



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**“DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS  
EN TEJIDO PULMONAR DE CERDOS SANOS”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A N:

**GUADALUPE AZUCENA CASTILLO PEÑA  
MARÍA PATRICIA MIRELES TORRES**

**ASESOR: DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ**

**COASESOR: M. V. Z. SANDRA MARTÍNEZ ROBLES**

**COASESOR: M. V. Z. GERMÁN I. GARRIDO FARIÑA**

**COASESOR: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR**

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2006



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.

**Este trabajo fue apoyado por el Proyecto PAPIIT IN209701 y la Cátedra IN2-34 “Análisis de poblaciones del Sistema Inmune del tracto respiratorio ante la infección de Micoplasmas”**

**Este trabajo fue parcialmente apoyado por el proyecto PAPIIT IN203106-3 “Estudio comparativo de los rearrreglos del citoesqueleto en células RK-13 y enterocitos de conejo durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC)”.**

**Este trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en el laboratorio de Histología L-711 bajo la supervisión del MVZ Germán Isauro Garrido Fariña de la sección de Ciencias Morfológicas y en el laboratorio de Microbiología L-514 bajo la supervisión de la M. V. Z. Sandra Martínez Robles de la sección de Ciencias de la Salud Animal.**

**Este trabajo fue apoyado por Omar Arturo García de la Peña en el área del diseño fotográfico y en la impresión del presente trabajo.**

## *AGRADECIMIENTOS*

*A Dios por darme la vida y la oportunidad de culminar esta etapa de ella, la capacidad de vencer cada obstáculo presente y la dicha de compartir con todos mis seres queridos este siguiente logro.*

*A mis padres, por dejarme la mejor herencia. Especialmente a ti mamá por estar conmigo de manera incondicional, por enseñarme a valorar la vida, a luchar, a ser perseverante y a no flaquear en los momentos de adversidad. Por ser mi amiga y el estímulo para seguir adelante. A ti papá por apoyarme e inculcarme la honestidad y la humildad.*

*A mis hermanas, Bere, Lauris y Say con quienes siempre he contado y me han dado su apoyo y consejo. Las quiero y admiro mucho.*

*A mi abuelita Sara por ser el apoyo de mamá y estar con ella compartiendo sus desvelos y preocupaciones.*

*A Gustavo por ser paciente y tolerante porque con tu afecto y cariño haz logrado poco a poco que vuelva a creer en mí.*

*A mi tío Nemo y a mi tía Silvia por todo el apoyo que me han brindado.*

*A Paty, Arturo y Edgar por brindarme su amistad, compañía y apoyo en los momentos difíciles. En especial a ti Paty por compartir esta gran experiencia y lo más importante por ser mi amiga, de verdad te quiero y valoro muchísimo.*

*Gracias y que Dios los bendiga.*

*A mis amigos Monchís, Pancho, Ángeles, Laura, Álvaro, Alma, Rafa, Lino, Alma, Quique, Heriberto, Tomás, Katia, Mirna, Víctor y con quienes compartí triunfos y fracasos. Los recordaré siempre con mucho cariño.*

*A la UNAM por permitirme formar parte de la comunidad estudiantil de esta institución y por darme la oportunidad de cumplir uno de mis sueños, ser universitaria.*

*A la F. E. S. por abrir sus puertas a muchos estudiantes y por darme las herramientas básicas para mi desempeño profesional.*

*Muchas Gracias*

*Lupita*

*A Arturo, mi compañero de vida, mi gran amor, por el gran apoyo que me brindaste tanto en mi carrera como en la elaboración de esta tesis. Tu me diste el empuje que necesitaba para continuar, me enseñaste que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr. Gracias por todo el amor, la comprensión y la paciencia mostradas durante todos estos años.*

*Este logro es también tuyo.*

*TE AMO*

*A mi hijo, Edgar, mi aliento, y principal motor para seguir adelante, por todas las veces que no pudiste tener una mamá de tiempo completo ya que muchas de las horas aquí invertidas te las he robado a ti. Gracias por tu amor y comprensión. Espero que este logro te sirva de ejemplo para comprender que nada en la vida es imposible si uno se propone alcanzar sus metas. TE AMO*

*A mis padres por hacer de mí un ser de fortaleza que busca superarse, tomar retos y alcanzar metas.*

*A mi Mamá, Queta, por brindarme todo tu amor, apoyo y ayuda incondicionales. Gracias por el amor y cuidados que le brindaste a mi niño cuando no pude estar a su lado.*

*Por darme la vida... Muchas Gracias. Te quiero*

*A mi papá, Alberto, por todas las enseñanzas, el apoyo y el cariño que me diste desde niña. Gracias por la vida que me regalaste Un día te dije que lo lograría....*

*¡Prueba superada! Te quiero papá.*

*A mi hermana Laura, a quien quiero y admiro mucho, deseo decirte que el camino que lleva al éxito está lleno de piedras y sembrado de espinas, pero surcando el mismo logramos satisfacciones perdurables, pues el sembrado de flores sólo produce gozo efímero. Sigue adelante.*

*A Lupita, por cada segundo que hemos compartido en las incontables horas de trabajo, por los buenos y malos momentos. Gracias por aguantarme y por escucharme, por tu dedicación, esfuerzo y ayuda incondicional durante este proyecto, pero sobre todo gracias por ser mi amiga*

*A mis amigos Álvaro, Alma, Lino, Mirna, Katia, Quique, Tomás y Rafa, por todos los momentos compartidos, por su amistad y por las palabras de apoyo para mí durante mis estudios.*

*A Citlali y Ana, porque las amigas como ustedes son difíciles de encontrar fáciles de querer e imposibles de olvidar.*

*A DIOS por haberme dado esta vida tan maravillosa, por darme fuerza y salud para poder superarme y alcanzar una de mis más anheladas metas.*

*A la UNAM, porque desde la Prepa 5 y hasta la FES Cuautitlán, me dio la oportunidad de realizar mis estudios y vivir aquellas maravillosas experiencias a lo largo de mi carrera. Gracias por permitirme formar parte de esta gran institución.*

*A Todas aquellas personas que no nombre y que de una u otra forma han estado a mi lado y que han contribuido a que mi meta se haga realidad  
Muchas Gracias.*

*Paty*



*A los profesores por compartir sus conocimientos, paciencia y entrega.*

*Mil Gracias.*

*A la M. V. Z. Sandra Martínez Robles por todo el tiempo que nos brindó, por la asesoría en pro del mejoramiento de los resultados obtenidos y sus substanciales sugerencias e ideas durante la elaboración de ésta Tesis. Gracias por tu respaldo, amistad y por enseñarnos que el éxito o el fracaso dependen de una decisión.*

*Al Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez y al Dr. Gerardo García Tovar quienes con sus ideas y conocimientos hicieron posible llegar al término este trabajo.*

*Al M. V. Z. Germán Isauro Garrido Fariña por su confianza y su virtud para transmitir y compartir sus conocimientos, por su tiempo y dedicación al apoyarnos en realizar y culminar el presente trabajo. Gracias por su paciencia y predisposición permanente e incondicional en aclarar nuestras dudas.*

*A los M. V. Z. Marco Mendoza Saavedra, Chelo y Lili; al personal del Laboratorio de Microbiología en especial a Elpi y a Male, y al personal del Laboratorio de Histología. Gracias por su valiosa colaboración y apoyo.*

*Al M. V. Z. Marco Muñoz por su tiempo al apoyarnos con el uso del Microscopio para la captura digital de las imágenes histológicas.*

*A los M. V. Z. Olivia Adams y Crisóforo Mercado por el apoyo brindado en la toma de imágenes histológicas.*

*A nuestros sinodales, por habernos brindado un poco de su tiempo en la revisión del presente trabajo.*

*A todos Gracias por darnos la grandiosa oportunidad de crecer tanto personal como profesionalmente a través de éste nuevo reto en la vida.*

## INDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Historia.....	2
1.2. Mecanismos de Defensa.....	4
1.2.1. Barreras Físicas.....	4
1.2.2. Inmunidad Innata.....	4
1.2.3. Inmunidad Adaptativa.....	5
1.2.3.1. Inmunidad Humoral.....	5
1.2.3.2. Inmunidad Celular.....	5
1.3. Órganos Linfoides.....	6
1.3.1. Órganos Linfoides Primarios.....	6
1.3.2. Órganos Linfoides Secundarios.....	6
1.4. Células del Sistema Inmune.....	10
1.4.1. Características de los Linfocitos Porcinos.....	10
1.4.1.1. Linfocitos T.....	11
1.4.1.2. Células NK.....	11
1.4.1.3. Linfocitos B.....	12
1.4.1.4. Células Plasmáticas.....	13
1.4.2. Marcadores de Superficie de los Linfocitos.....	14
1.4.2.1. Marcadores de Superficie de los Linfocitos T.....	14
1.4.2.2. Marcadores de Superficie de los Linfocitos B.....	16
1.5. Respuesta Inmunitaria.....	18
1.6. Inmunidad de las Mucosas.....	20
1.7. Anatomía del Aparato Respiratorio.....	21
2. Objetivos.....	26
3. Metodología.....	27
3.1. Diseño experimental.....	27
3.2. Material Biológico.....	28
3.3. Obtención de Muestras.....	28

3.4. Tinción Hematoxilina – Eosina.....	31
3.4.1. Observación y Toma de Imagen.....	32
3.5. Tinción Verde Metil Pironina.....	32
3.5.1. Procedimiento.....	34
4. Resultados.....	35
4.1. Descripción Histológica.....	35
4.2. Distribución de Células Plasmáticas.....	47
5. Discusión.....	52
6. Conclusiones.....	55
7. Literatura Citada.....	56

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Sitios de toma de muestra.....	29
2. Promedio de Células Plasmáticas en tonsila, epiglotis, tráquea y pulmón.....	48
3. Prueba no Paramétrica de Mann-Whitney.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Diseño Experimental.....	27
2. Plantigrafía de los Cortes Histológicos.....	29
3. Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Tonsila.....	40
3.1. Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Tonsila.....	41
4. Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Epiglotis.....	42
5. Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Tráquea.....	43
6. Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Pulmón. Bronquios, Bronquiolos.....	44
7. Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Pulmón. Bronquiolos, Alvéolos.....	45
8. Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Pulmón. Bronquiolos, Tejido Linfoide Asociado a Bronquio, Alvéolo.....	46
9. Distribución de Células Plasmáticas en tonsila, epiglotis, tráquea y pulmón.....	49
10. Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Células Plasmáticas en Parénquima Pulmonar, Tinción Verde Metil Pironina.....	51

## RESUMEN

En el presente trabajo se observó la histología normal de tonsila, epiglotis, tráquea y pulmón de 6 cerdos clínicamente sanos y serológicamente negativos a *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRS, Aujeszky y *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se cuantificó la presencia de células plasmáticas.

Las muestras obtenidas fueron procesadas por el método de parafina. Los cortes obtenidos se tiñeron con H-E para observar la histología normal de la especie porcina y mediante tinción de verde metil pironina se evidenció y cuantificó la presencia de células plasmáticas.

Se cuantificaron las células plasmáticas (CP) de cerdos con un peso aproximado de 100 Kg. (finalización) por tinción verde metil pironina y observación morfológica. Las CP se encontraron en cantidades escasas, los promedios obtenidos de los 6 cerdos fueron analizados mediante el programa estadístico Graph pad Prisma ® por la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, la tráquea presentó el menor número de células en promedio  $0.29 \pm 0.24$ . Entre las diferentes regiones de los pulmones estratigráficamente delimitadas obtuvimos  $0.56 \pm 0.34$ , en el pulmón izquierdo lóbulo craneal en la porción del ápice, mientras que el pulmón derecho lóbulo caudal, extremo central del borde dorsal presento  $3.20 \pm 3.37$  siendo este el mayor número de células observado en todo el pulmón sin embargo, quien mostró diferencia significativa en la media ( $P < 0.01$ ) fue el pulmón derecho lóbulo craneal en la porción del ápice  $2.99 \pm 4.29$ .

Por otra parte la tonsila dio un total de  $22.14 \pm 31.99$  mostrando diferencia estadística en la media ( $P < 0.01$ ) comparada con las demás regiones de estudio. Esto debido principalmente a que forma parte del sistema inmune de las mucosas respiratoria y digestiva, tomando en consideración que trabajamos con cerdos adultos cuyo sistema inmune ya ha sido enfrentado a diversos antígenos; no se encontraron datos numéricos de esta región en otras especies.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. HISTORIA

Las células conocidas actualmente como plasmocitos fueron descritos por primera vez en 1890 por Santiago Ramón y Cajal, de la Universidad de Barcelona, España, quien los denominó con el nombre de cianófilas y postuló que se originaban a partir de linfocitos <sup>(Anaya, 2002; Soyano, 2003)</sup>. Posteriormente, estas mismas células fueron descritas en 1891 por Paul Gerson Unna, <sup>(Anaya, 2002)</sup> renombrado dermatólogo de Hamburgo, quien utilizó el término plasmocito para referirse a las células redondeadas u ovaladas con citoplasma basófilo observadas en el tejido conectivo de la dermis, particularmente en casos de lupus crónico, y que podrían ser fácilmente diferenciadas de otras células adventicias, mediante tinción con azul de metileno y colorantes básicos de anilina. Es ahora evidente que dentro de las células de citoplasma basófilo abundante definidas por Cajal y Unna se incluyeron otros tipos celulares que en la actualidad no serían considerados como plasmocitos, ya que bajo ciertas condiciones algunas células como fagocitos y fibroblastos pueden presentar esa misma característica. <sup>(Soyano, 2003)</sup>

Una mejor caracterización de tales células fue obtenida por T.V. Marschalko en 1895, quien describió la apariencia típica del núcleo (apariencia de rueda de carreta; "Radkern", de Pappenheim) y la zona citoplasmática clara central cerca del núcleo. <sup>(Soyano, 2003)</sup>

En 1941, Albert H. Coons mediante la técnica de inmunofluorescencia demostró que el citoplasma de los plasmocitos era rico en anticuerpos específicos contra un determinado antígeno. <sup>(Soyano, 2003)</sup>

A partir de 1942, en Estocolmo, Astrid Fagraeus comienza a evaluar en conejos la correlación existente entre plasmocitos y producción de globulinas en general. Ella encontró que la administración repetida de suero de caballo producía un incremento

## *Introducción*

muy marcado en el contenido de plasmocitos en diferentes estadios de desarrollo en el bazo y linfonodos, lo cual era investigado en secciones de estos órganos teñidas con verde metil pironina según la técnica descrita por Unna y Pappenheim. (Soyano, 2003)

Fagraeus por otro lado, demostró que los plasmocitos presentaban un alto contenido citoplasmático de ribonucleótidos, una característica típica de células que sintetizan proteínas. También propuso que la vía de diferenciación de las células productoras de anticuerpos se iniciaba a partir de células reticulares, pasando por células transicionales, plasmocitos inmaduros y finalmente plasmocitos maduros. Una observación interesante durante este trabajo fue que el número de células transicionales presentes era siempre mayor que el número de células plasmáticas. Una explicación a esta observación sólo sería posible muchos años más tarde cuando se demostraría que un cierto número de tales células transicionales eran linfocitos T. (Soyano, 2003)

Las pruebas definitivas de que los plasmocitos son en realidad las células productoras de anticuerpos fueron presentadas en 1957 por G.J.V. Nossal quién usó la técnica de la gota colgante para aislar células individuales a partir de linfonodos de ratas inmunizadas con una proteína extraída de los flagelos de la bacteria *Salmonella typhi*, así demostró que un plasmocito sólo produce anticuerpos de una sola especificidad, es decir, dirigidos contra un solo antígeno. (Soyano, 2003)

## **1.2. MECANISMOS DE DEFENSA**

El cerdo como todos los mamíferos domésticos, posee un sistema inmune que le ha permitido sobrevivir como individuo durante su vida útil y como especie a través de la evolución <sup>(Morilla, 1989)</sup>. La activación de la respuesta inmune (natural o adquirida) se produce por una serie de mecanismos que de forma coordinada activan diferentes poblaciones celulares (linfocitos T y B, macrófagos, células presentadoras, células NK, etc.) y la secreción de diferentes moléculas (anticuerpos, citocinas y complemento) con la finalidad de eliminar al agente extraño.

Para entrar y progresar en la infección un agente extraño tiene que superar diferentes etapas en las cuales intervienen diversos medios de protección <sup>(Sánchez Vizcaino, 2004)</sup>, los cuales provienen de un complejo sistema de mecanismos que se superponen e interrelacionan de modo que pueden en conjunto destruir o controlar a casi cualquier invasor <sup>(Tizard, 2002)</sup>.

### **1.2.1. Barreras Físicas**

Están constituidas por la piel, secreciones de las mucosas, enzimas proteolíticas, pH del estómago <sup>(Sánchez Vizcaino, 2004)</sup>, entre otras, que aunados a los procesos de auto limpieza como la tos, el estornudo, y el flujo de moco en las vías respiratorias, el vómito y la diarrea en el tubo digestivo, y el flujo de orina en las vías urinarias <sup>(Tizard, 2002)</sup> permiten rechazar un gran número de agentes patógenos <sup>(Halliwell, 1989)</sup>.

### **1.2.2. Inmunidad Innata**

Aunque muy útiles, las barreras físicas no son del todo eficaces por sí solas, ya que con el tiempo y la persistencia suficientes, el invasor llega a vencer los obstáculos físicos, por lo que interviene la siguiente línea de defensa la cual, mediante la activación de factores humorales como el complemento, celulares como la



fagocitosis o la activación de las células NK y Citocinas presentan una alta capacidad de eliminación de agentes infecciosos.

### **1.2.3. Inmunidad Adaptativa**

Ésta se desarrolla a lo largo del tiempo y retiene en la memoria la especificidad inmunológica del patógeno <sup>(Day, 1999)</sup>, es decir, depende de la exposición previa del organismo a un agente extraño y del subsiguiente reconocimiento y respuesta hacia éste <sup>(Ramírez, 1982)</sup>. Sus características principales son especificidad, diversidad, memoria, especialización, auto limitación y ausencia de auto reactividad <sup>(Abbas, 2004)</sup>.

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, denominadas inmunidad humoral e inmunidad celular, que están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar distintos tipos de organismos <sup>(Abbas, 2004)</sup>.

#### **1.2.3.1. Inmunidad humoral**

Se dirige primordialmente contra los invasores extracelulares o exógenos a los que destruyen ante todo las proteínas llamadas anticuerpos <sup>(Tizard, 2002)</sup>, que son producidos por células que reciben el nombre de células plasmáticas (linfocitos B activados) <sup>(Abbas, 2004)</sup>.

#### **1.2.3.2. Inmunidad Celular**

Está mediada por linfocitos T. Este tipo de reacción inmunitaria combate a los invasores intracelulares o endógenos <sup>(Tizard, 2002)</sup>, los cuales sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped donde son inaccesibles a los anticuerpos circulantes <sup>(Abbas, 2004)</sup>. Estos invasores ocasionan anomalías en las células por lo que son destruidas por linfocitos T citotóxicos <sup>(Tizard, 2002)</sup>.

### 1.3. ÓRGANOS LINFOIDES

Los órganos linfoides se clasifican como primarios y secundarios en función de su participación en los procesos de diferenciación, maduración y especialización de las células linfoides <sup>(Rojas, 2001)</sup>.

#### 1.3.1. Órganos Linfoides Primarios

Su principal función es la producción, diferenciación y maduración de linfocitos. Están formados por la médula ósea y el timo.

**Médula ósea.** Se considera el principal órgano linfopoyético primario del cerdo. Se encuentra distribuido en el interior de todos los huesos del animal, principalmente en los huesos largos. En ella se producen las células madre linfopoyéticas que originarán los futuros macrófagos y linfocito B y T <sup>(Sánchez Vizcaino, 2004)</sup>.

**Timo.** 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 <sup>(Stites, 1993)</sup>. En este órgano los linfocitos no sólo terminan su diferenciación y se convierten en linfocitos T maduros; éste órgano elimina aquellos linfocitos T con receptores autorreactivos, es decir, receptores para antígenos propios, y permite la proliferación de linfocitos T con receptores para antígenos propiamente dichos. Esto implica que una gran proporción de los linfocitos T generados son destruidos ahí mismo, antes de que salgan a la circulación sanguínea o a poblar órganos linfoides secundarios <sup>(Montaraz, 1997)</sup>.

#### 1.3.2. Órganos Linfoides Secundarios

Son los principales sitios donde se lleva a cabo la captación y procesamiento de antígenos, replicación y diferenciación de linfocitos <sup>(Sánchez Vizcaino, 2004)</sup>. Estos órganos son ricos en macrófagos y células dendríticas, así como linfocitos T y B <sup>(Tizard, 2002)</sup>. Están formados a nivel sistémico por linfonodos y bazo; a nivel de

## Introducción

mucosas por tejido linfoide asociado a mucosas (tonsilas y linfonódulos agregados antes conocidos como placas de Peyer) (Sánchez Vizcaino, 2004).

**Linfonodos.** Su función es la de retener los antígenos que puedan llegar a través de la linfa y proceder a su presentación y procesamiento antigénico mediante la colaboración de los macrófagos y los linfocitos que lo componen (Sánchez Vizcaino, 2004).

El cerdo presenta una circulación linfática y disposición celular diferente a la de otros mamíferos ya que sus linfonodos constan de varios nódulos orientados de tal manera que la corteza de cada nódulo se localiza en el interior del linfonodo mientras que la médula se encuentra en la periferia (Tizard, 2002). El tejido cortical está constituido por los linfonódulos y el tejido linfoide difuso. Los linfonódulos están a su vez constituidos por el centro germinal formado fundamentalmente por linfocitos B y algunas poblaciones de linfocitos T (CD4+). Aquí tendrá lugar la selección de linfocitos B de alta afinidad para reaccionar con el antígeno (Sánchez Vizcaino, 2004). El tejido linfoide difuso o paracorteza está constituido principalmente por linfocitos T además de macrófagos y células dendríticas. El tejido medular no presenta, como en otras especies, ni cordones ni senos medulares, por tanto es relativamente impermeable a las células que se desplazan por la linfa por lo que es pobre en linfocitos, aunque sí se observan macrófagos y células dendríticas (Tizard, 2002).

**Bazo.** Este órgano lleva a cabo dos funciones principales, por un lado hace de filtro a nivel sanguíneo para realizar el reconocimiento de antígenos y células envejecidas (función inmunológica), por otro lado almacena eritrocitos y plaquetas (función hematopoyética). Se divide en dos compartimentos la pulpa blanca y la pulpa roja. La pulpa blanca está distribuida alrededor de una arteria o arteriola, formando linfonódulos y vainas linfoides periarteriales. Los linfonódulos están constituidos por linfocitos (principalmente B), algunas células plasmáticas y células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas). Las vainas

## *Introducción*

linfoides periarteriales están constituidas por linfocitos T encontrándose algunos linfocitos B en las zonas más periféricas. Una característica significativa del bazo del cerdo es que dentro de la población de linfocitos T son más numerosos los linfocitos CD4+ que los CD8+. La pulpa roja está constituida por tres estructuras diferentes: a) los cordones esplénicos los cuales sostienen un gran número de células libres de la circulación sanguínea como monocitos, eritrocitos y plaquetas así como macrófagos fijos localizados en las fibras musculares. b) Senos venosos carecen de fenestración de la membrana basal, lo que permite que los macrófagos esplénicos puedan realizar más fácilmente su labor fagocítica. c) Los capilares envainados los cuales presentan un gran número de macrófagos (Sánchez Vizcaino, 2004).

***Tejido linfoide asociado a las mucosas.*** Igual que en la piel, las superficies mucosas son barreras entre el medio interno y externo y, por tanto son un lugar importante de entrada de microorganismos (Abbas, 2004). Este tejido se localiza a lo largo de las mucosas, presenta una relativa independencia del sistema inmune sistémico (Sánchez Vizcaino, 2004) ya que a diferencia de los linfonodos, estos tejidos linfoides organizados no reciben antígenos extraños de la linfa aferente, sino que los toman directamente de la luz del órgano (Tizard, 2002). Está constituido por el Tejido linfoide asociado al aparato digestivo (Gut Associated Lymphoid Tisúes, GALT por sus siglas en inglés), el Tejido linfoide asociado a bronquios (Broncus Associated Lymphoid Tisúes, BALT por sus siglas en inglés) y tonsila (Cordero, 2004).

El **GALT** está formado por el tejido linfoide que se encuentra en las paredes intestinales (linfonodos, linfonódulos agregados, linfonódulos solitarios).

a) *Linfonódulos agregados.* Durante mucho tiempo fueron nombrados placas de Peyer, consisten en masas de linfocitos dispuestos en folículos y están por debajo de un epitelio que contiene células epiteliales especializadas, las células M (células con micropliegues) captan antígenos de la luz del intestino y los presentan directamente a los linfocitos contenidos en el interior de la placa. En el cerdo y

## Introducción

rumiantes se pueden diferenciar dos tipos de linfonódulos agregados en el intestino delgado, las yeyunales y las ileocecales, las cuales difieren en localización, estructura y función (Tizard, 2002). Los linfonódulos agregados yeyunales están distribuidos a lo largo del yeyuno y porción proximal del íleon, son placas de pequeño tamaño las cuales persisten durante toda la vida del cerdo y están formadas por linfocitos B y T. Los linfonódulos agregados ileocecales son de grandes dimensiones, están localizadas en la porción terminal del íleon e involucionan durante el primer año de vida del animal. Están constituidas por linfocitos B en una proporción de hasta diez veces mayor que de linfocitos T (Sánchez Vizcaíno, 2004).

b) *Linfonódulos solitarios*. Están localizados a lo largo del tracto digestivo del cerdo, sobre todo en el estómago y en el intestino grueso, tanto al nivel de la mucosa como de la submucosa cubiertos por un epitelio similar al de los linfonódulos agregados y cuya función es similar a éstas (Sánchez Vizcaíno, 2004).

El **BALT** está localizado en el pulmón principalmente a lo largo del bronquio principal y cerca de las bifurcaciones, es decir, en los sitios donde se favorece el impacto entre el antígeno y el epitelio. Consiste en folículos linfáticos con centros germinales desarrollados en la lámina propia de la mucosa por debajo de un epitelio especializado (Acosta, 1992). También hay linfocitos que se distribuyen de manera difusa en el pulmón y las paredes de las vías respiratorias. Suele haber células M asociadas a los nódulos linfoides (Tizard, 2002). El BALT puede ser dividido en tres regiones anatómicas que son: a) la región central o centronodular constituido principalmente de linfocitos B así como células dendríticas o macrófagos, b) la región periférica que rodea a la región central y que contiene linfocitos T cooperadores (CD4+), supresores/citotóxicos (CD8+) y posiblemente células NK, c) la región subepitelial asociada con la presencia de macrófagos y/o células dendríticas (Acosta, 1992).

**Tonsilas.** Forman parte del sistema de inmunidad de las mucosas respiratorias y digestivas. Están formadas por nódulos linfoides con sus centros germinativos, que son agrupaciones circunscritas y compactas formadas por gran cantidad de linfocitos B, que se encuentran dentro del tejido linfoide difuso, principalmente formado por linfocitos T. En las tonsilas se produce fundamentalmente inmunoglobulina G, seguido de Inmunoglobulina A <sup>(Sánchez Vizcaíno, 2004)</sup>.

## **1.4. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE**

Las células del sistema inmunitario se forman a partir de las células madre pluripotenciales, mediante dos vías de diferenciación principales, la estirpe linfoide que da lugar a los linfocitos y la estirpe mieloide que da lugar a los fagocitos como son monocitos, macrófagos, granulocitos (eosinófilos, neutrófilos y basófilos) y células dendríticas <sup>(Roitt, 2001, Sánchez Vizcaíno, 2004)</sup>. La línea linfoide es la responsable de llevar a cabo las principales funciones que caracterizan al sistema inmune y que le permite reaccionar frente a moléculas extrañas de forma específica, así como recordarlas para una futura posible invasión (memoria). La línea mieloide forma parte de la inmunidad natural o innata y juega un papel esencial en la iniciación de la inmunidad adquirida, siendo las funciones principales de esta línea la fagocitosis, presentación de antígenos y la producción de citocinas.

### **1.4.1. Características de los Linfocitos porcinos**

Los linfocitos son pequeñas células redondeadas, se encuentran diseminados por todo el organismo. La mayor parte se concentra en linfonodos, bazo y médula ósea; su tamaño varía entre 7 y 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, contienen un núcleo grande y redondo, poseen un borde delgado de citoplasma que contiene algunas mitocondrias, ribosomas libres y un pequeño aparato de Golgi <sup>(Tizard, 2002)</sup>. La participación de estas células es esencial en todas las respuestas inmunitarias

adaptativas, ya que reconocen de forma específica patógenos individuales, independientemente de que estos se localicen en el interior de las células del hospedador o en el exterior de las mismas, en los líquidos tisulares o en la sangre. Existen diversos tipos de linfocitos, pero se pueden incluir dentro de dos categorías básicas: los linfocitos T y los linfocito B <sup>(Roitt, 2001)</sup>. Algunos linfocitos sanguíneos no son T ni B, sino que pertenecen a una tercera población de linfocitos denominada células asesinas naturales (NK).

#### **1.4.1.1. Linfocitos T**

Son mediadores de la inmunidad celular <sup>(Sánchez Vizcaíno, 2004)</sup>, reciben este nombre debido a que sus precursores proceden de la médula ósea, pero migran y maduran en el timo <sup>(Abbas, 2004)</sup>. Una vez que lo abandonan se acumulan en la paracorteza de los linfonodos, las vainas linfoides periarteriolas del bazo y las regiones interfoliculares de los linfonódulos agregados. Son la población linfocítica circulante que predomina, y representa hasta el 80% de los linfocitos en sangre periférica. Muchas de estas células circulan de manera continua a través de los órganos linfáticos y la sangre. <sup>(Tizard, 2002)</sup> Existen dos subtipos de linfocito T, cooperadores y citotóxicos.

#### **1.4.1.2. Células NK**

Quizá se originan de las mismas células madre que los linfocitos T pero no sufren modificaciones en el timo. En la especie porcina, las células NK son linfocitos pequeños o medianos agranulares, a diferencia de la especie murina y humana en las que las células NK son linfocitos grandes y granulares <sup>(Sánchez Vizcaíno, 2004)</sup>, son escasos en la sangre y abundan en los órganos linfoides <sup>(Tizard, 2002)</sup>. Su función está ligada a los mecanismos de respuesta natural o innata. Presentan una actividad citotóxica frente a células infectadas por virus y células tumorales <sup>(Sánchez Vizcaíno, 2004)</sup>.

### **1.4.1.3. Linfocitos B**

Estas células constituyen el principal tipo celular que participa en la inmunidad humoral, es decir, en efectos de protección mediados a través de líquidos tisulares (Parslow, 2002). Se originan en la médula ósea, aunque maduran en los linfonódulos agregados o en la propia médula antes de emigrar a los órganos linfoides secundarios. Se encuentran en la corteza de los linfonodos, en folículos dentro de linfonódulos agregados y bazo, y en la zona marginal de la pulpa blanca esplénica. Sólo una pequeña fracción de los linfocitos sanguíneos son linfocitos B. Sin embargo, la mayor parte de estos circulan durante un periodo prolongado (Tizard, 2002). La función principal de los linfocitos B es sintetizar proteínas llamadas inmunoglobulinas. Los descendientes de un linfocito B activado pueden diferenciarse ya sea en linfocitos B de memoria o en células plasmáticas. Los linfocitos B maduros pueden expresar inmunoglobulinas de dos modos distintos, cada uno de los cuales sirve para realizar funciones particulares. En los linfocitos B en reposo (vírgenes o de memoria) las inmunoglobulinas se expresan sólo en la superficie celular, donde actúan como receptores unidos a la membrana para antígenos específicos. En contraste, las células efectoras de línea celular B (llamadas células plasmáticas) están especializadas para secretar grandes cantidades de inmunoglobulinas (Anticuerpos) en su medio circundante. Las células B también desempeñan dos funciones adicionales en el sistema inmunitario. En primer lugar, pueden funcionar como células presentadoras de antígeno al transformar y mostrar las sustancias extrañas, de manera que los linfocitos T puedan reconocerlas. En segundo lugar las células B activadas pueden secretar ciertas citocinas, así como otros factores que influyen en el crecimiento y las actividades de otras células inmunológicamente importantes (Parslow, 2002).



#### **1.4.1.4. Células Plasmáticas**

Las células plasmáticas son ovoides y miden de 8 a 9  $\mu\text{m}$  de diámetro. Poseen un núcleo excéntrico redondo, con distribución desigual de la cromatina. El núcleo puede semejar una carátula de reloj o una rueda de carreta. Poseen abundante citoplasma rico en retículo endoplásmico rugoso <sup>(Tizard, 2002)</sup> en el que se lleva a cabo la síntesis de los anticuerpos y otras proteínas secretadas de membrana <sup>(Roitt, 2001)</sup>, se tiñe intensamente con los colorantes básicos y la tironina, también posee un aparato de Golgi grande que se tiñe de un tono pálido <sup>(Tizard, 2002)</sup> en el que las moléculas de anticuerpos se convierten en sus formas finales y son empaquetados para su secreción <sup>(Roitt, 2001)</sup>. Las células plasmáticas (plasmocitos) se originan de linfocitos B estimulados por antígeno. Se encuentran distribuidas en todo el cuerpo pero se localizan en mayor cantidad en bazo, médula de los linfonodos y médula ósea. <sup>(Tizard, 2002, Roitt, 2001.)</sup> Se desarrollan en los órganos linfoides y en sitios de respuestas inmunitarias, y con frecuencia migran a la médula ósea donde algunas de ellas pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo una vez inducida la respuesta inmune incluso una vez eliminado el antígeno <sup>(Abbas, 2004)</sup>. En tanto que las células plasmáticas que permanecen en el tejido linfoide producen anticuerpos durante casi una semana para finalmente morir mediante un proceso de apoptosis por lo que es raro encontrar células plasmáticas circulantes <sup>(Parslow, 2002, Roitt, 2001)</sup>. Las células plasmáticas sintetizan y secretan aproximadamente 10,000 moléculas de inmunoglobulinas por segundo tales como IgG, IgA, IgM e IgE. La inmunoglobulina producida por una célula plasmática tiene idéntica especificidad de unión a antígeno que el BCR (Receptor de células B) original del linfocito B progenitor.

### **1.4.2. Marcadores de Superficie de los Linfocitos**

Los linfocitos (así como otros leucocitos) expresan un gran número de moléculas de superficie diferentes, que se pueden utilizar para distinguir o marcar las distintas poblaciones celulares. En la actualidad, muchos de estos marcadores celulares pueden ser detectados mediante anticuerpos monoclonales específicos. Se ha desarrollado un método sistemático de nomenclatura denominado sistema CD (del inglés Cluster designation, denominación de grupo) el cual designa grupos (cluster) de anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales se une específicamente a un determinado marcador celular. Los anticuerpos monoclonales de características parecidas se agrupan conjuntamente, y se les asigna un número CD. Sin embargo, en la actualidad es costumbre utilizar el número CD para designar a la molécula de marcador que reconoce cada uno de los grupos de anticuerpos monoclonales <sup>(Roitt, 2001)</sup>.

Las estructuras más importantes de la superficie de los linfocitos son sus receptores de antígeno, denominados Receptores de linfocitos T (*T cell receptors*, TCR) y receptores de linfocitos B (*B cell receptors*, BCR). Ambos son estructuras complejas que contienen muchas proteínas diferentes. Existen dos tipos de TCR, uno que utiliza cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y otro que emplea cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ . Además existen varias formas de BCR que se sirven de una gran variedad de cadenas como  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$ ,  $\alpha$  o  $\delta$ . Los BCR difieren también de los TCR en que se desprenden de la célula para ingresar al líquido tisular y torrente sanguíneo, donde se les llama anticuerpos <sup>(Tizard, 2002)</sup>.

#### **1.4.2.1. Marcadores de Superficie de los Linfocitos T**

Los linfocitos T funcionales y maduros, expresan varias proteínas de superficie características, además de los receptores de células T. Los receptores de superficie de las células T siempre se expresan junto con otros cinco polipéptidos de

## Introducción

superficie que se conocen en conjunto como complejo CD3. Estas proteínas CD3 se relacionan físicamente con los receptores de célula T <sup>(Parslow, 2002)</sup>. Su función es llevar una señal desde el receptor hasta la célula cuando el TCR se une a un antígeno. Por tanto todos los linfocitos T tienen CD3. Las células T  $\alpha$  y  $\beta$  se subdividen en 2 poblaciones; una subpoblación que posee el marcador CD4 el cual sólo existe en los linfocitos T, a estos linfocitos se les conoce como linfocitos T de ayuda, que reconocen el antígeno exógeno procesado y además reconocen las moléculas del MHC (mayor histocompatibility complex, complejo principal de histocompatibilidad) clase II, conocido en el cerdo como SLA (Swine Leucocyte Antigens) clase II las cuales se localizan en la superficie de las células presentadoras de antígenos tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B <sup>(Sánchez Vizcaino, 2004)</sup>. La otra subpoblación posee el marcador CD8, que atacan y matan células que tengan moléculas extrañas en su superficie, por lo que se les denomina linfocitos T citotóxicos. El CD8 es un receptor para moléculas MHC clase I (SLA I) <sup>(Tizard, 2002)</sup> que se localiza en la superficie de la mayor parte de las células nucleadas <sup>(Sánchez Vizcaino, 2004)</sup> y es necesario para reconocer el antígeno endógeno procesado <sup>(Tizard, 2002)</sup>.

En el cerdo aparece una población doble positivos a CD4+ y CD8+ (CD4+CD8+) que aumenta su proporción con la edad del animal. La función de estos linfocitos doble positivos últimamente se ha relacionado con la actividad cooperadora de los linfocitos T en las infecciones primarias. Así, parece que existen dos poblaciones de células cooperadoras, las CD4+CD8- y las CD4+CD8+. Ambas poblaciones actúan en la cooperación celular en la respuesta primaria al menos “*in vitro*”, mientras que en la respuesta secundaria parecen actuar solamente las CD4+CD8+. En cuanto a los linfocitos citotóxicos, se pueden diferenciar dos subpoblaciones de CD4-CD8+ en virtud a la expresión del CD6. Los linfocitos que expresan el antígeno CD6- están relacionados con la citotoxicidad espontánea mientras que los

## Introducción

CD6+ SLA I, lo están con la citotoxicidad de células infectadas por virus (Sánchez Vizcaíno, 2004).

Los principales CD desarrollados para el estudio de los diferentes linfocitos T en cerdos son:

- CD1: Se encuentra en el 60% de los linfocitos T de la zona cortical del Timo. Tienen gran homología con el SLA I.
- CD2: Presente en la mayoría de los linfocitos T con receptores TcR  $\alpha - \beta$  (Linfocitos T $\alpha\beta$ ). Los linfocitos T con TcR  $\gamma - \delta$  (Linfocitos T  $\gamma \delta$ ) son negativos a CD2- o lo expresan en porcentajes muy bajos (3 a 6%). Estos linfocitos llamados anteriormente como células nulas, son identificados por el anticuerpo monoclonal SWC6.
- CD3: Presente en linfocitos relacionados con la activación y supresión celular.
- CD4: Presentes en los linfocitos T cooperadores y en los responsables de la inmunidad retardada. Estos reconocen el SLA II.
- CD6: Presente en las células ligadas a la citotoxicidad.
- CD8: Se localiza en los linfocitos T responsables de la citotoxicidad. Los linfocitos CD8+ reconocen el SLA I.
- CD16: Para diferenciar células NK. (Sánchez Vizcaíno, 2004)

### 1.4.2.2. Marcadores de superficie de los linfocitos B

Al igual que el TCR, el BCR se divide en dos componentes bien delimitados. Uno de ellos se une al antígeno y el otro envía señales apropiadas al linfocito B. El componente de unión al antígeno del BCR o inmunoglobulina consta de cuatro cadenas peptídicas, de las cuales dos cadenas son pesadas y dos son ligeras. Ambas cadenas ligeras son idénticas entre sí, al igual que las cadenas pesadas. Existen dos

## *Introducción*

tipos de cadenas ligeras, denominadas  $\kappa$  y  $\lambda$ , con secuencias de aminoácidos diferentes, <sup>(Tizard, 2002)</sup> que pueden combinarse con cualquier clase de inmunoglobulina <sup>(Montaraz, 1997)</sup>. Existen cinco tipos bien delimitados de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, llamados  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\mu$ , que definen la clase o isotipo de la inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas con dos cadenas pesadas  $\alpha$  se denominan inmunoglobulina A (IgA), las que contienen dos cadenas  $\gamma$  (IgG), dos cadenas  $\mu$  forman IgM, dos cadenas  $\delta$  constituyen IgD y un par de cadenas  $\epsilon$  generan IgE. El BCR se asocia con dos proteínas adicionales, CD79a (Ig $\alpha$ ) y CD 79b (Ig $\beta$ ) expresadas exclusivamente en los linfocitos B, las cuales actúan como transductores de señales <sup>(Tizard, 2002)</sup>.

Principales CD desarrollados para el estudio de los linfocitos B en cerdos:

- CD1: Presenta gran homología con el SLA I, se observa en los linfocitos B (slg+) de sangre periférica en una proporción del 30 al 60% y en los linfocitos T de la zona cortical del timo alrededor del 60% de la totalidad.
- CD21: Se observa en la membrana de los linfocitos maduros.
- CD45: Se observa en linfocitos B y en algunas subpoblaciones de linfocitos T.
- SWC7: Se localiza en los linfocitos B situados en los órganos linfoides, ya que en la sangre periférica no aparece. <sup>(Sánchez Vizcaíno, 2004)</sup>

## **1.5. RESPUESTA INMUNITARIA**

Ésta se desencadena cuando un antígeno ingresa al cuerpo y encuentra una clase especializada de células conocidas como células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y células B) que expresan moléculas clase II del MHC en su superficie. Estas células capturan una cantidad diminuta del antígeno y la presentan de manera que puede ser reconocida por linfocitos T cooperadores específicos del antígeno. Las células T cooperadoras requieren cuando menos dos señales para su activación. Una señal que se inicia por la unión del receptor de la célula T al complejo antigénico péptido MHC en la superficie de las células presentadoras de antígeno y se transmite a través del complejo proteínico CD3; la segunda, la señal coestimulante también requiere un contacto íntimo entre la superficie de la célula presentadora de antígeno y de la célula T cooperadora, y por lo general quién la emite es una proteína receptora de la célula T cooperadora llamada CD28 cuando ésta se fija a una de las dos proteínas B7 presentes en la superficie de la célula presentadora de antígeno (linfocito B). Estas dos señales inducen a la célula T cooperadora para que comience a secretar interleucina 2 (IL-2) y también para que inicie la expresión de receptores de IL-2 de afinidad sumamente específica en su superficie. La IL-2 resulta esencial para la respuesta proliferativa de célula T activada ejerciendo su efecto mayor en la célula de la cual se secreta (efecto autócrino); también actúa en la activación de las células T citotóxicas que casi nunca producen IL-2. El linfocito T cooperador después de ser activado también expresa una proteína llamada ligando de CD40 (CD40L) que ayuda a activar a la célula B a través de su fijación a receptores CD40 localizados en su superficie, lo que conduce a la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Este linfocito B activado crece y se divide repetidas veces, una parte de su progenie se diferencia a células plasmáticas y otra a linfocitos B de memoria. Las células plasmáticas secretan grandes cantidades de inmunoglobulinas <sup>(Parslow, 2002)</sup>.

## *Introducción*

Los linfocitos B de memoria forman una reserva de células sensibles al antígeno que son invocadas durante el siguiente contacto con éste, <sup>(Tizard, 2002)</sup> residen al final dentro de los folículos linfoides, donde sobreviven por años; si se activan subsecuentemente, realizan ciclos adicionales de replicación para producir aún más células de memoria y plasmáticas <sup>(Parslow, 2002)</sup>. Los linfocitos T citotóxicos actúan para erradicar las células que expresan antígenos extraños en sus superficies. La mayor parte de estas células expresan CD8 más que CD4, y por tanto, reconocen antígenos en relación con clase I más que proteínas del MHC de clase II. Los complejos péptido - MHC pueden ser reconocidos por el receptor de célula T como una clona específica del antígeno, lo cual proporciona una de dos señales necesarias para la activación celular de los linfocitos T citotóxicos. Ésta primera señal, por sí sola, induce receptores para IL-2 de gran afinidad en el linfocito T citotóxico. La segunda señal la proporciona la IL-2 secretada por un linfocito T cooperador activado cercano. Al recibir ambas señales la célula T cooperadora activada adquiere actividad citotóxica, la cual le permite matar a la célula a la que está unida, así como a otras células que tengan los mismos complejos péptido - MHC de clase I. La muerte puede ser inducida debido a que el linfocito T citotóxico libera toxinas específicas sobre la célula blanco, o mediante apoptosis <sup>(Parslow, 2002)</sup>. Los linfocitos T de memoria expresan diferentes moléculas de superficie celular, secretan una mezcla diferente de citocinas y tienen necesidades de activación distintas <sup>(Tizard, 2002)</sup>, tienen una vida prolongada o la capacidad de autorrenovarse, y persisten por años <sup>(Parslow, 2002)</sup>. En cada etapa de este proceso, los linfocitos y las células presentadoras de antígeno se comunican entre sí a través de contacto directo o mediante la secreción de citocinas reguladoras. También pueden interactuar de modo simultáneo con otros tipos celulares o con componentes del complemento, cinina o sistemas fibrinolíticos lo cual origina la activación de los

fagocitos, la coagulación de sangre o el inicio de la cicatrización de las heridas (Parslow, 2002).

## **1.6. INMUNIDAD DE LAS MUCOSAS**

La función primaria del sistema inmunitario de las mucosas es proporcionar defensa al individuo en las superficies mucosas, ésta función la realiza en conjunto con diversos factores protectores no inmunitarios, como son: flora bacteriana normal, actividad motriz mucosa, sustancias como ácido gástrico y sales biliares intestinales, secreciones mucosas y factores humorales innatos. Una segunda función del sistema inmunitario de las mucosas es evitar la entrada de antígenos de la mucosa a la circulación y proteger así al sistema inmunitario sistémico de exposición antigénica inadecuada (Parslow, 2002). Las mucosas contienen una cantidad considerable de tejidos linfoides, los cuales se clasifican en dos grupos: sitios inductivos que son lugares en donde se procesan los antígenos e inicia la respuesta inmune y sitios efectoros que son lugares en donde se forman los anticuerpos y se montan respuestas mediadas por células (Tizard, 2002, Parslow, 2002, Sánchez Vizcaíno, 2004). Las zonas inductoras disponen de elementos semejantes a los componentes del sistema inmune sistémico para realizar la captación de los antígenos e iniciar la respuesta inmune. Con la única diferencia de las células M, que son células epiteliales especializadas en el transporte de antígenos, no actúan enzimáticamente sobre ellos sino que los captan de la luz de la mucosa, los transportan completamente intactos y los presentan a los linfocitos intraepiteliales o pasan por el espacio intercelular hacia el líquido hístico y presentan el antígeno a las células presentadoras tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B presentes en el espacio subepitelial o en la lámina propia. Estas células presentadoras activan a los linfocitos B y T, los cuales una vez estimulados en estas zonas de inicio, abandonan el área mediante el sistema sanguíneo, migrando hacia las diferentes zonas efectoras por lo que la respuesta inmune es generalizada en todo el



organismo del animal. En las zonas efectoras también pueden presentarse antígenos, aunque el mecanismo de entrada suele ser diferente al de las zonas inductoras ya que el antígeno puede acceder por endocitosis, mediante las células epiteliales o atravesar las llamadas zonas o uniones estrechas. La captura y presentación se realiza mediante macrófagos, células M o linfocitos B desencadenando una reacción similar a la anteriormente mencionada (Tizard, 2002, Sánchez Vizcaíno, 2004)

## **1.7. ANATOMÍA DEL APARATO RESPIRATORIO**

El aparato respiratorio consta de una porción conductora, una porción respiratoria y un mecanismo de bombeo mediante el cual, el aire es alternativamente dirigido hacia dentro (inspiración) o hacia fuera (expiración).

La porción conductora es a través de la cual pasa el aire para alcanzar la porción respiratoria y comprende: nariz externa, cavidad nasal, faringe, laringe, tráquea, bronquios y bronquiolos; en algunas ocasiones la cavidad oral sirve como entrada para el paso del aire a la faringe, y de ésta a las vías respiratorias inferiores. (Getty, 1982)

La porción respiratoria comprende: bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos pulmonares, en donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso.

Los componentes esenciales del aparato de bombeo son: los dos sacos pleurales que envuelven los pulmones y forman una cámara de vacío alrededor de ellos, el esqueleto del tórax (vértebras, costillas y esternón), y músculos asociados a la respiración, entre ellos el más importante es el diafragma. (Getty, 1982, Climent, 2005)

## *Introducción*

La nariz externa está constituida por el dorso nasal, que forma el caballete de la nariz cuyo origen a nivel de los ángulos palpebrales se denomina raíz nasal y al extremo rostral, ápice nasal. Los orificios nasales son la entrada a la cavidad nasal, están separados por la parte móvil del tabique nasal y contiene en el cerdo un pequeño hueso (os rostrale). El extremo libre del tabique presenta inserción a los cartílagos nasal lateral dorsal y lateral ventral así como los cartílagos alares que son los que proporcionan el soporte a los bordes dorsal y lateral del orificio nasal determinando su forma que en el caso del cerdo es redondeada <sup>(Bernal, 2002, Dyce, 1999).</sup>

La cavidad nasal se divide en dos partes, derecha e izquierda, por el tabique nasal constituido rostralmente por el cartílago del tabique nasal (septo cartilaginoso) y en su parte caudal y ventral por la lámina perpendicular del etmoides y el hueso vómer respectivamente (porción ósea del tabique nasal). En la parte dorsal del tabique nasal existe un área libre de cartílago (porción membranosa del tabique nasal). La entrada de la cavidad nasal está representada por los orificios nasales y la salida por las coanas, que se localizan en la parte más caudal del piso de la cavidad y comunican a la cavidad nasal con la faringe. <sup>(Bernal, 2002).</sup>

La faringe es un órgano músculo membranoso común a las vías digestivas y respiratorias, está situada ventral a la base del cráneo, caudal a las cavidades nasal y oral, y rostral al vestíbulo esofágico y laringe. En la cavidad faríngea se abren siete orificios, dos de ellos comunican con la cavidad nasal a través de las coanas, otros dos comunican a la faringe con el oído medio a través de los tubos auditivos, otro comunica a la cavidad oral a través del istmo de las fauces y, por último uno que se comunica con la entrada del esófago y otro con la laringe. <sup>(Krahmer, 1979)</sup>

Además se divide en tres regiones: nasofaringe, orofaringe y laringofaringe. **La nasofaringe** es parte del conducto respiratorio que se extiende desde las coanas hasta el orificio intrafaringeo. Su piso está formado por el paladar blando y en sus partes laterales se encuentran los orificios de los tubos auditivos. En el cerdo, al

## *Introducción*

comienzo del paladar blando existen dos placas conocidas como tonsilas del paladar blando. **La orofaringe** es la parte de la vía digestiva que se extiende desde la cavidad oral mediante el istmo de las fauces, situado a nivel del arco palatogloso, y caudalmente se continúa con la laringofaringe. **La laringofaringe** es el espacio localizado caudal al borde libre del paladar blando y rostral a la entrada de la laringe y al vestíbulo esofágico. En la parte dorsal del vestíbulo esofágico de los porcinos se localiza el divertículo faringeo que es una evaginación saculiforme e impar que se prolonga 3 a 4 cm sobre la parte inicial del esófago y termina en saco ciego. (Shively, 2000, Dyce, 1996, Bernal, 2002)

La laringe es un tubo musculocartilaginoso que comunica a la faringe con la tráquea. Se sitúa debajo de la faringe y detrás de la boca, suspendida de la base del cráneo mediante el aparato hiodeo. (Dyce, 1996, Climent, 2005) Está constituido por varios cartílagos móviles (tiroides, cricoides, aritenoides y epiglotis) unidos entre sí por ligamentos. La epiglotis es móvil y elástica, está situada en la parte craneal de la laringe, caudal a la raíz de la lengua, dorsal al basihioides y craneal a los cartílagos tiroideo y aritenideo. Su forma es redondeada con sus bordes girados hacia arriba en el cerdo (Krahmer, 1979, Getty 1982)

La tráquea es un órgano tubular musculocartilaginoso que inicia en la laringe y termina en la bifurcación traqueal, está formada por una porción cervical y una torácica, consta de 32 a 46 anillos cartilagosos los cuales son de forma circular, incompletos en su parte dorsal y conectados unos con otros mediante ligamentos anulares fusionados con el pericondrio. La mayor o menor apertura de los cartílagos se regula por la contracción de los músculos traqueales, músculos lisos, insertos en la cara interna de los cartílagos. En el cerdo, el extremo derecho del cartílago traqueal cubre un poco dorsalmente al extremo izquierdo. (Clement, 2005, Getty, 1982). La bifurcación traqueal está situada sobre la base del corazón a la altura de la costilla V.

## *Introducción*

Los bronquios son órganos tubulares musculocartilagosos que resultan de la bifurcación traqueal y dan origen al árbol bronquial de cada uno de los pulmones, por lo que se les denomina bronquios principales. En los porcinos existe un bronquio que no nace del bronquio principal sino que se origina directamente de la tráquea y ventila al lóbulo craneal del pulmón derecho. Por su origen se denomina bronquio traqueal y está situado a nivel de la costilla III (Dyce, 1996, Getty, 1982). El bronquio principal derecho se divide en tres ramas que dan origen al bronquio lobular medio, lobular caudal y lobular accesorio. El bronquio principal izquierdo se divide en dos ramas que dan origen al bronquio lobular craneal y al bronquio lobular caudal. Los bronquios lobulares se dividen en numerosos bronquios segmentales, destinados a ventilar un área específica del lóbulo pulmonar. Cada una de estas áreas se denomina segmento broncopulmonar y están separadas unas de otras por los tabiques intersegmentales. De los bronquios segmentales derivan los bronquiolos, carentes de cartilago y de glándulas, que dan lugar a los bronquiolos respiratorios de los que a su vez derivan los conductos alveolares que terminan en sacos alveolares formados por los alvéolos pulmonares (sitio donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso). (Climent, 2005, Bernal, 2002).

Los pulmones derecho e izquierdo, ocupan la mayor parte de la cavidad torácica (Sisson, 1982). Cada pulmón tiene una forma piramidal y presenta para su descripción un ápice localizado en el extremo craneal y una base ubicada hacia la parte caudal. Además, presenta una superficie costal que es la cara del pulmón en contacto con las costillas; una superficie medial, relacionada con el mediastino, en ella se observan a las impresiones cardíaca, aórtica y esofágica; una superficie diafragmática que está en contacto con el músculo de dicho nombre y las superficies interlobulares que son las áreas de contacto entre los lóbulos de cada pulmón. Al unirse las superficies forman el borde dorsal ubicado hacia el techo de la cavidad (es romo) y el borde agudo, denominado así por su apariencia afilada, el

## *Introducción*

cual se divide en dos partes, ventral y basal. El borde ventral se relaciona con el piso de la cavidad y presenta una incisura cardiaca en la parte en donde el pulmón contacta con el pericardio. El borde basal está localizado alrededor de la superficie diafragmática. <sup>(Bernal, 2002)</sup>

En la superficie medial del pulmón está el hilio, sitio por donde entran y salen los bronquios, arterias y venas pulmonares, arterias y venas bronquiales, vasos linfáticos y plexos nerviosos pulmonares. <sup>(Bernal, 2002)</sup>

La pleura es una membrana serosa delgada que reviste las paredes de la cavidad torácica, formando dos sacos, cada saco pleural se divide en una parte parietal y una pulmonar. La pleura parietal está en contacto directo con las paredes de la cavidad torácica, de acuerdo a su localización se divide en costal, diafragmática y mediastínica. La cavidad pleural es el espacio entre las pleuras parietal y pulmonar. La Pleura pulmonar está en contacto directo con los pulmones. <sup>(Climent, 2005, Bernal, 2002)</sup>

## **2. OBJETIVOS.**

### **Objetivo General:**

Cuantificar la cantidad de células plasmáticas en tonsila, epiglotis, tráquea y pulmón de cerdos clínicamente sanos de 100 kg mediante la tinción Verde Metil Pironina.

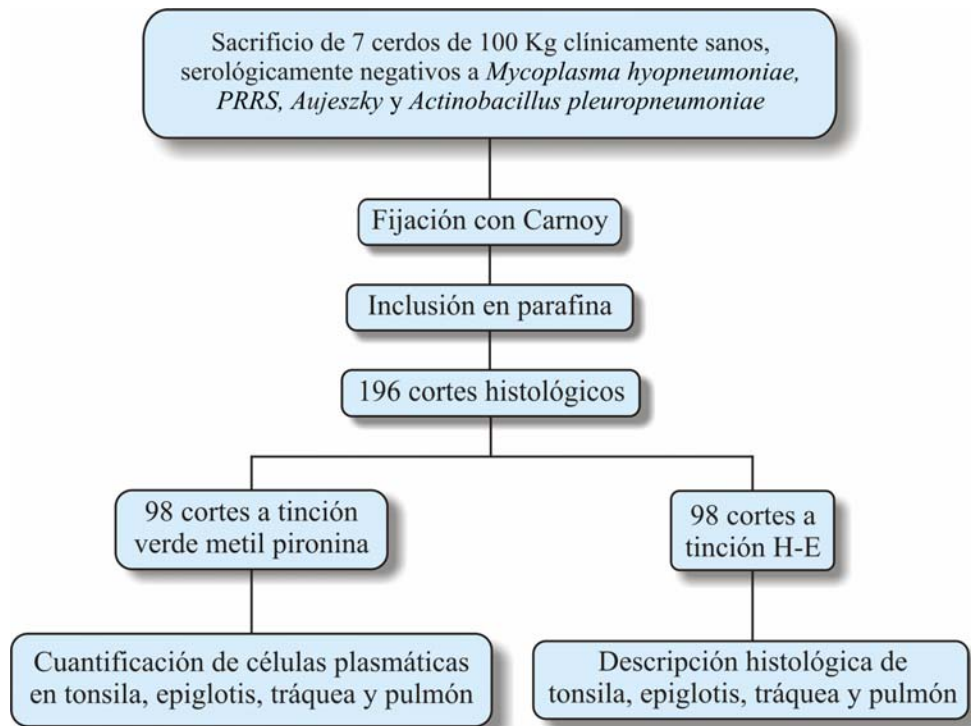
### **Objetivos Específicos:**

- Observar la histología normal de tonsila, epiglotis, tráquea y pulmón mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina.
- Establecer la distribución y cuantificación normal de las células plasmáticas en tonsila, epiglotis, tráquea y pulmón de cerdos clínicamente sanos.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Diseño experimental

**Figura 1**



### 3.2. Material Biológico

Se utilizaron siete cerdos de 100 Kg provenientes del Centro de Enseñanza e Investigación Experimental Porcícola, Jilotepec (CEIEPE), FMVZ, UNAM serológicamente libres de *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRS, Aujeszky y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

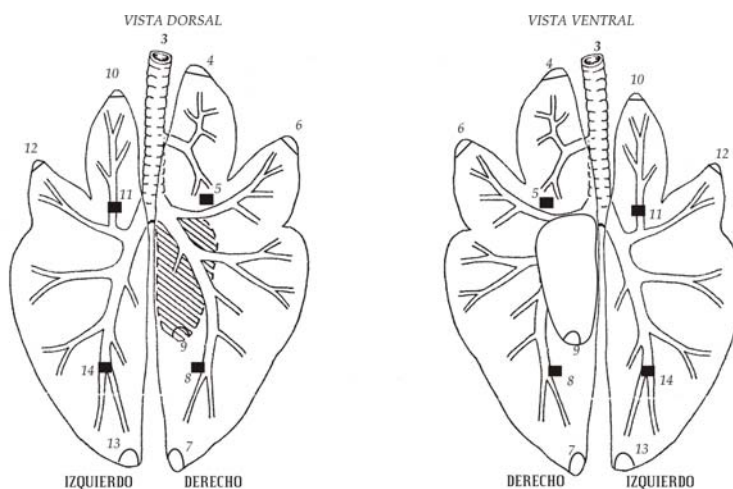
### 3.3. Obtención de Muestras

- Los cerdos de 100 Kg se tranquilizaron con Azaperona (Sural) a una dosis de 2 mg/Kg, posteriormente se sacrificaron con el método manual utilizando una pistola de émbolo cautivo. <sup>(Moreno, 1996)</sup>
- Se retiraron los pulmones inmediatamente después de que el cerdo se desangró vía vena yugular.
- Mediante un mapa plantigráfico se tomaron muestras de aproximadamente 0.5 mm desde la tonsila hasta el pulmón.



**Figura 2**

**Plantigrafía de los Cortes Histológicos**



Nota: el paladar blando y la epiglotis no aparecen en la plantigrafía

**Cuadro 1**

**Sitios de toma de muestra**

1.	Paladar blando (Tonsila)
2.	Epiglotis
3.	Tráquea
4.	Pulmón Derecho – lóbulo craneal (Ápice)
5.	Pulmón Derecho – lóbulo medio (borde dorsal)
6.	Pulmón Derecho – lóbulo medio (borde agudo)
7.	Pulmón Derecho – lóbulo caudal (extremo caudal del borde dorsal)
8.	Pulmón Derecho – lóbulo caudal (parte central)
9.	Pulmón Derecho – lóbulo accesorio (borde agudo parte media)
10.	Pulmón izquierdo – lóbulo craneal (Ápice)
11.	Pulmón izquierdo – lóbulo craneal (porción caudal borde dorsal)
12.	Pulmón izquierdo – lóbulo craneal (porción caudal borde agudo)
13.	Pulmón izquierdo – lóbulo caudal (extremo caudal del borde dorsal)
14.	Pulmón izquierdo – lóbulo caudal (parte central)

- › Los tejidos se fijaron en Carnoy. (Alcohol absoluto 60 ml, Cloroformo 30 ml, Ácido acético 10ml).
- › Una vez fijados fueron incluidos en parafina histológica en el Laboratorio de Histología L-711 de la FES-Cuautitlán. Se realizaron las siguientes modificaciones en la técnica de inclusión:
  - Se eliminó el excedente de fijador colocando cada muestra en un cassette para inclusión con su respectiva identificación.
  - Deshidratación en alcohol etílico 70 % I 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 70 % II 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 82 % 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 86 % 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 92 % I 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 92 % II 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 98 % I 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 98 % II 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 100 % I 15 min.
  - Deshidratación en alcohol etílico 100 % II 15 min.
  - Aclaración en Xileno I 30 min.
  - Aclaración en Xileno II 40 min.

En cada cambio las muestras fueron sometidas a calentamiento en horno de microondas a temperatura media alta de aproximadamente 55-60°C por 2 minutos.

- › Las muestras se infiltraron en parafina a 60°C en dos cambios de una hora cada uno.
- › Inclusión en parafina.
- › Se realizaron cortes en el microtomo (Leica RM 820) a un grosor de 5µ.
- › Se montaron los cortes en portaobjetos.

### **3.4. Tinción Hematoxilina-Eosina**

- › Se desparafinaron las muestras en Xileno por 5 min. en 2 pasos.
- › Rehidratación de la muestra:
  - Alcohol etílico 100% I 5 min.
  - Alcohol etílico 100% II 5 min.
  - Alcohol etílico 96% I 5 min.
  - Alcohol etílico 96% II 5 min.
  - Alcohol etílico 80% 5 min.
  - Alcohol etílico 70% 5 min.
- › Lavado en agua destilada durante 5 min.
- › Teñido con Hematoxilina de Harris durante 8 min.
- › Lavado con agua corriente.
- › Decolorado en alcohol ácido.
- › Lavado con agua corriente.
- › Estabilización en carbonato de litio.
- › Lavado con agua corriente.
- › Lavado con agua destilada durante 5 minutos.
- › Teñido con Eosina Carnegy durante 3 minutos.
- › Lavado con agua corriente para quitar el excedente de colorante.
- › Deshidratación en alcohol etílico al 96% I.
- › Deshidratación en alcohol etílico al 96% II.
- › Deshidratación en alcohol etílico al 100% I.
- › Deshidratación en alcohol etílico al 100% II.
- › Aclarado en Xileno en dos pasos.
- › Montado con resina sintética.

### **3.4.1. Observación y Toma de Imagen**

Las preparaciones histológicas teñidas con H-E fueron observadas para su estudio morfológico en un microscopio óptico modelo Spencer de American Optical a 10 y 40X en el Laboratorio de Histología L-711. De cada laminilla fueron seleccionados campos microscópicos representativos.

La imagen de cada campo microscópico elegido fue capturada digitalmente y procesada electrónicamente mediante el programa Imagen-Pro Plus™.

Cada imagen fue descrita en cuanto a sus detalles histológicos por lo que aportamos una colección de 22 fotografías.

### **3.5. Tinción Verde Metil Pironina**

La tinción verde metil pironina es un excelente colorante para teñir a la cromatina, utilizado con frecuencia para estudios cuantitativos <sup>(Martoja, 1970)</sup>. Tanto el verde de metilo (un trifenilmetilmetano) como la pironina (un xanteno) son colorantes básicos, cuyas afinidades varían según el tejido y el pH. El verde de metilo se fija selectiva y estequiométricamente sobre el DNA polimerizado de doble cadena; en cambio, la pironina tiñe el RNA (rojo rosado). Siendo colorantes básicos, la pironina y el verde de metilo probablemente deben su selectividad por los ácidos nucleicos RNA y DNA, respectivamente. Para otros autores, la tinción selectiva de los núcleos con verde de metilo se debe al bloqueo por proteínas de residuos del RNA ávidos de verde de metilo; el grado de tinción de DNA por este colorante sería una función directa de su combinación con proteínas. Sin embargo para fines prácticos se acepta que en condiciones bien estandarizadas el verde de metilo es un colorante selectivo del DNA polimerizado.

La tinción con verde metilo y pironina es muy útil para el estudio histológico de trastornos inmunológicos, en este caso se utiliza para establecer la presencia o ausencia de células plasmáticas. Sin embargo, la pironinofilia del citoplasma no permite afirmar que se está en presencia o ausencia de una célula plasmática. Hottendorf y col. (1966) han demostrado que los gránulos de células cebadas del perro, tanto normales como neoplásicas, tienen afinidad por la pironina. Observaron que: 1) esta pironinofilia corresponde a los gránulos metacromáticos, 2) es sensible a la RNAasa (no siempre en forma completa, pues parte de la pironinofilia residual podría deberse al polianión fuerte de heparina, que puede fijar el colorante básico de pironina); 3) los gránulos que presentan tinción ortocromática con azul de toluidina se vuelven metacromáticos después de hidrólisis por RNAasa (la digestión del RNA ortocromático deja al descubierto heparina metacromática). Con estos hechos, Hottendorf y col. (1966) concluyeron que los gránulos de células cebadas contenían RNA, y propusieron luego una relación entre células cebadas y células plasmáticas, en cuanto al desarrollo y función, mencionando que investigadores previos habían postulado que tanto los plasmocitos como las células cebadas podrían provenir de los linfocitos.<sup>(Lynch, 1985)</sup>

### 3.5.1. Procedimiento

Preparación de Verde Metil Pironina:

<b>Verde de metilo</b>	<b>0.15 g</b>
<b>Pironina B</b>	<b>0.25 g</b>
<b>ROH 96</b>	<b>2.5 ml</b>
<b>Fenol</b>	<b>0.5 g</b>
<b>Glicerina</b>	<b>20 ml</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>c.b.p 100 ml</b>

- a) Desparafinado e hidratado de acuerdo a la técnica ya mencionada.
- b) Teñido con verde metil pironina durante 5 min.
- c) Lavado con agua corriente.
- d) Decolorado con acetona.
- e) Deshidratación en alcohol absoluto en dos pasos.
- f) Aclarado en Xileno en dos pasos.
- g) Montado con resina sintética.

Para determinar la presencia de células plasmáticas se realizó un conteo triple ciego en un microscopio óptico modelo Spencer de American Optical. Se seleccionaron 10 campos (objetivo 40 x) por laminilla aleatoriamente cuantificando la reacción a la pironina.

Posteriormente con los resultados obtenidos se obtuvo un promedio para crear una base de datos.

Los promedios obtenidos de los 6 cerdos fueron analizados mediante el programa estadístico Graph pad Prisma® por la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Descripción Histológica**

**PALADAR BLANDO (tonsila).** Está formado por un pliegue de las membranas mucosas de las cavidades nasal y oral, con una parte central de fibras musculares estriadas.

Túnica mucosa:

- Mucosa oral recubierta por un epitelio estratificado escamoso no cornificado.
- Mucosa nasal está cubierta por un epitelio pseudoestratificado columnar ciliado.

El epitelio está infiltrado por linfocitos, neutrófilos y macrófagos.

Túnica submucosa: tejido linfático difuso con células plasmáticas rodeando a los nódulos linfáticos, los cuales poseen con frecuencia centros germinativos y una corona de pequeños linfocitos adyacentes al epitelio.

La tonsila tiene profundas invaginaciones llamadas criptas tonsilares las cuales están constituidas por epitelio estratificado escamoso no cornificado.<sup>(Dellman, 1999)</sup>  
(Fig. 4 y 4.1).

### **EPIGLOTIS.**

Túnica mucosa:

- Epitelio estratificado escamoso, en los porcinos se observan botones o yemas gustativas.
- Lámina propia - tela submucosa de tejido conectivo colágeno laxo con fibras elásticas.

Tela submucosa:

- Glándulas túbulo alveolares ramificadas, en su mayoría mucoides.
- Tejido linfático nodular y difuso.

Túnica muscular: no se forma de manera exclusiva de fibras musculares estriadas, sino que el cartílago elástico reemplaza parte de la masa muscular. Esto explica la mayor distribución de cartílago laríngeo y músculo.

Túnica adventicia: tejido conectivo colágeno laxo <sup>(Appendini, 2000)</sup> (Fig. 5).

### **TRÁQUEA.**

Túnica mucosa:

- Epitelio pseudoestratificado columnar ciliado con exocrinocitos caliciformes intercalados.
- Lámina propia de tejido conectivo colágeno laxo con prominentes fibras elásticas que se cree reemplazan a la lámina muscular de la mucosa.

Tela submucosa:

- Glándulas traqueales serosas o mucosas.
- Nódulos linfoides traqueales.

Túnica fibromusculocartilaginosa:

- Ligamento anular de tejido conectivo colágeno compacto regular con fibras elásticas.
- Cartílago traqueal hialino en forma de anillo incompleto
- Músculo transverso traqueal: Músculo liso con orientación transversa, une los extremos de los anillos cartilagosos. El músculo puede estar interrumpido por glándulas mucosas.

Túnica adventicia: Tejido conectivo colágeno laxo <sup>(Dellman, 1999, Appendini, 2000)</sup> (Fig. 6).



## **PULMÓN.**

**Pleura Visceral.** Es la capa serosa que recubre a los pulmones, está constituida por mesotelio escamoso a cuboide simple y tejido conectivo colágeno laxo.

**Bronquios.** (Fig. 7) son estructuralmente similares a la tráquea.

Túnica mucosa:

- Epitelio pseudoestratificado columnar ciliado con exocinocitos caliciformes.
- Lámina propia de tejido conectivo colágeno laxo y fibras elásticas.
- Muscular de la mucosa de tejido muscular no estriado.

Túnica musculocartilaginosa:

- Músculo espiral de tejido muscular no estriado que aparentemente se fusiona con la muscular de la mucosa.
- Cartílagos bronquiales: son de cartílago hialino en forma de placas incompletas
- Glándulas bronquiales seromucosas o mucosas, tubuloalveolares ramificadas. Los anillos cartilagosos desaparecen y son sustituidos por placas de cartílago que se reducen de tamaño en las porciones distales.

Túnica adventicia de tejido colágeno laxo. (Appendini, 2000, Fernández, 2003, Banks, 1998)

**Bronquiolos:** Se derivan directamente del árbol bronquial. (Fig. 8 y 9) Tienen un epitelio pseudoestratificado columnar ciliado carentes de cartílago. Conforme se va estrechando su lumen, su epitelio se va transformando en simple columnar o simple cuboide con o sin cilios. Carecen de células caliciformes. (Fig. 8).

Túnica mucosa:

- Epitelio pseudoestratificado columnar ciliado.
- Lámina propia con fibras elásticas longitudinales y colágenas finas.
- Muscular de la mucosa de tejido muscular no estriado.

Túnica muscular: tejido muscular no estriado que posiblemente se fusiona con la muscular de la mucosa.

Túnica adventicia de tejido conectivo colágeno laxo.

Los bronquiolos pueden presentar su lumen en forma de estrella, o bien, ondulado, que se va tornando redondeado conforme disminuye el diámetro de dicho lumen. Los bronquiolos más pequeños con esta característica, bronquiolos terminales, presentan una abertura que desemboca hacia un espacio formado por células cuboides y escamosas llamados bronquiolos respiratorios, éstos se encuentran con poca frecuencia en porcinos. (Appendini, 2000, Dellman, 1999, Banks, 1998)

#### **Bronquiolos terminales:**

Túnica mucosa:

- Epitelio simple cuboide con o sin cilios.

Túnica adventicia muy delgada de tejido conectivo colágeno laxo (Appendini, 2000)

#### **Bronquiolos respiratorios:**

Túnica mucosa:

- Epitelio simple cuboide con células escamosas intercaladas.

Túnica Adventicia muy delgada, posee fibras elásticas longitudinales. (Appendini, 2000)

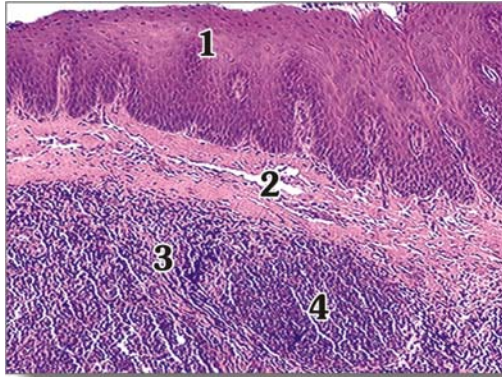
#### **Estructuras alveolares:**

Los conductos alveolares continúan a los bronquiolos respiratorios. Los cuales desembocan en una abertura denominada atrio alveolar que a su vez comunica con un saco alveolar, cavidad subdividida en los alvéolos pulmonares. Los alvéolos (Fig. 9) son estructuras semiesféricas de paredes delgadas y tapizadas por epitelio, están separados por el tabique ínter alveolar (Appendini, 2000, Dellman, 1999)

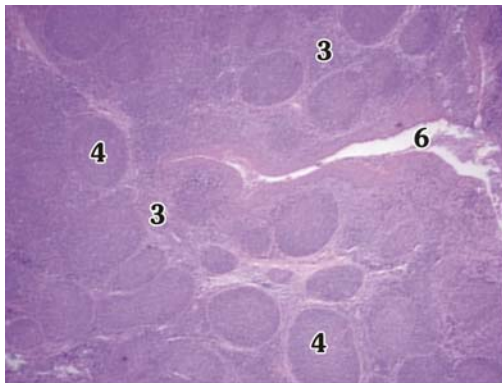
Los conductos, atrios y alvéolos están formados por un epitelio simple escamoso formado por epitelocitos respiratorios (Neumocitos tipo I) que se especializan en el intercambio gaseoso y epitelocitos granulares (Neumocitos tipo II) que se

encargan de producir la sustancia surfactante. También están presentes los macrófagos alveolares que fagocitan partículas de polvo y otros materiales extraños<sup>(Dellman, 1999)</sup>.

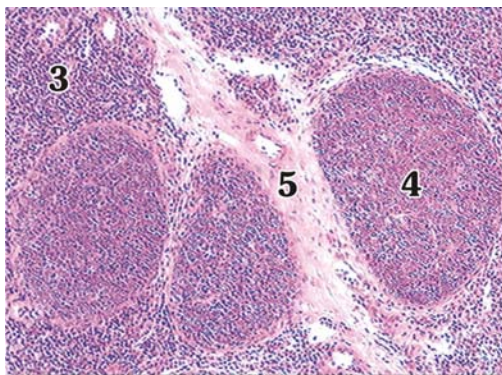
El parénquima pulmonar está irrigado por vasos sanguíneos de diverso calibre, derivados de la arteria y vena pulmonares, que constituyen la circulación funcional del órgano, así como de la arteria y vena bronquial que brindan la circulación nutricia del pulmón.<sup>(Appendini, 2000)</sup>.



H-E 40x

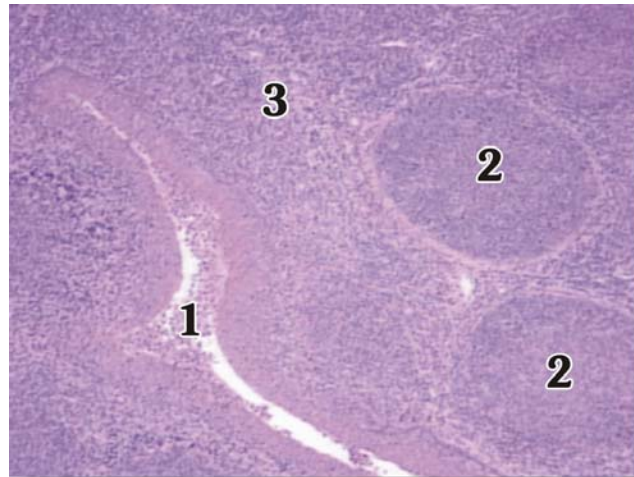


H-E 4x

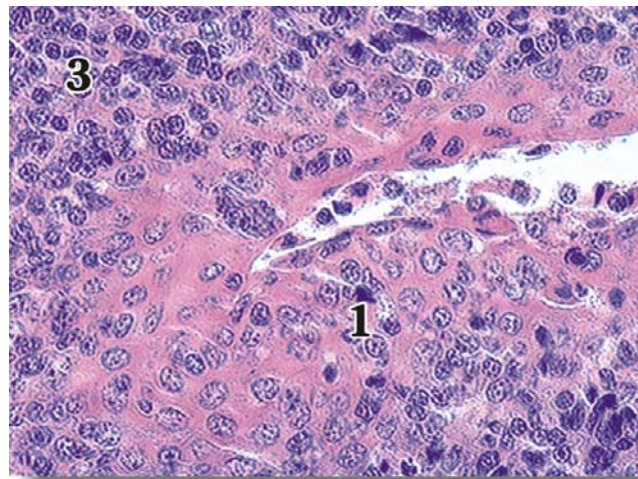


H-E 40x

**Figura 3.** Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Tonsila. Mucosa oral formada por epitelio estratificado escamoso no cornificado (1), lámina propia (2), tejido linfoide difuso (3), nódulos linfoides (4), trabéculas (5), cripta tonsilar (6).

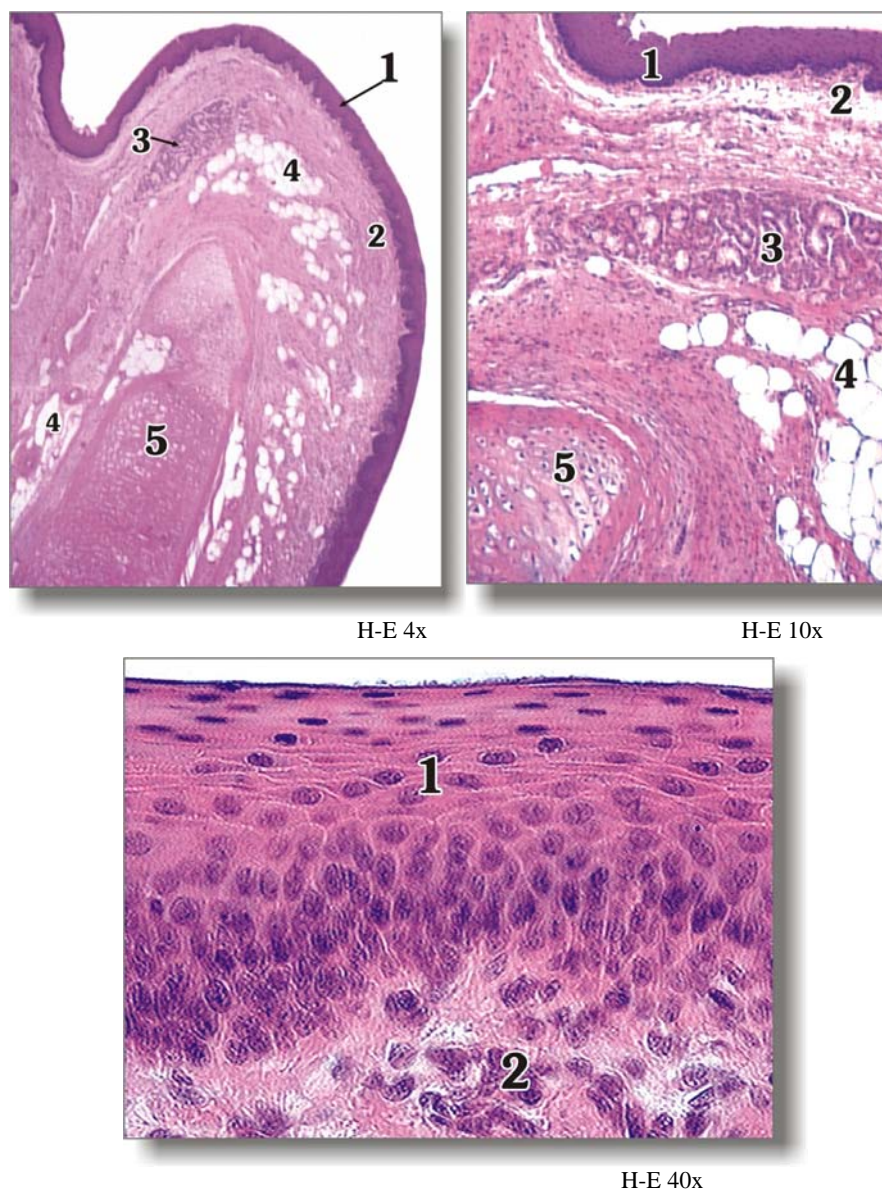


H-E 10x



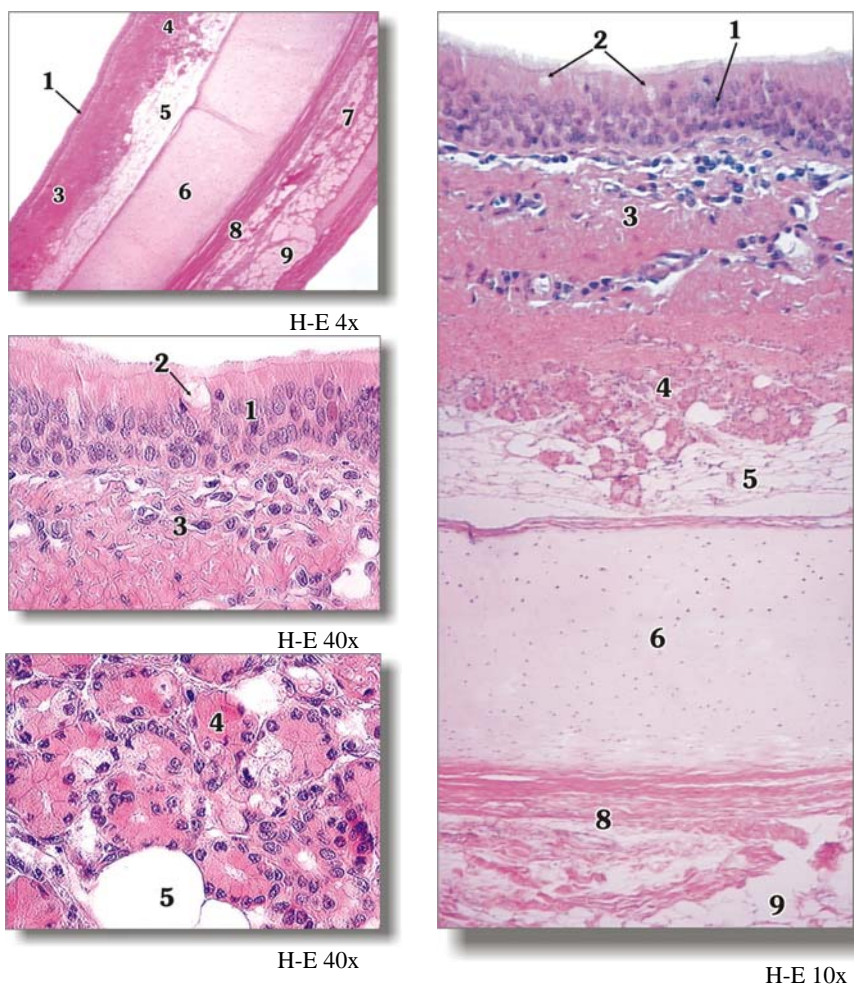
H-E 40x

**Figura 3.1.** Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Tonsila. Cripta formada por epitelio estratificado escamoso no cornificado (1), nódulo linfático (2) tejido linfoide difuso (3).

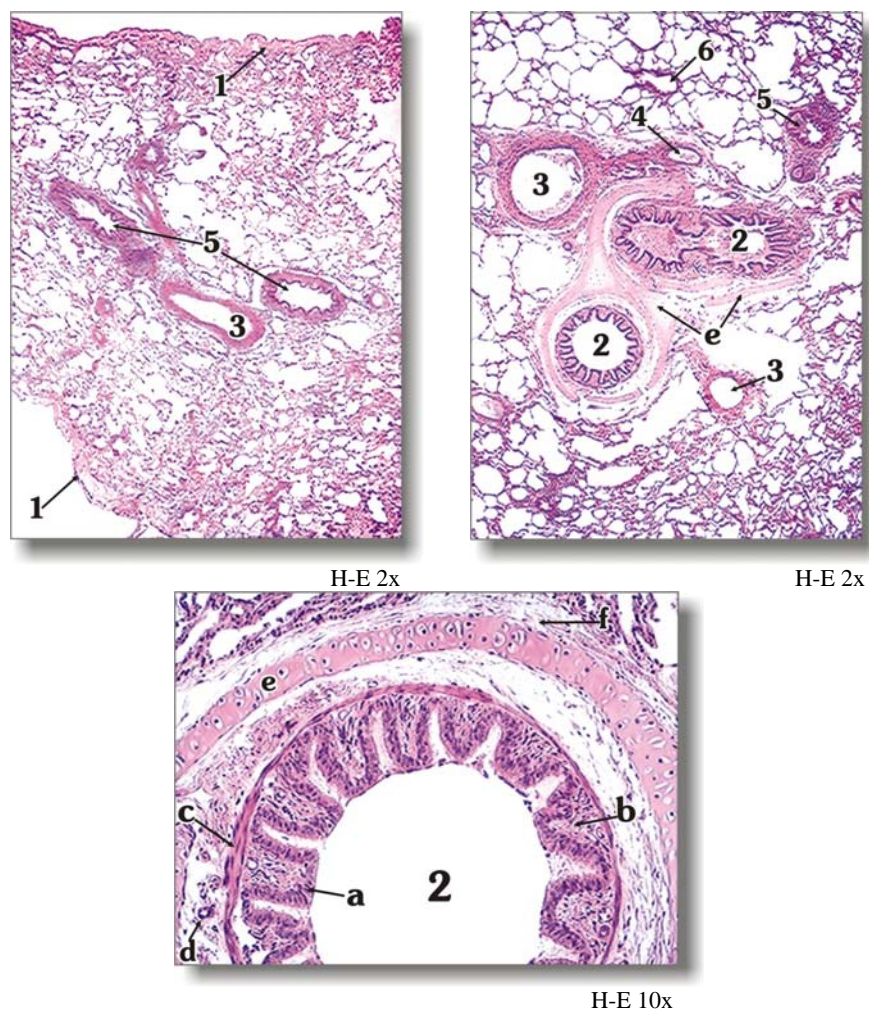


**Figura 4.** Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Epiglotis. Mucosa formada por epitelio estratificado escamoso no cornificado (1), lámina propia – tela submucosa formada por tejido conectivo denso irregular (2), glándulas mixtas (3) y tejido adiposo (4), cartílago elástico que reemplaza parte de la masa muscular (5).



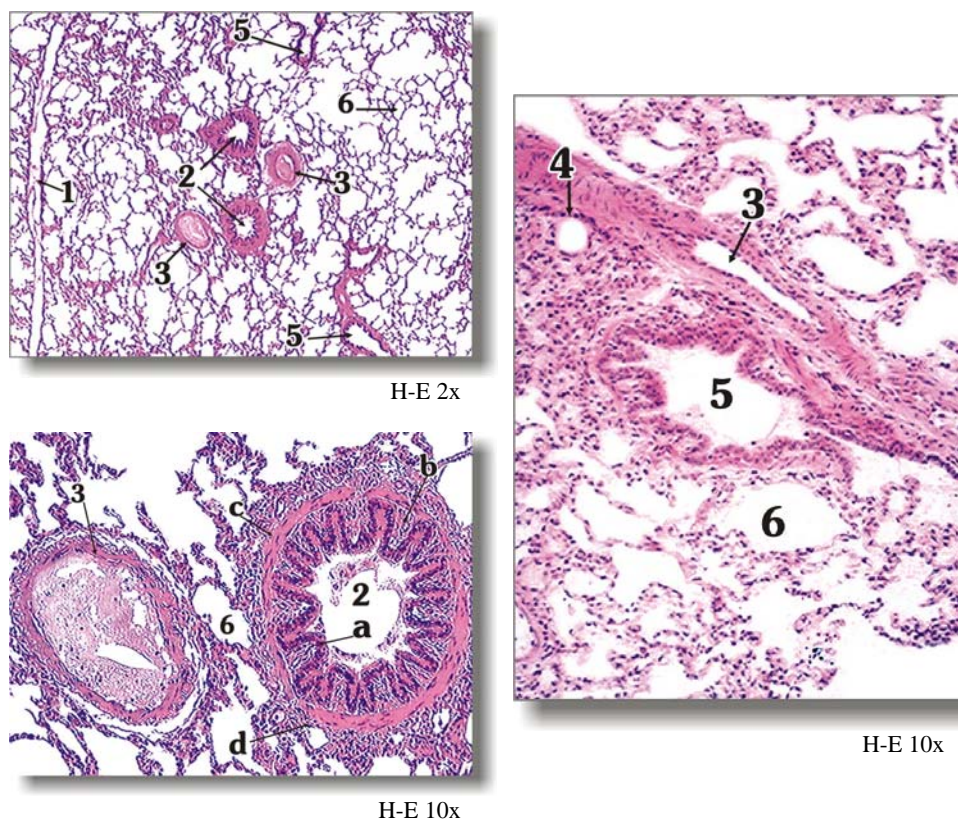


**Figura 5.** Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Tráquea. Mucosa formada por Epitelio pseudoestratificado columnar ciliado (1) con exocricocito caliciforme (2) y su lámina propia de tejido conectivo colágeno laxo con fibras elásticas (3), Tela submucosa formada por tejido conectivo colágeno laxo, glándulas serosas o mucosas (4) y tejido adiposo (5), túnica fibromusculocartilaginosa formada por anillos cartilagosos incompletos (6) en el caso del cerdo que se conectan con tejido conectivo (7), Túnica adventicia formada por tejido conectivo colágeno laxo (8) y tejido adiposo (9).

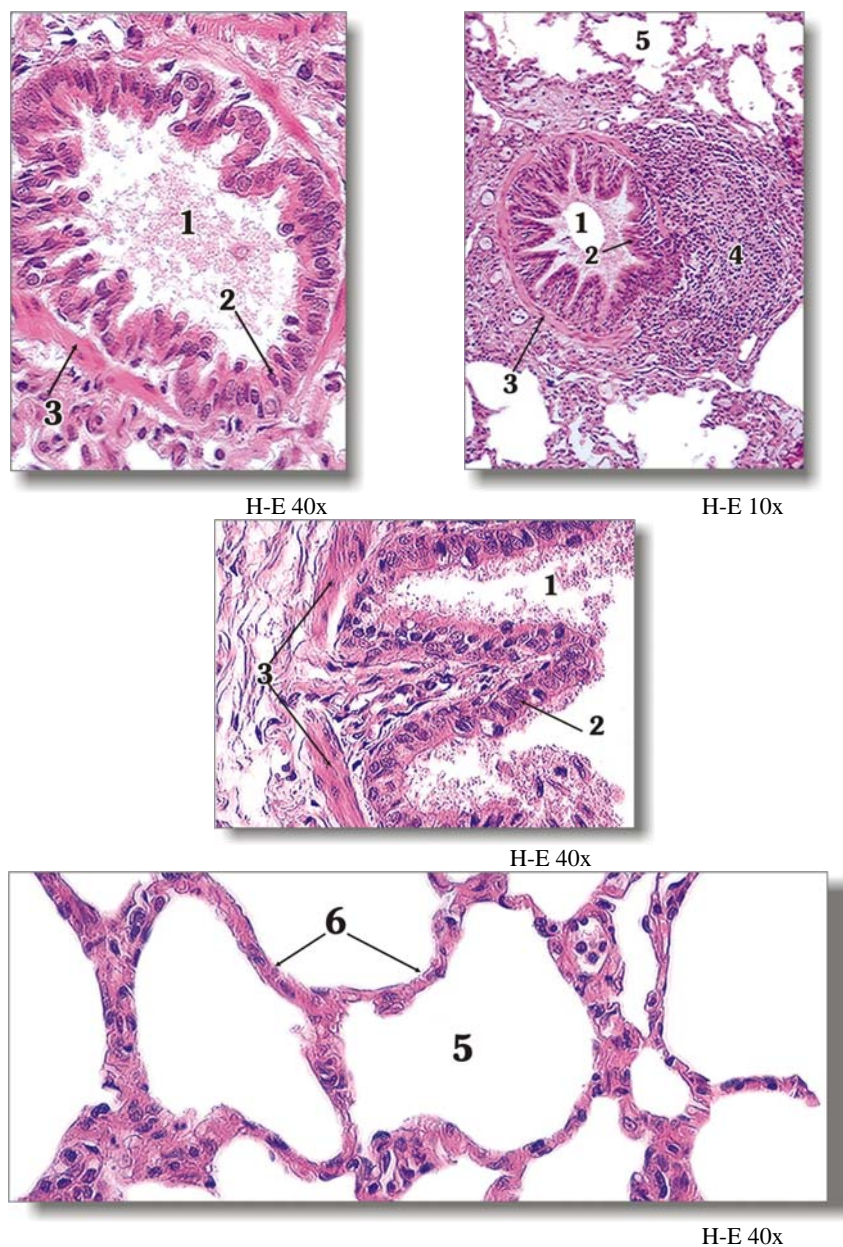


**Figura 6.** Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Pulmón. Pleura visceral (1), Bronquio (2) formado por túnica mucosa la cual está constituida por: **a)** un epitelio pseudoestratificado columnar ciliado con exocrinocitos caliciformes intercalados, **b)** lamina propia de tejido conectivo colágeno laxo y fibras elásticas, **c)** Túnica musculocartilaginosa formada por músculo espiral que aparentemente se fusiona con la muscular de la mucosa (músculo liso), **d)** Vénula bronquial. **e)** placas irregulares de cartílago hialino. **f)** Túnica adventicia constituida por tejido conectivo colágeno laxo. Arteria (3). Vena (4). Bronquiolo (5). Bronquiolo terminal (6).





**Figura 7.** Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Pulmón. Tabique interalveolar (1), Bronquiolo (2), formado por túnica mucosa la cual está constituida por: a) un epitelio pseudoestratificado columnar ciliado, b) lamina propia constituida por fibras elásticas, c) muscular de la mucosa (músculo liso), túnica adventicia constituida por d) tejido conectivo colágeno laxo. Arteria (3). Vena (4). Bronquiolo terminal (5). Alvéolo (6).



**Figura 8.** Corte histológico de cerdo adulto clínicamente sano. Pulmón. Bronquiolo (1). Epitelio pseudoestratificado columnar (2), músculo liso (3). Tejido Linfoide Asociado a Bronquio (BALT) (4). Alvéolo (5), Epitelio simple escamoso (6).

#### **4.2. Distribución de Células Plasmáticas**

La tinción de verde metil pironina permitió distinguir a los linfocitos B activados en los órganos estudiados, estos linfocitos fueron identificados principalmente porque su RNA activo se tiñó de color rojo brillante, tomando en consideración la morfología de la célula plasmática, debido a que otras estructuras y células son capaces de reaccionar a la pironina. Los linfocitos mostraron las mismas características en todos los órganos. Por su parte el verde tiñó DNA inespecífico.

De los siete cerdos considerados el cerdo W presentó histológicamente proceso neumónico y BALT por lo que fue excluido del análisis estadístico

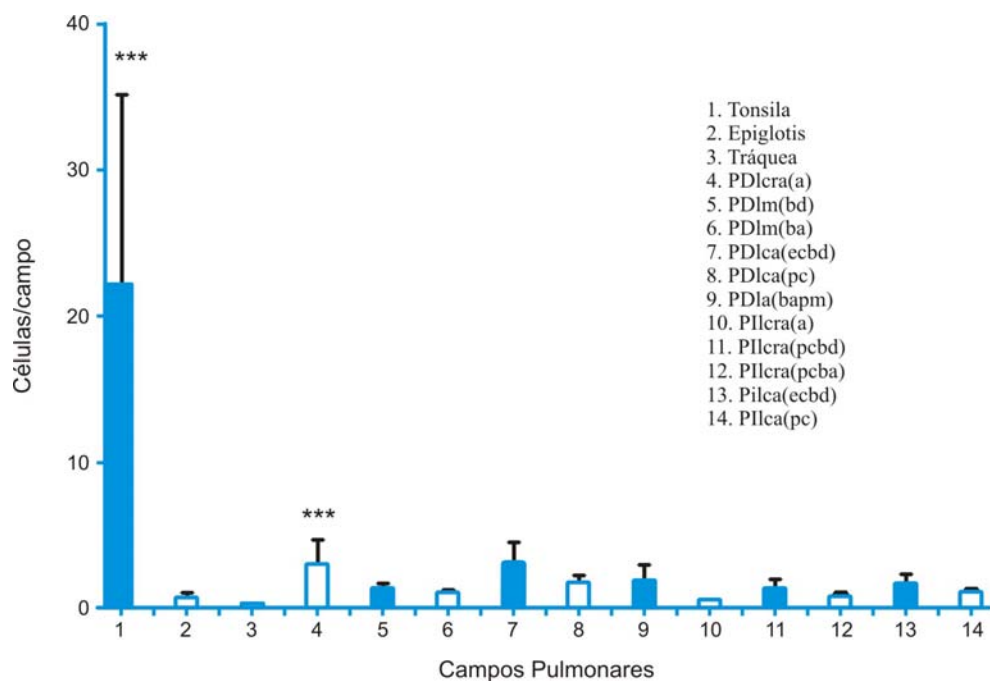
Cuadro 2

## Promedios de Células Plasmáticas en Tonsila, Epiglotis, Tráquea y Pulmón

CERDO	T	U	V	X	Y	Z	Promedio
Tonsila	10.33	3.57	12.7	18.93	1.2	86.13	22.14±31.99*
Epiglotis	0.5	0.27	0.57	0.43	2.57	0.03	0.73±0.92
Tráquea	0.13	0.2	0.23	0.03	0.7	0.43	0.29±0.24
PDlcra(a)	1.03	1.27	0.63	11.7	1.57	1.73	2.99±4.29*
PDlm(bd)	1.07	2.67	0.43	1.9	1.07	1.4	1.42±0.78
PDlm(ba)	1.67	1.13	0.7	1.43	1.27	0.67	1.14±0.40
PDlca(ecbd)	2.23	0.97	0.6	9.8	2.47	3.13	3.20±3.37
PDlca(pc)	1.6	1.3	0.97	4.07	1.83	0.93	1.78±1.17
PDla(bapm)	0.83	7.25	0.17	0.53	1.63	0.2	1.77±2.74
PIlcra(a)	0.23	0.87	0.43	0.6	1.03	0.2	0.56±0.34
PIlcra(pcbd)	4.63	0.63	0.6	0.53	1.13	0.83	1.39±1.60
PIlcra(pcba)	1.27	0.47	0.1	0.35	1.7	1.23	0.85±0.63
PIlca(ecbd)	2.03	0.5	4.5	0.77	2.3	0.2	1.72±1.60
PIlca(pc)	0.2	0.67	1.87	1.67	1.1	1.27	1.13±0.62

PDlcra(a)	Pulmón Derecho – lóbulo craneal (Ápice)
PDlm(bd)	Pulmón Derecho – lóbulo medio (borde dorsal)
PDlm(ba)	Pulmón Derecho – lóbulo medio (borde agudo)
PDlca(ecbd)	Pulmón Derecho – lóbulo caudal (extremo caudal del borde dorsal)
PDlca(pc)	Pulmón Derecho – lóbulo caudal (parte central)
PDla(bapm)	Pulmón Derecho – lóbulo accesorio (borde agudo parte media)
PIlcra(a)	Pulmón izquierdo – lóbulo craneal (Ápice)
PIlcra(pcbd)	Pulmón izquierdo – lóbulo craneal (porción caudal borde dorsal)
PIlcra(pcba)	Pulmón izquierdo – lóbulo craneal (porción caudal borde agudo)
PIlca(ecbd)	Pulmón izquierdo – lóbulo caudal (extremo caudal del borde dorsal)
PIlca(pc)	Pulmón izquierdo – lóbulo caudal (parte central)

**Figura 9. Distribución de Células Plasmáticas en tonsila, epiglotis, tráquea y pulmón.**



\*\*\*Diferencia estadística significativa

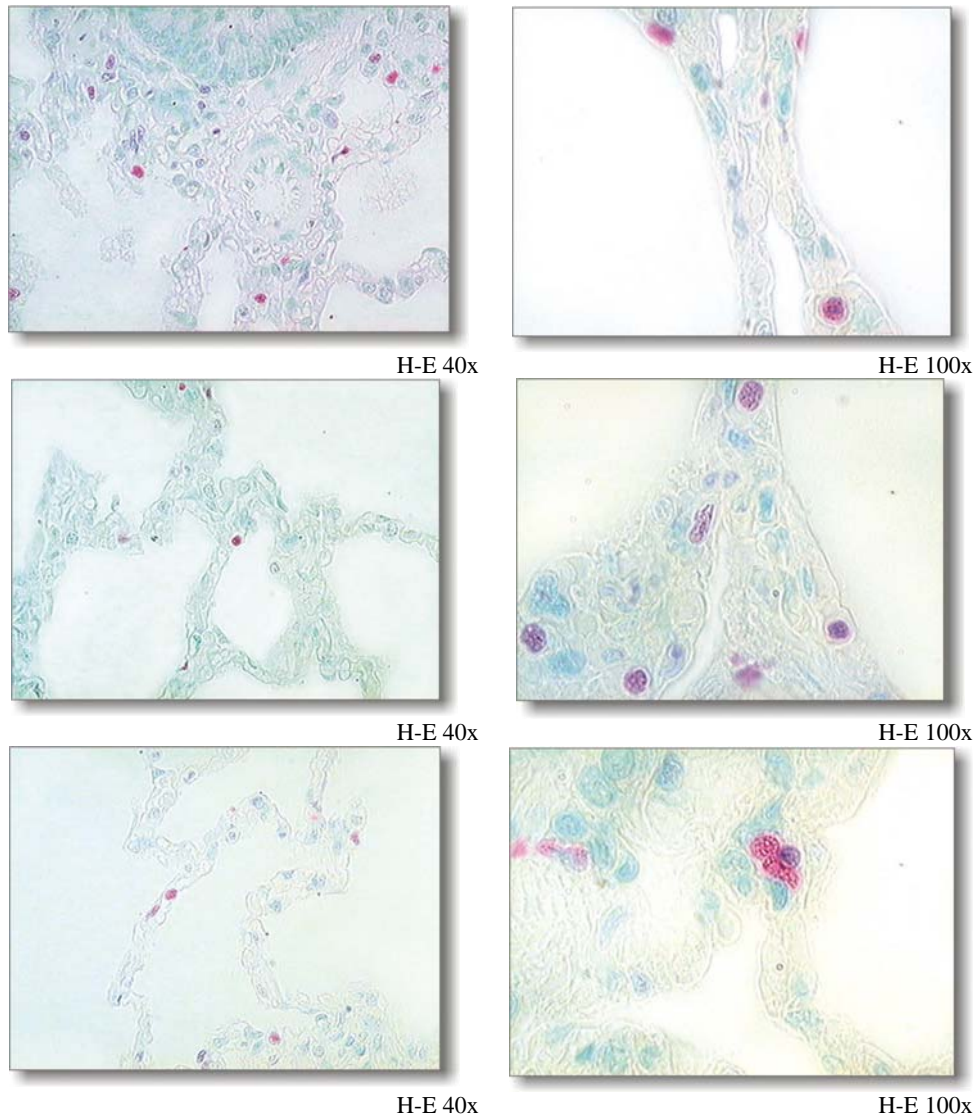
Los Promedios de Células Plasmáticas en los Tejidos Estudiados se presentan en el Cuadro 2. En tonsila y PDIcra(a), se cuantificaron más células plasmáticas ( $22.14 \pm 31.99$ ) con diferencia estadística sobre la media  $P < 0.01$  mediante comparación múltiple de Tukey mientras que el promedio más bajo fue el de la Tráquea ( $0.29 \pm 0.24$ ) seguido del Pulmón Izquierdo lóbulo craneal (ápice) ( $0.56 \pm 0.34$ ).

**Cuadro 3**  
**Prueba no Paramétrica de Mann-Whitney**

Valor de P exacto o aproximado	Número de colas	Diferencia estadística significativa P<0.05	Porciones enfrentadas
Exacto	2 colas	P<0.01	Tonsila vs. Epiglotis
Exacto	2 colas	no	Epiglotis vs. tráquea
Aprox. Gaussiana	2 colas	P<0.05	PDlcra(a) vs. PIlcra(a)
Exacto	2 colas	no	PDlm(bd) vs. PIlcra(pcbd)
Aprox. Gaussiana	2 colas	no	PDlm(ba) vs. PIlcra(pcba)
Exacto	2 colas	no	PDlca(ecbd) vs. PIlca(ecbd)
Exacto	2 colas	no	PDlca(pc) vs. PIlca(pc)
ANOVA		no	PDlca(ecbd), PDla(bapm) y PIlca(ecbd)

Muestra que hubo diferencia estadística significativa en tonsila y pulmón derecho lóbulo craneal (ápice). Anova se realizó para comprobar que no hay diferencia estadística significativa sobre la varianza ya que lo demás se realizó sobre la media.





**Figura 10.** Cortes histológicos de cerdos adultos clínicamente sanos. Se observan células plasmáticas localizadas en el parénquima pulmonar, el RNA activo se tiñó de color rojo brillante y por su parte el verde tiñó DNA inespecífico. Tinción Verde Metil Pironina.

## 5. DISCUSIÓN

Existe en la bibliografía poca información de estas células en cerdos, sólo se conocen trabajos de células productoras de anticuerpos ante la presencia de infecciones como *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Se analizó la población de células plasmáticas en regiones específicas del aparato respiratorio porcino (tonsila, epiglotis, tráquea y pulmones), los animales clínicamente sanos sacrificados eran serológicamente negativos a Neumonía Enzoótica, Pasteurelosis, Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, PRRS y Aujeszky.

Para realizar el análisis histológico los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina y se observaron al microscopio óptico, lo anterior fue válido para todos los cerdos excepto el W en donde se encontraron cambios histológicos importantes por lo que a pesar de que el cerdo no manifestó signos de enfermedad fue descartado del estudio de células plasmáticas.

Para evidenciar la presencia de células plasmáticas (**CP**) se utilizó la tinción de verde metil pironina.

Como es bien sabido las células plasmáticas son productoras de inmunoglobulinas por tanto se espera que en donde no hay presencia de patógenos el número de dichas células sea bajo, al respecto se han realizado trabajos en diferentes especies; en equinos adultos se tomaron biopsias de yeyuno en la lámina propia de las vellosidades y se encontraron en promedio  $18 \pm 10.8$  **CP** y en la lámina propia de las criptas  $35 \pm 10.2$  **CP**, <sup>(M. Packer, 2003)</sup>; en gatos predominan en la lámina propia de duodeno  $8.2 \pm 3.4$  **CP** secretoras de IgA, en yeyuno  $7.0 \pm 2.8$  **CP** e ileon  $3.7 \pm 0.9$  **CP** <sup>(N. Waly, 2001)</sup>; en útero de ratas adultas, en el endometrio  $10.38 \pm 1.37$  **CP**, en el miometrio  $1.67 \pm 0.30$  **CP** <sup>(Mehmet, 2003)</sup>. Estos resultados concluyen que en condiciones normales la población de células plasmáticas es escasa aun cuando se trate de áreas continuamente expuestas a la invasión de patógenos, lo que



corresponde a los resultados obtenidos en el presente trabajo en la mayoría de los tejidos muestreados; por otro lado en tejidos expuestos a patógenos se espera un aumento en **CP**, en este estudio en los cortes de tonsila se observó el mayor número de células plasmáticas con un promedio de  $22.14 \pm 31.99$  debido principalmente a que forma parte del sistema inmune de las mucosas respiratoria y digestiva, tomando en consideración que se trabajó con cerdos adultos cuyo sistema inmune ya ha sido enfrentado a diversos antígenos. Por el contrario, la tráquea presentó el promedio más bajo de células plasmáticas ( $0.29 \pm 0.24$ ), esto es debido a que la tráquea posee un eficiente aparato mucociliar.

Con respecto al tejido pulmonar se encontró que el promedio más alto lo presentó el pulmón derecho en su porción dorsal en el extremo central PDIca(ecbd)  $3.20 \pm 3.37$  mientras que el promedio más bajo lo presentó el pulmón izquierdo lóbulo craneal en el ápice PIIcra (a)  $0.56 \pm 0.34$ . Estos datos no muestran diferencia estadística ni sobre la media ni la desviación estándar comparada con las demás regiones pulmonares. No se encontró en la literatura un estudio de **CP** enfocado en regiones plantigráficas como en el presente trabajo, pero existe un trabajo en perros realizado por *D. Peeters et al.*, en donde se cuantifica el número de células plasmáticas en la nariz, carina traqueal, bronquios primarios, secundarios y bronquiolos terminales de perros con tinciones inmunohistoquímicas en donde se detectó IgA, IgG e IgM.

Concluyendo en lo siguiente:

Tipo celular	Nariz	Carina traqueal	Bronquios 1°	Bronquios 2°	Bronquiolos terminales
<b>IgA</b>	4.34±0.29	2.56±0.3*	1.43±0.28*~	1.73±0.39*	1.06±0.43*~
<b>IgG</b>	1.04±0.15	0.71±0.16	0.68±0.16	0.43±0.21*	0.63±0.23
<b>IgM</b>	1.7±0.13	1.02±0.14*	0.41±0.13*~	0.05±0.18*~§	0.05±0.20*~
* Diferencia significativa del conteo celular en nariz (P<0.05); ~ Diferencia significativa del conteo celular en carina (P<0.05); § Diferencia significativa en el conteo celular en bronquios primarios (P<0.05)					Modificado, D. Peeters, 2005

.Estos promedios indican que las células plasmáticas secretoras de IgA (2.56±0.3) e IgM (1.02±0.14) de la carina traqueal presentaron diferencia estadística en comparación con la IgG (0.71±0.16); estos números denotan escasas células, al compararlos con lo obtenido en el cerdo en la misma región (tráquea, 0.29±0.24 C.P). En bronquios primarios, secundarios y terciarios las células plasmáticas secretoras de IgA se presentaron en mayor número mostrando diferencia estadística. Estos datos comparados con los promedios obtenidos demuestran que no hay gran diferencia numérica entre especies ya que el único par con diferencia estadística significativa en la media fue el formado por el pulmón derecho lóbulo craneal (ápice) (2.99±4.29) y pulmón izquierdo lóbulo craneal (ápice) (0.56±0.34) (cuadro 3) debido a que anatómicamente en los porcinos existe un bronquio que se origina directamente de la tráquea y ventila al lóbulo craneal derecho por lo que el aire que entra a esta porción ya ha superado las barreras físicas que le presenta la tráquea y de haber patógenos éstos entran directamente al pulmón. A pesar de la mencionada diferencia estadística las cuentas permanecen bajas aún cuando en este trabajo no se hayan realizado técnicas inmunohistoquímicas.

## 6. CONCLUSIONES

- Se estableció la distribución de las células plasmáticas en cerdos clínicamente sanos por medio de la tinción de verde metil pironina por lo que se concluye que las células plasmáticas se encuentran dispersas en los tejidos de estudio que se tiñen con verde metil pironina, con morfología ovoide de núcleo excéntrico de cromatina densa y que son escasas en tejidos sanos.
- La mayor cantidad de células plasmáticas estadísticamente significativa fue en tonsila y el órgano que presentó la menor cantidad de células plasmáticas fue la tráquea en comparación con los demás tejidos estudiados.
- En el lóbulo craneal del pulmón derecho se encontró la mayor cantidad de células plasmáticas en comparación con los demás lóbulos pulmonares.
- Por medio de la tinción de H-E se realizó una colección total de 22 fotografías que comprende tonsila, epiglotis, tráquea y pulmón de cerdos clínicamente sanos de 100 kg por medio de la tinción H-E aportando una colección de 22 fotografías.

## 7. LITERATURA CITADA

1. Abbas A.K. Litchman, H., “Inmunología Celular y molecular”, 5ª edición, Elseiver España S.A. España, 2004. pág. 6, 7, 9, 33, 19, 22.
2. Acosta, Altamirano Gustavo y Cruz López, Miguel., “Inmunología de las mucosas”, Editorial Atelier, México, 1992. pág. 7-16, 79-86.
3. Anaya, Alberto, “Las Células Cianófilas de Cajal”, Revista Española de Patología, Vol. 35, No. 2, 2002  
<http://www.pgmaonline.es/revpatologia/volumen35/vol35-num2/35-2n14.htm>.  
5 agosto 2006.
4. Appendini Tazzer Carlos M., Manual de Laboratorio de Histología Veterinaria” Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2000, pág. 84-86.
5. Banks William J. et. al., “Histología Veterinaria Aplicada”, reimp. de la 2ª edición, Editorial El Manual Moderno, México, 1998. pág.555 – 567.
6. Bernal Zepeda Hugo, “Apuntes de Anatomía Comparada” 2ª. Edición, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2002, pág. 91-99.
7. Climent Peris Salvador, et.al., “Manual de Anatomía y Embriología de los Animales Domesticos. Conceptos Básicos y Datos Aplicativos”, Editorial Acribia, Zaragoza España, 2005, pág. 15, 24, 25, 34, 48, 49.
8. Comité Internacional de Nomenclatura de Anatomía Macroscópica Veterinaria, “Nómina Histológica”, 5ª. Edición, WAVA, New York, 2005.
9. Cordero Hernández Mariana, “Determinación de los Linfocitos B y T en Órganos Linfoides de Cerdos Recién Nacidos”, Cuautitlán Izcalli, Edo. México, FES – Cuautitlán, 2004. pág. 9.
10. D. Peeters et.al., “Distribution of Leucocyte Subsets in the Canine Respiratory Tract”, 132: 261–272, University of California, Davis, USA. 2005.

11. Day J. Michael, “Atlas en Color de Enfermedades Inmunomediadas, Cuadros Clínicos, Diagnóstico y Tratamiento”, Grass Ediciones, España, 1999. pág. 2.
12. Dellman H. Dieter y Carithers Jeannie R., “Citología e Histología”, 1ª. edición, Editorial Intermédica, Argentina, 1999. pág. 273 - 279.
13. Delves, P. J. Roitt, I. M., “Encyclopedia of Immunology”, 2ª. edición, Academic Press, USA, 1998. pág.2, 13, 15, 21, 22.
14. Dyce K. W. Et.al., “Anatomía Veterinaria” Editorial Mc Graw Hill – Interamericanas, México, 1999, pág. 23, 126.
15. Fernández Benjamín et.al., “Organografía Microscópica Animal Comparada” Editorial Síntesis, Madrid, 2003. pág. 189.
16. Fiore S. H. Mariano, “Diagnóstico Histológico Compendio y Atlas de Histología”, Tomo II, 9ª. edición, Editorial El Ateneo, México, 1986. pág. 140-146.
17. Frandson R.D. et. al. “Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos”, 5ª. edición, Editorial Interamericana McGraw Hill, México, 1992. pág. 273 - 280.
18. Gabe M., “Histopatological Techniques” Masson, Springer Verlag, 1976. pág. 549.
19. Gaete Balboa Carol Andrea, “Manual de Técnicas Histológicas e Histopatológicas para Médicos Veterinarios Zootecnistas”, Cuautitlán Izcalli, Edo. México. FES – Cuautitlán, 1996. pág. 51 – 54, 61.
20. Gartner Leslie P. y James M. Hiatt, “Texto Atlas de Histología”, 2ª. edición, Editorial Interamericana McGraw Hill, México, 2002.
21. Getty, R. Sisson y Grossman, “Anatomía de los Animales Domésticos”, Tomo II, 5ª. edición, Salvat Editores, Barcelona, España, 1982. pág. 520, 1419, 1423, 1424 - 1429.
22. Halliwell R. E. W., Gorman N. T., “Inmunología Clínica Veterinaria”, Editorial Acribia S.A. España, 1989.

23. Kelley Keith W. et. al., “Veterinary Immunology and Immunopathology an International Journal of Comparative Immunology”, Editorial Elsevier, Vol. 43, 1994.
24. Kiernan J.A., “Histological and Histochemical. Methods theory and Practice”, 2<sup>a</sup>. edición, Editorial Pergamon Press. 1981, pag. 20
25. Krahmer Rolf y Lothar Schröder, “Anatomía de los Animales Domésticos”, 2<sup>a</sup>. edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1979. pág. 171 - 172.
26. Lesson Thomas S., “Texto/Atlas de Histología”, 2<sup>a</sup>. edición, Interamericana, McGraw –Hill, México, 1989. pág. 503-533.
27. Lynch, Matthew J., et. al., “Métodos de Laboratorio”, 2<sup>a</sup>. edición, Editorial Interamericana, México D.F., 1985. pág. 1283-1285.
28. M. Packer et.al., “Quantification of Immune Cell Populations in the Lamina Propria of Equine Jejunal Biopsy Specimens”, 132:90-95. Elsevier 2004.
29. Martoja, R. y M. Martoja Pierson, “Técnicas de Histología Animal”, Editorial Toray – Masson, S. A., Barcelona, España, 1970. pág. 91.
30. Mehment Kanter et.al., “Morphological Quantitative Changes in the Number of Lymphocytes, Macrophages and Plasma Cell in the Uterus and Lymph Nodes of Rats Exposed to the Systemic Administration of BCG”, 199:219-228, Van, Turkey 2003.
31. Montaraz, 1997 Juan Antonio, “Introducción a la Inmunología”, 1<sup>a</sup>. edición, Cuautitlán Izcalli, Edo. México. FES – Cuautitlán, 1997. pág. 40, 50.
32. Moreno Cardenti, Blanca, “Manual de Necropsia”, Patología General, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 1996. pág. 27, 28, 59–61.
33. Morilla González Antonio, “Inmunología Veterinaria”, 1<sup>a</sup>. edición, Editorial Diana, México, 1989. pág. 34 – 35, 72.
34. N. Waly et.al., “The Distribution of Leucocyte Subsets in the Small Intestine of Healthy Cats”, 124: 172–182, Harcourt Publishers, 2001.

35. Parslow, Tristram G. et. al., “Inmunología Básica y Clínica”, 10ª edición, Editorial El Manual Moderno, México, D.F., 2002. pág. 50, 52, 71 – 76, 141, 145, 162, 231.
36. Ramírez Necoechea Ramiro y Carlos Piojan Aguadé, “Diagnóstico de las Enfermedades del Cerdo”, Editorial Talleres de Litográfica Cultural S.A., México, 1982.
37. Roitt, I. Brostoff J. Male D. “Inmunología”, 5ª edición, Ediciones Harcourt, S.A., España, 2001. pág. 2, 13- 15, 21, 22.
38. Rojas – Espinosa Óscar, “Inmunología (de memoria)”, 2ª edición, Editorial Médica Panamericana, México, 2001. pág.31, 33.
39. Sánchez Vizcaíno José Manuel, “Curso de Introducción a la Inmunología Porcina”, 2ª edición, Laboratorio Hipra S.A., Madrid, 2004.
40. Shively, M. J. et. al., “Anatomía Veterinaria Básica, Comparativa y Clínica”, 1ª edición, Editorial el Manual Moderno, México, 2000. pág.300.
41. Soyano, Andrés, Cap. 8 “El renacimiento de la inmunología celular”, 2003 <http://cea.ivic.ve/topicoimmunologia/CAP%2008.oei.pdf>. 16 mayo 2006.
42. Stephen S. Sternberg, M. D., “Histology for Pathologists”, 2ª edición, Editorial Lippincott Williams & Wilkins, New York, 1997. pág. 433-457.
43. Stites D. P, Terr A. I., “Inmunología Básica y Clínica”, 7ª edición, Editorial El Manual moderno, México, D. F., 1993. pág. 7.
44. Straw, Bárbara E. et. al., “Diseases of Swine”, Iowa State University Press/Ames, Iowa, USA, 1999, 8<sup>th</sup> edition. pág. 799-815.
45. Tizard Ian R., “Inmunología Veterinaria”, 6ta. edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, México, 2002. pág. 1,3, 85, 90 – 93, 103, 118, 119, 121, 129, 142, 182, 242, 243, 273, 274.
46. Wayne W. Daniel, “Bioestadística. Base Para el Análisis de las Ciencias de la Salud”, 4ª edición, Editorial Limusa, 2002.