un microscopio óptico (American Optical) con el fin de evaluar la integridad de los órganos y observar las lesiones que pudieran existir. En yeyuno e íleon cuantificamos la totalidad de los domos presentes por corte, así como los linfocitos intraepiteliales presentes en diez campos elegidos al azar (objetivo 40×) y reportamos los valores promedio. De la misma manera cuantificamos los linfocitos periarteriolaes en timo, bazo y linfonodos.

La tinción de los cortes con verde metil pironina nos permitió distinguir a los linfocitos B activados en los órganos estudiados. Estos linfocitos fueron identificados por su morfología y por la coloración obtenida; citoplasma de color rosa intenso y núcleo de color verde. Los linfocitos mostraron las mismas características en todos los órganos. Cuantificamos las células presentes en diez campos elegidos al azar (objetivo 40×) y los valores promedio aparecen en el texto entre paréntesis y están registrados en la Tabla 4.

Con la aplicación del anticuerpo anti-CD3 identificamos a los linfocitos T en los órganos estudiados. Observamos las preparaciones en un microscopio de epifluorescencia e identificamos a las células inmunopositivas por la luz verde fluorescente que emiten, las cuantificamos en diez campos elegidos al azar (objetivo 100×), los valores promedio se encuentran en el texto entre paréntesis y se reportan en la Tabla 5.

4. RESULTADOS

De acuerdo con nuestras observaciones podemos comentar que, en todos los órganos estudiados, encontramos una mayor cantidad de Linfocitos T que de linfocitos B. Sin embargo, esto no significa que realmente existan pocos linfocitos B, ya que debemos considerar que este resultado es sólo preliminar ya que el método utilizado sólo permite la identificación de los linfocitos B activados (células plasmáticas), mientras que el anticuerpo anti-CD3 detecta incluso a los estadios inmaduros de los linfocitos T. Si bien la tinción con verde metil pironina limitó nuestra posibilidad de detectar a la totalidad de los linfocitos B, por otra parte nos permitió detectar de manera específica a los linfocitos B activados.

Podemos señalar que los animales utilizados en este estudio eran animales sanos ya que al realizar la inspección postmortem y al revisar los cortes teñidos con H-E nos percatamos de que todos los órganos estaban en buenas condiciones y no mostraban cambios patológicos aparentes (SCPA).

Timo

En el timo encontramos una cantidad casi nula (1.0) de linfocitos B en comparación con la cantidad de linfocitos T (37.7) (Tablas 4 y 5). Los linfocitos B estaban localizados en la corteza del órgano, mientras que los linfocitos T fueron ubicados dispersos tanto en la corteza como en la médula de este órgano. De los órganos estudiados el timo fue el que presentó el menor número de linfocitos B y, de manera contrastante, fue en el que encontramos el mayor número de linfocitos T.

Obtuvimos un promedio de **15.7** linfocitos periarteriolaes por campo de observación y de manera general podemos señalar que se trata de linfocitos T.

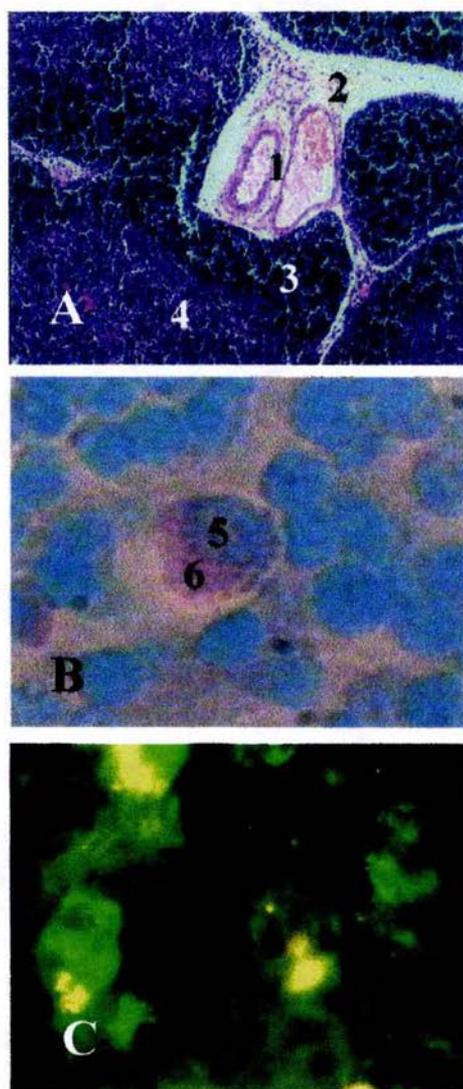


Figura 1. TIMO. A) Podemos observar a los vasos sanguíneos (1), el tejido conectivo (2), la corteza (3) y la médula (4) de este órgano (H-E, 40×). **B)** Linfocito B con el núcleo de color verde (5) y el citoplasma de color rosa (6), localizado entre otras células (verde metil pironina, 100×). **C)** Observamos varios linfocitos T, los cuales se identifican por su fluorescencia de color verde (inmunohistoquímica, 40×).

Bazo

El bazo como órgano secundario en el cual se almacenan células de defensa encontramos que la cantidad de linfocitos B fue pequeña (3.8) en comparación con los linfocitos T (18.1), las primeras tuvieron su localización en la pulpa blanca y los segundos a nivel periarteriolar.

Encontramos un promedio de 16.3 linfocitos periarteriolar, esto nos permite señalar que la mayoría de los linfocitos T están localizados en esta posición.

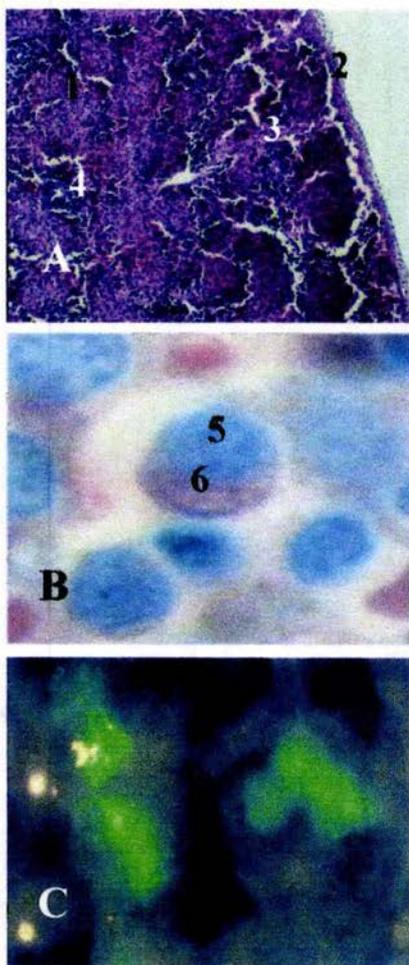


Figura 2. BAZO. A) Observamos el parénquima a nivel de la pulpa roja (1), también apreciamos la serosa (2) así como una de las trabéculas (3) y vasos sanguíneos (4) del órgano (H-E, 10×). B) Observamos el linfocito B con su núcleo de color verde (5) y su citoplasma de color rosa (6) rodeado por otras células (verde metil pironina, 100×). C) Observamos linfocitos T, los cuales se identifican por su fluorescencia de color verde (inmunohistoquímica, 40×).

Yeyuno

En los nódulos linfoides agregados (placas de Peyer) localizados en el yeyuno la presencia de linfocitos B (2.2) fue menor en comparación con los linfocitos T (23.0). La localización de la mayoría de los primeros fue en la zona intraepitelial aunque también se hallaron algunos en los nódulos linfoides agregados, por su parte la mayoría de los linfocitos T estuvieron presentes en los nódulos linfoides agregados.

También cuantificamos la cantidad de domos presentes en este órgano y encontramos que el número total de domos fue de **17.6** por corte y el promedio de linfocitos intraepiteliales resultó ser de **17.2**.

Ileon

Al evaluar las preparaciones de íleon observamos una pobre presencia de linfocitos B (3.9) en comparación con los linfocitos T (17.0). Es importante recordar que éste es el órgano que presenta un mayor desarrollo de los nódulos linfoides agregados. La mayoría de los linfocitos B fueron observados intraepitelialmente, mientras que los linfocitos T fueron localizados en los nódulos linfoide agregados.

En este órgano encontramos un total de **12** domos por corte y un valor promedio de **15.4** linfocitos intraepiteliales.

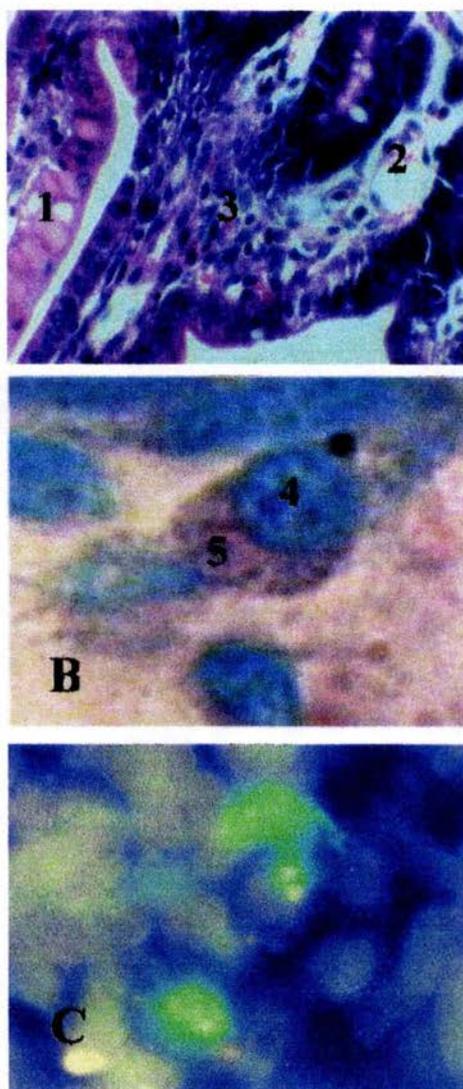


Figura 3. YEYUNO. A) Apreciamos en la vellosidad del intestino el epitelio (1), el tejido conectivo (2) y algunas células linfoides (3) (H-E, 40×). B) Observamos la presencia de un linfocito B con el núcleo color verde (4) y el citoplasma color rosa (5), a nivel de la vellosidad (verde metil pironina, 100×). C) Observamos linfocitos T que se identifican por su fluorescencia verde (inmunohistoquímica, 40×).

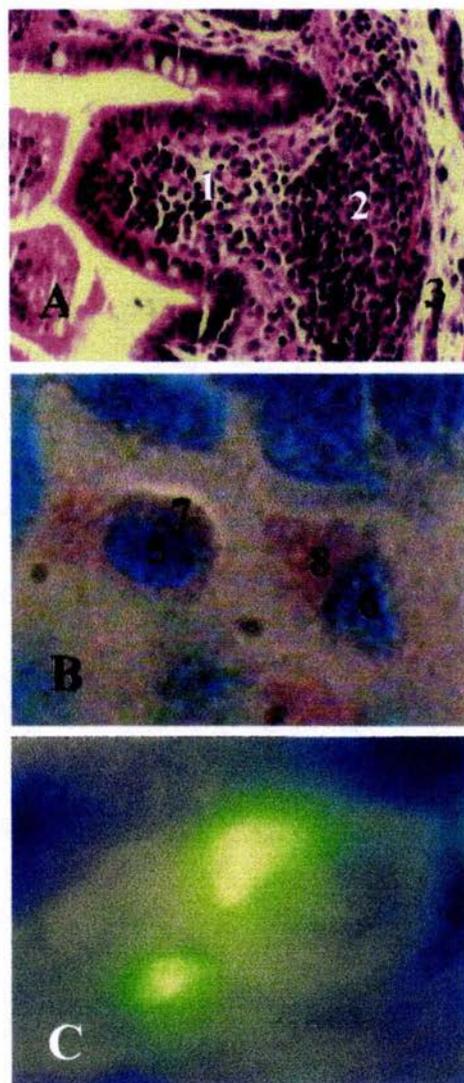


Figura 4. ILEON. A) Apreciamos un domo (1) y su Placa de Peyer (2), así como el tejido conectivo (3) (H-E, 40×). B) Observamos dos linfocitos B con su núcleo verde (5 y 6) y su citoplasma de color rosa (7 y 8), localizados a nivel de submucosa (verde metil pironina, 100×). C) Observamos linfocitos T de fluorescencia verde (inmunohistoquímica, 40×).

Linfonodo Mesentérico

Los linfonodos mesentéricos guardan una cercana relación con el intestino delgado, debido a su localización en la raíz del mesenterio común. Los linfocitos B (4.4) no resultaron ser tan numerosos como los linfocitos T (15.4), ubicándose la mayoría de los primeros en la zona medular y rodeados de linfocitos T. Sabemos que la disposición del tejido linfoide en esta especie es distinta, ya que la zona medular se encuentra en la parte periférica y la zona cortical en la parte interna.

En este órgano encontramos un promedio de **15.2** linfocitos periarteriolares por campo.

Linfonodo Cervical Superficial

El linfonodo cervical superficial presentó una mayor cantidad de linfocitos T (**18.1**) que de linfocitos B (**2.5**), localizándose los primeros en la zona medular y los linfocitos B en la zona cortical. Es importante recordar, lo que ya se mencionó en el párrafo anterior, en relación con la disposición del tejido en estos órganos en el cerdo.

En este órgano encontramos un promedio de **14.9** linfocitos periarteriolares por campo.

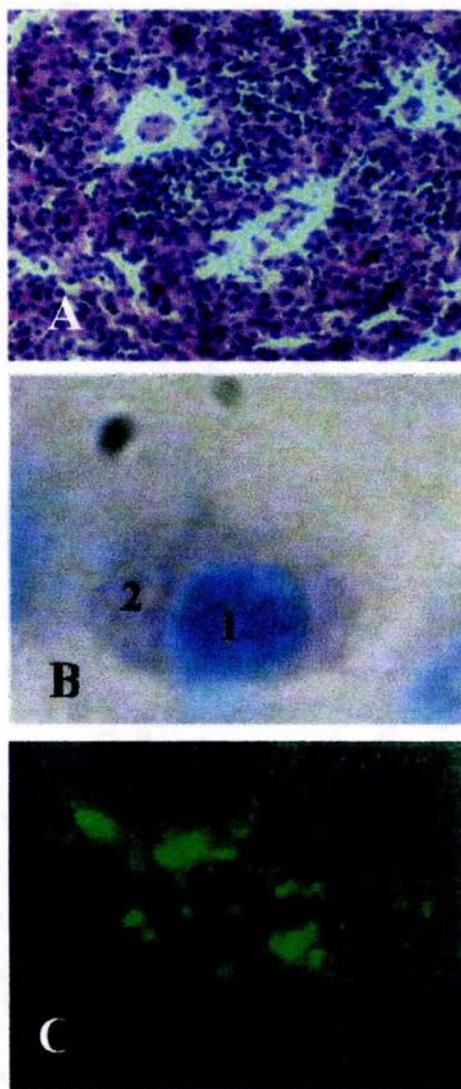


Figura 5. LINFONODO MESENTÉRICO. A) Zona cortical del linfonodo donde se observa la población celular (H-E, 10×). **B)** Observamos un linfocito B con el núcleo de color verde (1) y el citoplasma de color rosa (2) (verde metil pironina, 100×). **C)** Los linfocitos T se aprecia gracias a su fluorescencia verde (inmunohistoquímica, 40×).

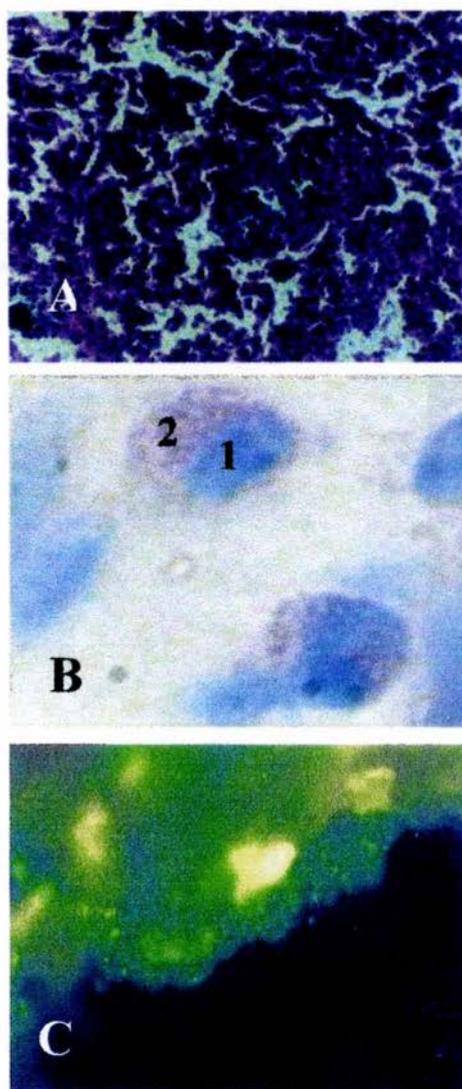


Figura 6. LINFONODO CERVICAL SUPERFICIAL. A) Observamos la población celular a nivel de la corteza (H-E, 10×). **B)** El linfocito B lo observamos con el núcleo de color verde (1) y el citoplasma de color rosa (2) (verde metil pironina, 100×). **C)** Apreciamos el linfocito T con la fluorescencia verde (inmunohistoquímica, 40×)

Tabla 4. Localización y cuantificación de los linfocitos B

Órganos	Lechones					Promedio (D.E.)
	1	2	3	4	5	
Timo	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	1.1 (0.2)
Bazo	3.1	2.8	3.6	5.6	3.8	3.9 (1.0)
Yeyuno	1.8	2.1	2.3	3.2	2.8	2.4 (0.6)
Íleon	4.5	3.5	4.0	3.2	4.6	4.0 (0.6)
Linfonodo Mesentérico	4.1	4.2	3.0	6.0	5.0	4.5 (1.1)
Linfonodo Cervical	4.1	2.8	2.2	2.2	2.6	2.8 (0.8)

D. E. = Desviación Estándar

Tabla 5. Localización y cuantificación de los linfocitos T

Órgano	Lechones					Promedio (D. E.)
	1	2	3	4	5	
Timo	30.9	39.2	34.3	25.3	58.6	37.7 (12.7)
Bazo	11.2	16.9	23.0	21.1	18.5	18.1 (4.5)
Yeyuno	19.1	25.4	25.4	19.0	25.9	23.0 (3.6)
Íleon	16.8	20.1	19.6	15.1	12.7	17.0 (3.1)
Linfonodo Mesentérico	18.9	14.0	19.9	17.0	7.3	15.4 (5.1)
Linfonodo Cervical	14.3	15.7	21.4	23.1	16.0	18.1 (3.9)

D. E. = Desviación Estándar.

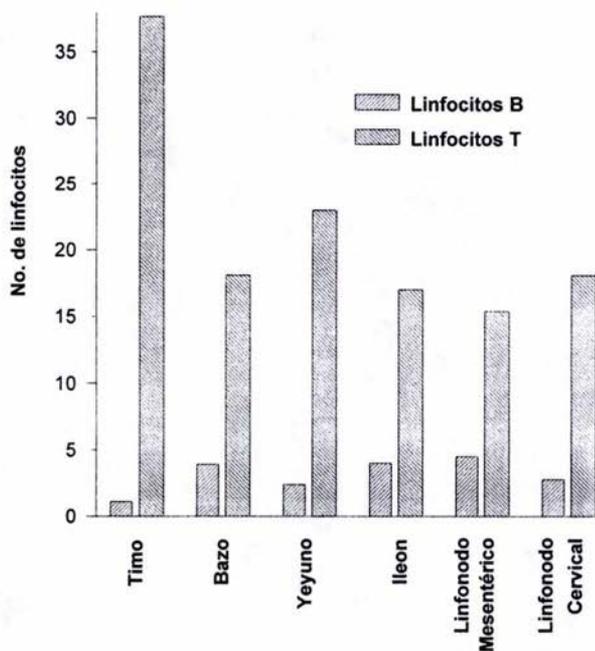


Figura 7. Número de linfocitos B y T. Se ilustra de manera comparativa el número de linfocitos B y T encontrados en los diferentes órganos evaluados.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo nos muestran que existe una diferencia importante en cuanto a la cantidad de linfocitos encontrados, siendo los linfocitos T más numerosos que los linfocitos B en todos los órganos estudiados, al hacer una revisión del tema encontramos varios factores que pueden explicar nuestros hallazgos:

En primer lugar debemos señalar que este resultado es sólo preliminar ya que las diferencias encontradas pueden, en parte, ser atribuidas al método empleado para detectar a esta población de linfocitos. Los métodos utilizados implican, por parte de los linfocitos T la detección de todas las poblaciones celulares incluso aquellas inmaduras, mientras que por parte de los linfocitos B la tinción aplicada permite sólo la identificación de los linfocitos B activados.

Varios artículos señalan una disminución en el número de células inmunes inmediatamente después del nacimiento. Así, McCauley y Hartmann (1984) encontraron que a los dos días después del nacimiento existe una disminución transitoria en el número de linfocitos B circulantes. También Chu R M et al. (1979b), reportan valores bajos para los linfocitos intraepiteliales de intestino, ambos reportes coinciden en esta baja transitoria que se presenta entre el momento del nacimiento y los primeros cinco días de edad, donde inicia un aumento en su número, este aumento es continuo hasta alcanzar los niveles normales de un animal adulto a la edad de 30 días aproximadamente (McCauley y Hartman, 1984; Chu RM et al., 1979b). En otro estudio en el que se contabilizaron los monocitos/granulocitos, células MHC II y linfocitos T en el intestino delgado, también se reporta que, al nacimiento, existen en bajo número, y que algunas subpoblaciones de linfocitos T no alcanzan los niveles de un animal adulto sino hasta la séptima semana (Vega-López M A et al., 1995).

Una última consideración se refiere a la porción de intestino muestreada ya que se ha determinado que generalmente, la parte craneal del intestino delgado contiene más linfocitos intraepiteliales y que existe una disminución gradual en el número de linfocitos intraepiteliales hacia la porción final del intestino (Chu R M et al.,

1979b). Para este trabajo tomamos muestras de la última porción del yeyuno y del íleon que es donde se encuentra la menor cantidad de linfocitos. De hecho, los valores reportados por Chu R M et al. (1979b) en cerdos a la misma edad son aún menores que los obtenidos en este estudio (3.2 contra 17.2 para la parte final del yeyuno y 1.6 contra 15.4 para íleon).

De acuerdo con lo reportado por Bianchi et al. (1992), encontramos que el timo fue el órgano con la mayor cantidad de linfocitos T, esto puede ser considerado como un hallazgo normal ya que como antes mencionamos, el timo es el órgano primario en el que maduran los linfocitos T y de ahí surgen inmunológicamente capacitados para colonizar a los órganos linfoides periféricos.

Al comparar la cantidad de linfocitos intraepiteliales y la cantidad de domos encontrados en yeyuno e íleon observamos que, en ambos resultados, el yeyuno tuvo una mayor cantidad que el íleon, esto puede deberse a que el yeyuno presenta un mayor número de pliegues en su mucosa y esto le da ventaja en comparación con el íleon, que aunque sus domos son más evidentes tiene menos pliegues y concuerda con datos reportados previamente por otros investigadores (Allen y Porter, 1977; Chu R M et al., 1979b; Chu y Liu, 1984; Bianchi et al., 1992).

Podemos señalar que la distribución de los linfocitos B y T en todos los órganos estudiados correspondió con lo reportado en los diferentes textos consultados (Halliwell, 1989; Morilla, 1989; Banks, 1996).

La cantidad de linfocitos B y T presentes en el linfonodo mesentérico fueron similares a los encontrados en yeyuno e íleon y esto puede ser explicado por su estrecha relación anatómica. Sin embargo, no es lo esperado pues en un órgano estimulado deberíamos encontrar una mayor cantidad de células en relación con la presencia de proliferación, tal y como lo reporta Bianchi et al. (1992), quienes encuentran 10 veces más linfocitos en el linfonodo mesentérico que en el yeyuno e íleon en cerdos de un día de edad.

Los valores encontrados en el linfonodo cervical superficial resultaron similares a los del bazo y esta relación se puede atribuir al hecho de que ambos son órganos linfoides secundarios relacionados con el ambiente sistémico. Sin embargo,

los valores reportados son 66 veces inferiores a los encontrados por Bianchi et al., 1992.

Por lo anterior podemos señalar que los linfocitos de los lechones estudiados presentan disminuida su capacidad de proliferación, probablemente por falta de estimulación o bien por alguna incapacidad natural de maduración. Según Becker y Misfeldt (1993), señalan que en los porcinos la expresión de antígenos de diferenciación en la superficie de las células parece ocurrir antes de que los linfocitos tengan la capacidad de responder a mitógenos.

De acuerdo con nuestros hallazgos podemos señalar que los cerdos recién nacidos incluidos en este estudio presentan un sistema inmune que no está completamente desarrollado al nacimiento, por lo que es necesario realizar estudios adicionales que nos permitan conocer los eventos y factores que intervienen para que en los cerdos recién nacidos exista una menor cantidad de linfocitos T y B, y el hecho de que estas células presenten disminuida su capacidad de proliferación (Becker y Misfeldt, 1993).

6. CONCLUSIONES

1. Los órganos linfoides estudiados presentaron una cantidad escasa de linfocitos T y B, esto puede ser atribuido, según reportes publicados, a una disminución en el número de linfocitos que se presenta en los porcinos en el periodo que va desde el nacimiento hasta los cinco días edad.
2. Identificamos una mayor cantidad de linfocitos T que de linfocitos B en todos los órganos estudiados, pero este hallazgo lo atribuimos a los diferentes métodos utilizados. Es importante señalar que la tinción con VMP sólo permite la identificación de los linfocitos B activados.
3. En este estudio encontramos una mayor cantidad de linfocitos B y T en yeyuno que en íleon, lo cual concuerda con reportes publicados en los que se señala que existe una disminución en el número de linfocitos hacia la parte distal del intestino delgado.
4. La cantidad de linfocitos B y T encontrada en el íleon fue similar a la presente en el linfonodo mesentérico y esto lo podemos atribuir a su relación anatómica, sin embargo podría considerarse como una evidencia que nos permite señalar que estas células presentan una aparente disminución en su capacidad de proliferación.
5. El número de linfocitos B y T presentes en yeyuno, íleon y linfonodo mesentérico fue similar al encontrado en bazo y linfonodo cervical superficial, donde se esperaría la presencia de una mayor cantidad de células, lo cual refuerza la hipótesis de que presentan una menor capacidad de proliferación.
6. La distribución de los linfocitos B y T en los órganos linfoides estudiados corresponde con lo señalado en la literatura.
7. Existen reportes que señalan que el anticuerpo anti-CD3 de humano muestra reacción cruzada con el antígeno correspondiente de los porcinos de tal forma que

permite la identificación de los linfocitos T en esta especie, de acuerdo con nuestros resultados podemos señalar que el uso del anticuerpo anti-CD3 de humano es adecuado para dicho fin.

7. ANEXO (SOLUCIONES)

Fijador de Zenker

Cloruro de mercurio	5 g
Dicromato de potasio	2.5 g
Sulfato de sodio	1 g
Ácido acético glacial	5 ml (adicionarse antes de usarse)
Agua destilada	100 ml

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS 100 mM)

Fosfato de Sodio Monobásico	2.3 g
Fosfato de Sodio Dibásico	11.5 g
Cloruro de Sodio	90.0 g
Agua destilada cbp	1000 ml.
Ajustar pH 7.2 a 7.4	

Preparación del Gelvatol

Calentar a 50-60° C 40 ml de Tris-Cl 0.2 M, pH 8.5
 Adicionar lentamente 8 g de polivinil-alcohol e ir agitando simultáneamente.
 Enfriar y agregar 20 ml de glicerol
 Centrifugar a 5,000 rpm por 15 minutos
 Alicuotar y guardar a -20° C.

Parafenilendiamina 1%

Parafenilendiamina	10 mg
PBS cbp	1 ml

Solución de montaje

Gelvatol	450 µl
Parafenilendiamina	50 µl

Colorante pironina 2%

Pironina B	500 mg
Agua destilada	25 ml

Verde de Metilo 2%

Verde de metilo	1 g
Agua destilada	50 ml

Una vez preparada, la solución se lava con cloroformo mediante pasos sucesivos de agitación-centrifugación, esto se realiza hasta que el cloroformo deje de teñirse de violeta.

Amortiguador de Acetato, pH 4.1

Acetato de sodio	4.125 g
Agua destilada	250 ml

Ajustar a pH 4.1 con ácido clorhídrico 5N.

Para la solución final se mezclan volúmenes iguales de verde metil pironina y amortiguador de acetato.

Paraformaldehido 4%

Disolver 4 g de paraformaldehido en 50 ml de agua a 60-70° C, mediante agitación constante.

Adicionar hidróxido de sodio 1M, por goteo hasta que la solución se aclare.

Enfriar en hielo y guardar a 4° C. El paraformaldehido se mantiene estable solo durante 4-6 semanas.

Previo a su utilización mezclar a volúmenes iguales con PBS 200 mM.

Tiosulfato de Sodio 5%

Tiosulfato de sodio	20 g
Agua destilada	400 ml

Gelatina 0.5%

Gelatina	250 mg
PBS (100 mM)	50 ml

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A. K, Lichtman A H, Pober J S (2002) *Inmunología Celular y Molecular*. 4ª edición, Editorial McGraw Hill-Interamericana, España.
- Adams Vázquez Olivia (1995) *Adaptación al castellano de la Nómina Histológica, como un instrumento para la unificación de la nomenclatura en la histología*. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM.
- Allen W. D, Porter P (1977) The relative frequencies and distribution of immunoglobulin-bearing cells in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity. *Immunology* 32:819-824.
- Becker B. A, Misfeldt M L (1993) Evaluation of the mitogen-induced proliferation and cell surface differentiation antigens of lymphocytes from pigs 1 to 30 days of age. *Journal of Animal Science* 71:2073-2078.
- Bianchi A. T. J, Zwart R J, Jeurissen S M H, Moneen-Leusen H W M (1992) Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 33:201-221.
- Boersma W. J. A, Zwart R J, Sinkora J, Rehakova Z, Haverson K, Bianchi A T J (2001) Summary of workshop findings for porcine B-cell markers. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 80:63-78.
- Bullido R, Doménech N, Gómez del Moral M, Alonso F, Ezquerro A, Domínguez J (1999) Monoclonal antibodies 2F6/8 and 2A10/8 recognize a porcine antigen (SWC7) expressed on B cells and activated T cells. *Journal of Immunological Methods* 222:1:11.
- Cormack D. H. (1988) *Histología de Ham*. 9ª edición, Editorial Harla, México.
- Cortés Fernández de Arcipreste Norhan (2003) *Identificación de linfocitos afectados durante la infección experimental en el conejo por Escherichia coli enterohemorrágica*. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM.
- Chappuis G. (1998) Neonatal immunity and immunization in early age: lesson from veterinary medicine. *Vaccine* 16:1468-1472.

- Chianini F, Majó N, Segalés J, Domínguez J, Domingo M. (2001) Immunohistological study of the immune system cells in paraffin-embedded tissues of conventional pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82:245-255.
- Chu R. M, Glock R. D, Ross R. F (1979a) Gut-associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) of the small intestine. *American Journal Veterinary Research*. 40:1713-1719.
- Chu R. M, Glock R. D, Ross R. F, Cox D. E. (1979b) Lymphoid tissues of the small intestine of swine from birth to one month of age. *American Journal of Veterinary Research*. 40 (12):1713-1719.
- Chu R. M, Liu C. H (1984) Morphological and functional comparisons of Peyer's patches in different parts of the swine small intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 6:391-403.
- Chun T, Wang K, Zuckerman F. A, Gaskins H. R. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel CD1 gene from the pig. *Journal of Immunology* 162:6562-6571.
- Estrada F. E, Peralta Z. L, Rivas M. P (1982) *Manual de Técnicas Histológicas*. Editorial AGT, México.
- Franco Gutiérrez Alfredo (1999) Evaluación histológica de tejido linfoide de lechones de 15 días de edad, colonizados con un probiótico a base de *Streptococcus faecalis* y *Lactobacillus casei*. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM.
- Gartner Leslie P, Hiatt James L. (2002) *Texto Atlas de Histología*. 2ª edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, México.
- Halliwell R E W, Gorman N. T. (1989) *Inmunología Clínica Veterinaria*. Editorial Acribia S.A. España.
- Holland R. E. (1990) Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Review*. 3:345-375.
- Jepson Mark A, Clark M A (1998) Studying M cells and their role in infection. *Trends in Microbiology* 6:359-365.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- McCauley I, Hartmann P. E. (1984) Changes in piglet leucocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. *Research in Veterinary Science* 37:234-241.
- Morilla G. A. (1989) *Inmunología Veterinaria*. Editorial Diana, México.
- Murgita R. A, Wigzell H. (1981) Regulation of immune functions in the fetus and newborn. *Progress in Allergy* 29:54-133.
- Olsen G. R, Krakowka S, Olsen C. G. (1983) *Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos*. 2ª edición, Editorial El Manual Moderno, México.
- Pescovitz M. D, Aasted B, Canals A, Domínguez J, Vizcino J S, Pospisil R, Sinkora J, Salmon H, Valpotic I, Davis W C, Arn S, Sachs D H, Lunney J K, Zuckerman F, Weiland E, Salmüller A. (1994) Análisis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD2 antigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 43: 229-232.
- Porter P. (1986) Immune system. En: Lemn, A. D. (ed). *Diseases of Swine*, 6th ed. Iowa State University Press, Ames. 44-57.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. (2001) *Immunology*. 5th edition, Mosby, Philadelphia, USA.
- Roitt I, Delves P. J (2003) *Inmunología Fundamentos*. 10ª edición, Editorial Médica Panamericana, España.
- Rojas- Espinosa Óscar (2001) *Inmunología (de memoria)*. 2ª edición, Editorial Médica panamericana, México.
- Rollins S. A, Kennedy S. P, Chodera A. J, Elliott E. A, Zavoico G. B, Matis L. A. (1994) Evidence that activation of human T cells by porcine endothelium involves direct recognition of porcine SLA and costimulation by porcine ligands for LFA-1 and CD2. *Transplantation* 57:1709-1716.
- Rooke J. A, Bland I. M. (2002) The acquisition of pasive immunity in the new-born piglet. *Livestock production Science* 78:13-23.
- Roth J. A. (1999) The immune system. En; Straw B. E, D'Allaire D. S, Mengeling W. L, Taylor B J (eds.) *Diseases of swine*. 8th edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp 799-820
- Saalmüller A, Aasted B, Canals A, Domínguez J, Goldman T, Lunney J. K, Maurer S, Pescovitz M D, Pospisil R, Salmon H, Tlaskalova H, Valpotic I, Vizcaino J S,

- Weiland E, Zuckerman F. (1994) Summary of workshop findings for porcine T-lymphocyte antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 43:219-228.
- Shailubhai K, Streeter P. R, Smith C. E, Jacobs G. S. (1997) Sulfation and sialylation requirements for a glycoform of CD34, a major endothelial ligand for L-selectin in porcine peripheral lymph nodes. *Glycobiology* 7:305-314.
- Sinkora M, Sinkora J, Rehakova Z, Splichal I, Yang H, Parkhouse R. M. E. (1998) Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology* 95:595-603.
- Stites D. P, Terr A. I. (1993) *Inmunología Básica y Clínica*. 7ª edición, El Manual Moderno, México, D. F.
- Tizard R. I. (1998) *Inmunología Veterinaria*. 5ª edición, McGraw-Hill Interamericana, México.
- Vega-López M. A, Bailey M, Telemo E, Stokes C. R. (1995) Effect of early weaning on the development of immune cell in the pig small intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44:319-327
- Weir D. M, Stewart J. (1999) *Inmunología*. 3ª edición, Editorial Manual Moderno, México.
- Weström B. R, Ohlsson B. G, Svendsen J, Tagesson C, Karlsson B. W. (1985) Intestinal transmission of macromolecules (BSA and FITC-Dextran) in neonatal pig: enhancing of colostrum, proteins and proteinase inhibitors. *Biology of the neonate*. 44:357-366.
- Zuckermann F. A, Peavey C, Schnitzlein W. M, Schabacker D, Husmann R. J, Yang H, Saalmuller A, Lunney J. K. (1998) Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 60:367-387.