



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Análisis de la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos
provenientes de lechones de 2 a 60 días de edad”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N :

**JOSUÉ DAVID CRUZ SILVA
NALLELI HERNÁNDEZ ZAMUDIO**

ASESOR: DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Josué David Cruz Silva

A Dios:

Gracias por haberme permitido culminar mi carrera. Gracias por las bendiciones y la fortaleza en esos momentos difíciles.

A José Guillermo Cruz Hernández:

Gracias por ser el prototipo de un hombre fuerte, lleno de amor y sabiduría, por ser un ejemplo a seguir y ayudarme en los momentos difíciles (cuando más te necesito) aconsejarme cuando todo se me esta nublando. Gracias porque siempre me ayudas en todo y no me dejas fracasar, siempre me impulsas a seguir adelante. Gracias por tu tiempo y tus consejos. Te Amo Papá.

A Maricela Silva Medina:

Gracias por darme la vida y la dicha de contar en todo momento contigo, gracias por ser la fuerza que nunca me ha dejado caer, nunca podré pagarte lo que haces por mí. Gracias por ser la mujer incansable que me alienta a seguir adelante. Te Amo Mamá. Gracias por confiar en mí.

A Juan Carlos Cruz Silva:

Gracias por tu apoyo, cariño y confianza incondicionales. Gracias por alentarme a culminar mis estudios, espero servirte de ejemplo y de la misma manera termines tu carrera. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos. Te quiero mucho Charly.

A Jesús Arturo Cruz Silva:

Gracias por presionarme a realizar mi trabajo de tesis, porque no se acaba la carrera hasta que tengas el título. Gracias porque siempre me ayudas y por preocuparte por mí, échale muchas ganas y recuerda que cuentas conmigo para lo que se te ofrezca. Te quiero mucho Chumey.

A Pablo Salas Castro:

Compadre gracias por las palabras de aliento, los consejos y los momentos que vivimos juntos. Gracias por confiar en mí y creer que todo se logra cuando te lo propones. Te quiero mucho Pablovin.

A Nalleli Hernández Zamudio.

Mi amor gracias por vivir conmigo este camino que culmina con la obtención de nuestro título. Gracias por formar una familia conmigo y apoyar las decisiones que he tomado, porque siempre confías en mí y sabes que todo lo que hago es por nuestro bien, nunca cambies. Te Amo Nalle. Gracias por colaborar conmigo en la realización de esta tesis.

A Josué Yael Cruz Hernández.

A ti hijo te doy las gracias por ser el motor que me impulsa a seguir adelante, todo lo hago por ti y espero darte todo lo que necesitas. Te Amo Gordo.

A --- ---- ---- Cruz Hernández.

A ti que vienes en camino y fuiste quien marco el tiempo para la realización de esta tesis, para que cuando nazcas te dedique el tiempo y los cuidados que necesitas. Te Amo.

A Leticia Zamudio y Armando Hernández:

Suegros gracias por confiar en mi, brindarme su cariño y abrirme las puertas de su casa. Gracias por apoyarme en las buenas y en las malas. Los respeto y admiro mucho.

A Yaim Hernández:

Gracias por apoyarnos en las buenas y en las malas. Cuentas conmigo incondicionalmente. Échale muchas ganas y que tengas una vida llena de dicha y bendiciones.

AGRADECIMIENTOS

Nalleli Hernández Zamudio

A Dios:

Señor gracias por darme la vida, gracias por haberme mandado a una familia de la cual recibo la comprensión y el apoyo que necesito cada día. Gracias por estar conmigo siempre y permitirme formar mi propia familia. Gracias por no dejarme sola.

A mis Padres, Armando Hernández y Leticia Zamudio:

Gracias por darme las bases de mi educación y ayudarme a culminarla. Gracias por ayudarme a abrir las puertas de mi camino, porque en su tarea de ser padres dan cada día lo mejor de si y están ahí cuando más los necesito. Porque han sabido ser un gran ejemplo para mi hermano y para mí. Porque nos dan sus consejos en el mejor momento y no nos dejan caer.

Estoy orgullosa de ustedes, gracias por todo. Los Amo.

A mi hermano, Yaim Hernández Zamudio:

Gracias por ser mi ejemplo, por estar conmigo cuando más te necesito, porque por duro que sea me haces ver mis errores. Porque en ocasiones quisiera retroceder el tiempo y pasar mas momentos contigo.

Cuidate mucho. Te Amo.

A mi abuelo, José Zamudio Rubio:

Abuelito, aunque estos últimos años no hemos pasado tantos momentos juntos, te agradezco el que sigas preocupándote por mi y ahora hasta por mi familia (Josué y Yael), te agradezco los consejos que me das porque eso demuestra que me quieres. Abue, te doy gracias por el tiempo que nos dedicaste cuando éramos niños y por los momentos tan bonitos y divertidos que nos hiciste pasar. Te Quiero Mucho Abuelito.

A mis abuelitos, Concepción, Clara y Porfirio.

A ustedes que desde el cielo han seguido siendo una luz en mi camino y desde lejos han seguido viendo por mí y por mis padres. Los Extraño mucho.

A mi esposo, Josué David Cruz Silva:

Gracias Jos por darme la dicha de tener un hijo tan maravilloso y de que venga otro en camino. Gracias por darme la confianza y amor que necesito. Gracias por ayudarme a vencer mis temores y estar conmigo. Gracias por saberme comprender. Te Amo Gordo.

A mi hijo, Josué Yael Cruz Hernández:

Gracias Gordo porque a pesar de tu corta edad me has enseñado mucho de la vida, porque desde el momento en que te esperaba has sido el motor que me impulsa a seguir adelante. Gracias por ser la personita que eres y de la cual me siento muy orgullosa.

Hijo no tengo palabras para describir lo que siento por ti ni la felicidad que me has dado. Te Amo Papito.

A ese angelito que esta a punto de venir a la tierra y al cual amo desde el momento en que supe que esta en camino:

Bebe gracias por la fuerza y coraje que me das al sentirte dentro. Gracias por la alegría que me haces sentir. Te Amo Bebe y te esperamos con ilusión.

A mis Suegros, José Guillermo Cruz y Maricela Silva:

Gracias por estar con nosotros cuando los necesitamos. Gracias por hacer de Josué un hombre tan maravilloso. Gracias por el cariño que me han brindado y la confianza que me han dado.

A mis Cuñados:

Gracias por el apoyo, cariño y comprensión que me han dado. Recuerden que cuentan conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Josué David Cruz Silva y Nalleli Hernández Zamudio

Al Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate:

Gracias Nacho por creer y confiar en nosotros, por ayudarnos a realizar este trabajo el cual tiene un gran significado en nuestra vida profesional. Gracias porque en tu tarea de enseñar das todo por tus alumnos y porque sabemos que podemos contar contigo.

A la FES-Cuautitlán.

Por abrírnos las puertas y permitirnos formar parte de la familia UNAM.

A nuestros profesores:

Por darnos las bases y herramientas necesarias para defendernos como profesionistas.

Por mi raza hablará el espíritu.

ÍNDICE

1. Índice		1
2. Resumen		3
3. Introducción.....		4
➤ Línea linfoide.....		4
➤ Línea mieloide		4
➤ Estimulación blástica o ensayo de proliferación		5
➤ Lectinas o mitógenos		5
➤ Receptor de la célula T (TCR).....		6
➤ Justificación.....		7
4. Objetivos.....		8
➤ Objetivo general		8
➤ Objetivos particulares.....		8
5. Material y métodos		9
➤ Animales y muestras.....		9
➤ Aislamiento de linfocitos.....		9
➤ Estandarización de la concentración de los mitógenos		10
➤ Ensayos de proliferación		10
➤ Determinación de la concentración del anticuerpo anti-CD3 de porcino....		11
➤ Preparación del ensayo con el anticuerpo anti-CD3 de porcino.....		11
➤ Análisis de datos.....		11
6. Resultados.....		13
➤ Estandarización de los ensayos de proliferación		13
➤ Respuesta a la estimulación con mitógenos inespecíficos.....		13
➤ Respuesta a la Concanavalina A (Con A)		16

➤ Respuesta al Mitogeno de <i>Phytolacca americana</i> (PWM)	17
➤ Respuesta a Lipopolisacáridos (LPS).....	18
➤ Respuesta de los linfocitos T a la estimulación con anticuerpo anti-CD3 ..	20
7. Discusión	22
8. Conclusiones.....	25
9. Bibliografía.....	26

RESUMEN

En este estudio se evaluó la capacidad de respuesta de los linfocitos periféricos del cerdo a la estimulación con mitógenos inespecíficos. Para esto se utilizaron cerdos de 2 a 60 días de edad los cuales fueron tomados al azar de diez camadas diferentes y se formaron cinco grupos: el grupo I estuvo formado por seis lechones de 2 a 5 días; el grupo II por cinco lechones de 15 días; el grupo III por cinco lechones de 35 días; el grupo IV por cuatro lechones de 45 días y el grupo V por cinco lechones de 60 días de edad, además un grupo control, representado por los linfocitos no estimulados de cada uno de los animales evaluados. Los linfocitos fueron aislados de la sangre y sembrados en una microplaca de 96 pozos, donde fueron estimulados con Concanavalina A (Con A), Mitógeno de *Phytolacca americana* (PWM) y Lipopolisacáridos (LPS). Adicionalmente, se decidió trabajar con un anticuerpo producido contra CD3 de porcino. La respuesta a Con A fue evidente en todos los grupos de animales y, en todo momento, mostró una tendencia ascendente que se mantuvo aún en los cerdos de 60 días de edad. En el caso de PWM la respuesta fue ascendente hasta los 45 días, donde encontramos la respuesta más alta, la cual no muestra gran diferencia con el valor encontrado a los 60 días de edad. Con LPS la respuesta se obtuvo hasta los 15 días de edad, ya que con los animales del primer grupo los valores obtenidos fueron negativos, el valor máximo se encontró hasta los 60 días de edad, aún y cuando es muy similar al valor obtenido a los 45 días de edad, este fue el mitógeno con el cual obtuvimos las respuestas más bajas en todos los grupos evaluados. Los resultados obtenidos con estos mitógenos muestran claramente que la edad tiene una relación directa con la respuesta de los linfocitos periféricos. La respuesta ante el anticuerpo anti-CD3 mantuvo una relación directa con la edad pero el aumento entre rango y rango de edad fue mínimo. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que, a pesar de que los lechones al nacer son inmunológicamente inmaduros, los linfocitos periféricos de estos animales son capaces de responder a estímulos. Adicionalmente, se muestra la relación que existe entre la edad de los animales y la capacidad de respuesta, ya que ésta aumenta con la edad, alcanzando su nivel máximo hasta los 45 (PWM) o 60 días de edad (Con A, LPS y CD3).

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune del cerdo está formado por un conjunto de órganos linfoides y varios tipos de células que le permiten reaccionar frente a agentes extraños (respuesta primaria), en caso de una segunda infección, elaborar una respuesta más rápida, fuerte y específica (respuesta secundaria), al mismo tiempo, reconocer y preservar las estructuras propias del individuo (Abbas y Litchman 1999, Tizard 2002).

Las células que forman el sistema inmune porcino son muy variadas tanto en su estructura como en su función y todas proceden de una célula madre pluripotencial de la médula ósea, de la que se diferencian dos líneas distintas (Abbas y Litchman 1999, Tizard 2002):

Línea Linfoide. Esta línea 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 en el caso de una nueva invasión (capacidad de memoria). De esta línea derivan:

- Los linfocitos B. Producidos en la médula ósea y responsables de la producción de anticuerpos (Inmunidad humoral).
- Los linfocitos T. Se producen en la médula ósea y maduran en el timo, son los responsables de los mecanismos de inmunidad celular, además de coordinar la producción de anticuerpos (Abbas y Litchman 1999, Roit y col. 2002).

Línea Mieloide. De la que derivan las células presentadoras de antígenos (CPA) que forman parte de la inmunidad innata, y juegan un papel esencial en la iniciación de la inmunidad adquirida. Las CPA incluso pueden actuar como células efectoras en algunos mecanismos inmunitarios, como: fagocitosis, presentación de antígenos y producción de linfocinas (Abbas y Litchman 1999, Roit y col. 2002).

Este grupo de células está formado por:

- Monocitos y Macrófagos.
- Granulocitos:
 - Eosinófilos.
 - Neutrófilos.

- Basófilos.
- Células Dendríticas.

La inmadurez del sistema inmunológico en los animales recién nacidos ha sido reconocida en diferentes trabajos (Wilson 1974, McCauley y Hartman 1984, Becker y Misfledt 1993, Marshall-Clarke 1996, Norvell 1995, Cordero 2005). La información disponible sobre el estado del sistema inmunológico durante el periodo que va desde el nacimiento hasta los 30 o 35 días de edad es incompleta y contradictoria. Así tenemos que Valpotic y col. (1989) reportan respuestas muy limitadas de los linfocitos a la estimulación con mitógenos, mientras que Hoskinson y col. (1990) encontraron respuestas altas de proliferación en cerdos de 0.5 a 6 semanas de edad.

Estimulación blástica o Ensayo de proliferación

La utilización de la estimulación blástica o ensayo de proliferación es actualmente una de las técnicas más precisas y difundidas para el estudio de la capacidad de estimulación específica e inespecífica de los linfocitos *in vitro*. Esta técnica se basa en la capacidad que los linfocitos tienen para responder frente a un antígeno (respuesta específica) que por vacunación o por sufrir una infección, ha inducido linfocitos de memoria. Estos linfocitos al estar de nuevo en contacto con el antígeno inducen una transformación blástica. Esta estimulación blástica también puede ser inducida de forma inespecífica gracias a la capacidad de los linfocitos para reaccionar con diferentes tipos de lectinas o mitógenos. Las lectinas inducen una estimulación blástica de tipo inespecífico tanto en los linfocitos B como en los T (Tizard 2002, Coligan y col. 2005).

Lectinas o Mitógenos

Son sustancias de carácter proteico derivadas de plantas y bacterias. Actúan a través de los determinantes de hidratos de carbono de la membrana celular de los linfocitos produciéndoles un fenómeno de activación linfocítica (división de los linfocitos). Los más conocidos son: Fitohemaglutina (PHA) y Concanavalina A (Con A) que estimulan a los linfocitos T, los Lipopolisacáridos (LPS) que estimulan a los linfocitos B y la Lectina de

Phytolacca americana (PWM) que estimula a ambas poblaciones linfocitarias (Coligan y col. 2005).

El método de la blastogénesis consiste en cultivar los linfocitos de un animal junto con antígenos conocidos y con varios mitógenos, que se utilizan como control de la inmunoproliferación (estimulación no específica). La transformación blástica específica se mide por la capacidad que tiene el antígeno de inducir inmunoproliferación.

Receptor de la Célula T (TCR)

Los linfocitos T poseen receptores específicos para los antígenos, estas moléculas son conocidas como receptor de la célula T o TCR (por sus siglas en inglés). Cada TCR está formado por seis glicoproteínas; dos de ellas se unen al antígeno y las otras cuatro amplifican la señal generada por la unión del antígeno. Se han identificado dos diferentes tipos de TCR de acuerdo con las cadenas usadas para la unión al antígeno; α/β y γ/δ (Tizard 2004). La unión del antígeno al TCR es una señal que induce la respuesta de la célula T. Así, las dos cadenas de unión al antígeno, siempre están asociadas con un grupo de glucoproteínas llamadas en conjunto, complejo CD3. Este complejo consiste de cinco diferentes cadenas proteicas (γ , δ , ϵ , ζ y η) arregladas en tres dímeros $\gamma-\epsilon$, $\delta-\epsilon$ y $\zeta-\zeta$ ó $\zeta-\eta$, éstas moléculas son las encargadas de iniciar la cascada de señalización que va a transferir al núcleo la señal recibida en el TCR (Allende y col. 2003, Tizard 2004). Sin embargo, la unión de TCR al complejo MHC-péptido es usualmente insuficiente para disparar la respuesta de la célula T cooperadora ya que son necesarias otras señales coestimuladoras para inducir una respuesta óptima de estos linfocitos (Tizard 2004).

Justificación

Consideramos importante determinar si los lechones recién nacidos muestran una capacidad proliferativa que les permita responder adecuadamente a estímulos inespecíficos (mitógenos) ya que existen datos contradictorios al respecto. Aunado a lo anterior consideramos que es importante evaluar los dos primeros meses de vida con el fin de determinar si la capacidad proliferativa muestra cambios con la edad. Finalmente, al utilizar tres diferentes mitógenos buscamos evaluar comparativamente la respuesta proliferativa de las dos poblaciones principales de linfocitos (T y B), con el fin de determinar si existe alguna diferencia en la respuesta obtenida por ambas poblaciones.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la respuesta proliferativa de los linfocitos periféricos de lechones de 2 a 60 días de edad en respuesta a la estimulación inespecífica con diferentes mitógenos.

Objetivos Particulares:

- a. Evaluar la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos de lechones jóvenes al ser estimulados con diferentes mitógenos.
- b. Determinar si la edad tiene algún efecto sobre la capacidad de los linfocitos periféricos para responder a una estimulación inespecífica.
- c. Determinar si la respuesta inducida en los linfocitos periféricos de lechones jóvenes cambia con los mitógenos utilizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Animales y muestras

Los animales utilizados para este estudio forman parte de una granja situada en el municipio de Villa del Carbón, en una localidad llamada “El Águila” la cual está ubicada en las siguientes coordenadas: 99°31'30" longitud oeste y 19°41'19.27" latitud norte. Presenta una altitud de 2650 msnm y una temperatura promedio de 20°C. Esta granja se dedica a la crianza de cerdos para abasto y cuenta con 25 vientres y un semental de la raza Pietrain. Las muestras de sangre fueron obtenidas de lechones de diez camadas diferentes y estos fueron elegidos al azar. La sangre se obtuvo por punción directa de la vena yugular externa, recolectando 5 ml por cerdo en tubos estériles con anticoagulante. Las muestras fueron obtenidas de seis lechones de 2-5 días, cinco lechones de 15 días, cinco lechones de 35 días, cuatro lechones de 45 días y cinco lechones de 60 días de edad.

b. Aislamiento de Linfocitos

Inicialmente se mezclaron 4 ml de sangre completa con 5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Después, en un tubo Falcon de 15 ml se colocaron 5 ml de Ficoll (Histopaque, Sigma), por encima de él y con mucho cuidado para evitar que se mezclen, se añadió la mezcla de la sangre con el RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB. Se centrifugó a 400g (1750 rpm en centrifuga Hermle, rotor 220.97 V02/4) durante 30 minutos y, posteriormente, se retiró la fase intermedia (células sanguíneas mononucleares periféricas, CSMP) con una pipeta pasteur. Las CSMP fueron transferidas a un nuevo tubo Falcon de 15 ml y se agregó un volumen igual de RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB (3-4 ml). Las CSMP fueron lavadas con movimientos cuidadosos y se volvieron a centrifugar a 200g (1250 rpm en centrifuga Hermle, rotor 220.97 V02/4) durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y las CSMP fueron resuspendidas en 3-4 ml de RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB. Las CSMP fueron lavadas en otras dos ocasiones. Después de centrifugar, la totalidad de los eritrocitos fueron eliminados mediante la adición de 5 ml de un buffer de lisis-Tris (NH_4Cl 160 mM; Tris 170 mM), la suspensión fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Se agregaron 9 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB, se agitó cuidadosamente y se

centrifugó a 200g por 10 minutos. Este paso de lavado fue repetido una vez más con las mismas condiciones. Las CSMP fueron resuspendidas en 4 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB. Con el fin de verificar la viabilidad de las células se hizo una mezcla 1:1 de la suspensión de CSMP y Azul Tripán 0.5%, para cumplir adecuadamente con los objetivos de este trabajo se comprobó que la viabilidad siempre fuera mayor al 95%. Finalmente, las células fueron contadas en una cámara de Neubauer y la concentración de las células fue ajustada a 2×10^6 /ml.

c. Estandarización de la concentración de los mitógenos

Se realizó un ensayo en el cual se probaron los mitógenos que se iban a utilizar en este trabajo (Con A, PWM y LPS). Para ello se prepararon varias diluciones con las cuales obtuvimos las siguientes concentraciones: 80, 40, 20 y 10 $\mu\text{g/ml}$ para cada uno de los mitógenos. Asimismo, se buscó determinar el número idóneo de células por pozo. De este modo, realizamos un doble ensayo ya que utilizamos dos concentraciones diferentes de células (1 y 2×10^6 /ml) y cuatro concentraciones diferentes (80, 40, 20 y 10 $\mu\text{g/ml}$) de cada uno de los mitógenos (Becker y col. 1993, Valpotic y col. 1989).

d. Ensayos de Proliferación

Se depositaron 50 μl de la suspensión de células (2×10^6 células/ml) en cada uno de los pozos a utilizar de una placa de 96 pozos. Se agregaron 50 μl de cada uno de los siguientes mitógenos: Concanavalina A (Con A), Mitógeno de *Phytolacca americana* (PWM) y Lipopolisacáridos (LPS) o únicamente medio (pozo control). Los tres mitógenos fueron usados a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La placa fue incubada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 72 horas. Posteriormente se agregaron 10 μl del reactivo MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma), a una concentración de 5 mg/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB. Después de una incubación adicional de 4 horas, se retiró el contenido completo de cada uno de los pozos, se agregaron 100 μl de Dimetil sulfoxido (DMSO) y se mezcló el contenido suavemente con el fin de disolver el sedimento. Posteriormente, se realizó la lectura a una longitud de onda de 595 nm en un lector de ELISA. Es importante señalar que todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

e. Determinación de la concentración del anticuerpo anti-CD3 de porcino

Inicialmente se preparó una solución madre del anticuerpo anti-CD3 de porcino (Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 ϵ de porcino, BD Biosciences) de 1 mg/ml en amortiguador de fosfatos (PBS). A partir de la solución madre se prepararon soluciones con cuatro concentraciones diferentes: 500, 100, 50 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Estas soluciones fueron probadas con una suspensión de 2×10^6 de linfocitos/ml provenientes de dos cerdos de 35 días de edad.

f. Preparación del ensayo con el anticuerpo anti-CD3 de porcino

Para preparar la placa se agregaron 30 μl de la solución de trabajo del anticuerpo (50 $\mu\text{g/ml}$) a cada uno de los pozos por utilizar. Se incluyó un pozo con 30 μl de PBS (pozo control). La placa fue cubierta y agitada lentamente con el fin de que el fondo de la placa fuera cubierta totalmente con la solución. La placa fue incubada a 37° C por 90 minutos y, posteriormente, a 4° C por toda la noche. Al día siguiente se lavaron los pozos con 200 μl de PBS frío y, posteriormente, el PBS fue eliminado con un movimiento rápido sobre una toalla de papel dentro de la campana de flujo laminar. Este lavado fue repetido otras dos ocasiones. Se colocaron 100 μl de PBS en cada uno de los pozos y la placa fue almacenada a 4° C hasta su uso.

g. Análisis de datos

Los resultados serán expresados como respuesta al reactivo MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma), en unidades de absorbancia (UA) para las respuestas obtenidas con los linfocitos estimulados y los no estimulados (control). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se obtuvo el promedio de cada uno de los animales evaluados y, posteriormente, para cada uno de los grupos. El pozo control estuvo representado por linfocitos no estimulados de cada uno de los animales evaluados y se obtuvo el valor promedio de los pozos control en cada grupo. La diferencia entre el valor promedio de los linfocitos estimulados y los no estimulados fue utilizada para elaborar figuras y tablas. Para determinar si la respuesta obtenida entre los diferentes grupos de edad era estadísticamente significativa se realizó la prueba t de Student, comparando la respuesta

obtenida en los animales de 2-5 días de edad (grupo I) con la de los animales de 60 días de edad (grupo V).

RESULTADOS

I. Estandarización de los ensayos de proliferación

Con el fin de determinar la concentración a la cual los mitógenos son capaces de inducir una respuesta adecuada se diseñó un ensayo en el cual, adicionalmente, se probó la mejor concentración de células a utilizar. Para realizar este ensayo se consideraron datos reportados previamente (Becker y col. 1993, Valpotic y col. 1989). Así, se decidió explorar dos diferentes concentraciones de linfocitos (1 y 2×10^6 cel/ml) y cuatro concentraciones de mitógenos (80, 40, 20 y 10 $\mu\text{g/ml}$).

Al revisar los resultados (Tabla 1) se puede notar que no hay una gran diferencia en la respuesta obtenida a las diferentes concentraciones de los mitógenos. Sin embargo, no sucede lo mismo con las dos diferentes concentraciones de células; observándose una mayor respuesta a la concentración de 2×10^6 cel/ml. En base a lo anterior se decidió utilizar los tres mitógenos probados (Con A, PWM y LPS) a la menor concentración a la cual obtuvimos la respuesta (10 $\mu\text{g/ml}$) y una suspensión de células a la concentración de 2×10^6 /ml.

Concentración del mitógeno ($\mu\text{g/ml}$)	1×10^6 células/ml			2×10^6 células/ml		
	Con A	PWM	LPS	Con A	PWM	LPS
80	0.241	0.258	0.308	0.440	0.392	0.581
40	0.278	0.251	0.363	0.459	0.369	0.536
20	0.290	0.260	0.336	0.438	0.369	0.588
10	0.260	0.275	0.303	0.473	0.415	0.563

Tabla 1. Resultados obtenidos con dos concentraciones de células y con diferentes concentraciones de mitógenos.

II. Respuesta a la estimulación con mitógenos inespecíficos

Estos ensayos se realizaron con el fin de evaluar la capacidad de proliferación de linfocitos periféricos provenientes de cerdos de 2 a 60 días de edad al ser estimulados con mitógenos inespecíficos (Con A, PWM y LPS). Los lechones fueron distribuidos en cinco grupos de

acuerdo con la edad: Grupo I, cerdos de 2-5 días; Grupo II, cerdos de 15 días; Grupo III, cerdos de 35 días; Grupo IV, cerdos de 45 días y Grupo V, cerdos de 60 días.

Los datos contenidos en la Tabla 2 expresan el resultado de la estimulación de los linfocitos con los diferentes mitógenos. Adicionalmente se muestran los valores obtenidos con los linfocitos no estimulados (control).

Grupo	Cerdo	Con A	PWM	LPS	Control
I	1	0.121	0.115	0.100	0.094
	2	0.214	0.127	0.128	0.135
	3	0.241	0.266	0.229	0.206
	4	0.249	0.179	0.079	0.139
	5	0.202	0.251	0.118	0.157
	6	0.205	0.235	0.131	0.210
Valor Promedio		0.205	0.196	0.131	0.157
II	7	0.110	0.126	0.116	0.098
	8	0.216	0.238	0.220	0.199
	9	0.600	0.434	0.458	0.293
	10	0.289	0.201	0.247	0.243
	11	0.472	0.835	0.260	0.382
Valor Promedio		0.337	0.367	0.260	0.243
III	12	0.185	0.340	0.289	0.151
	13	0.373	0.359	0.176	0.189
	14	0.405	0.361	0.198	0.171
	15	0.137	0.195	0.277	0.149
	16	0.252	0.233	0.182	0.144
Valor Promedio		0.270	0.298	0.224	0.161
IV	17	0.277	0.247	0.233	0.197
	18	0.422	0.344	0.430	0.326
	19	0.351	0.334	0.255	0.329
	20	0.701	0.823	0.658	0.284
Valor Promedio		0.438	0.437	0.394	0.284
V	21	0.706	0.654	0.554	0.237
	22	0.426	0.341	0.364	0.267
	23	0.403	0.336	0.321	0.244
	24	0.332	0.313	0.261	0.212
	25	0.435	0.297	0.253	0.224
Valor Promedio		0.460	0.388	0.351	0.237

Tabla 2. Resultados de los linfocitos estimulados y no estimulados en unidades de absorbancia (UA).

El valor de la respuesta de los linfocitos a la estimulación resulta de la diferencia entre el valor promedio obtenido con los mitógenos inespecíficos y el valor promedio de los linfocitos no estimulados (control). Valores positivos en esta diferencia indican la presencia de respuesta de los linfocitos a la estimulación (Tabla 3).

Edad de los Lechones (días)	Con A	PWM	LPS
2 – 5	0.049	0.039	-0.026
15	0.094	0.124	0.017
35	0.110	0.137	0.064
45	0.154	0.153	0.110
60	0.224	0.151	0.114

Tabla 3. Respuesta de los linfocitos periféricos a la estimulación con mitógenos inespecíficos. Con A; Concanavalina A, **PWM;** Mitógeno de *Phytolacca americana* y **LPS;** Lipopolisacáridos.

Respuesta a la Concanavalina A (Con A)

Al estimular a los linfocitos periféricos provenientes de cerdos de diferentes edades con Con A se obtuvieron los valores contenidos en la Tabla 3 y, con ellos, se elaboró la Figura 1. La estimulación con Con A se caracterizó porque en todos los grupos de edad hubo una respuesta evidente que en todo momento manifestó una tendencia ascendente. Así, al comparar la respuesta inicial con el valor más alto obtenido, podemos señalar que la capacidad de proliferación aumentó 4.6 veces y que la diferencia más grande se obtuvo entre los cerdos de 45 y 60 días de edad (0.070 UA). Por otra parte, es importante notar que en el último registro, realizado a los 60 días de edad, la respuesta aún mantiene una tendencia ascendente, lo cual sugiere la posibilidad de obtener valores más altos en animales de mayor edad. Los resultados encontrados permiten apreciar que la capacidad de respuesta a Con A está relacionada con la edad de los animales (Figura 1) y podemos señalar que la diferencia encontrada entre la media del grupo I y la del grupo V, son estadísticamente significativas ($\alpha = 0.05$).

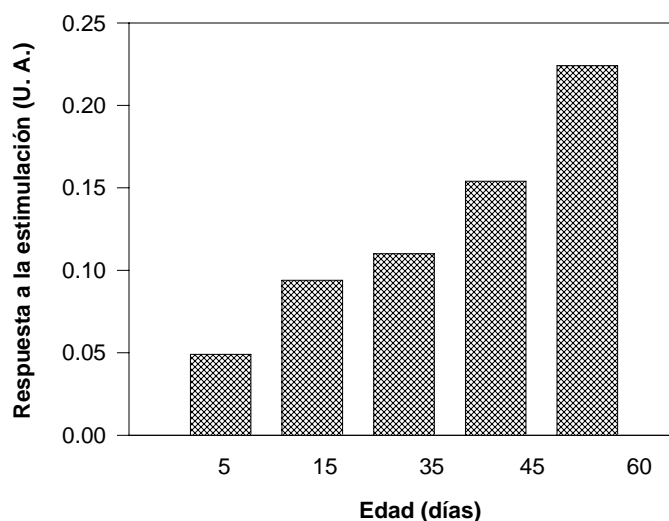


Figura 1. Respuesta a la estimulación con Concanavalina A.

Respuesta al Mitogeno de *Phytolacca americana* (PWM)

Los valores de la respuesta de los linfocitos de sangre periférica a la estimulación con PWM se señalan en la Tabla 3 y, con ellos, se elaboró la Figura 2. La respuesta a la estimulación con PWM se caracterizó porque en todos los grupos de edad hubo una respuesta evidente. Al comparar la respuesta inicial con el valor más alto podemos señalar que la capacidad de proliferación aumentó 3.9 veces y que la diferencia más grande se obtuvo entre los cerdos de los grupos I y II (0.085 UA). Es importante señalar que fue el único mitogeno donde el valor más alto correspondió a los cerdos de 45 días de edad y donde se encontró la diferencia más grande entre grupos (0.085 UA). Los valores obtenidos indican que la edad tiene un efecto directo sobre la capacidad de respuesta a la estimulación con PWM (Figura 2), de tal forma que la diferencia encontrada entre la media del grupo I y la del grupo V es estadísticamente significativa ($\alpha = 0.10$).

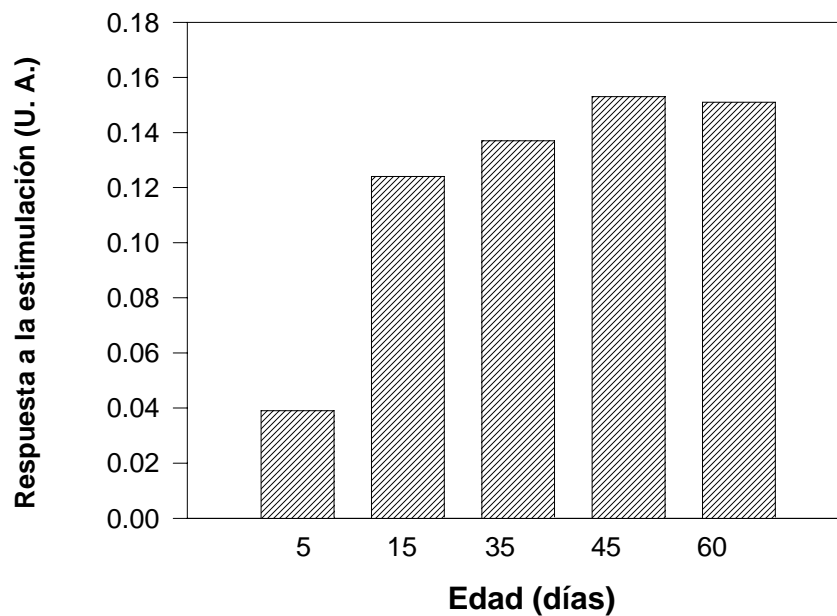


Figura 2. Respuesta a la estimulación con Mitogeno de *Phytolacca americana*.

Respuesta a Lipopolisacáridos (LPS)

Al estimular con LPS a los linfocitos periféricos de cerdos de 2 a 60 días de edad se obtuvieron los valores contenidos en la Tabla 3 y, con ellos, se elaboró la Figura 3. Se puede apreciar que el valor obtenido en lechones de 2–5 días de edad fue negativo lo cual indica que no hubo respuesta en este grupo. Sin embargo, en el resto de los animales la respuesta fue evidente y mantuvo una tendencia ascendente a lo largo del periodo explorado. Como el valor del primer grupo es negativo, para calcular las veces que aumentó la capacidad de proliferación se tomó como valor inicial el resultado obtenido en los cerdos del grupo II y así tenemos que la respuesta aumentó 6.7 veces. Con los lipopolisacáridos la respuesta más alta se volvió a presentar en los cerdos de 60 días de edad y la diferencia más grande se obtuvo entre los cerdos de 15 y 35 días de edad (0.047 UA). Los datos obtenidos indican que con este mitogeno se vuelve a manifestar que la edad tiene una relación directa con la capacidad de respuesta de los linfocitos periféricos, de tal forma que la diferencia encontrada entre la media del grupo I y la del grupo V resultó estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$).

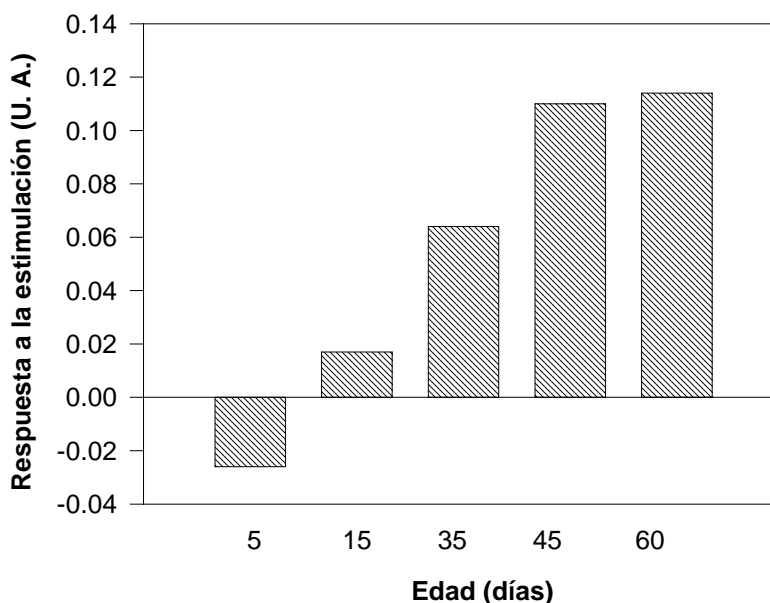


Figura 3. Respuesta a la estimulación con Lipopolisacáridos.

En todos los casos, los lechones de 2-5 días de edad fueron los que mostraron la respuesta más baja y, en sentido contrario, la respuesta más alta se presentó en los lechones de 60 días de edad, excepto en el caso de PWM, en donde el valor más alto lo encontramos en los cerdos de 45 días de edad. Se puede comentar que la respuesta para Con A fue la mejor en el sentido de que manifestó una tendencia ascendente que se mantuvo hasta el final del periodo evaluado. Por su parte, PWM fue el único mitogeno en el que la respuesta más alta se presentó en los cerdos de 45 días de edad, aunque la diferencia con los cerdos de 60 días es de solo 0.002 UA, de tal manera que ambas respuestas se pueden considerar como similares. La respuesta a LPS se caracterizó por la ausencia de un valor positivo en el primer grupo evaluado, aunque de manera inmediata manifiesta en los cerdos de 15 días de edad una respuesta evidente que mantiene su tendencia positiva a lo largo del periodo explorado. Es importante notar que, en todos los grupos de animales, la respuesta obtenida con LPS fue la que mostró el menor valor (Figura 4).

Al revisar de manera integral los datos obtenidos se puede señalar que la respuesta obtenida, independientemente del mitogeno evaluado, siempre estuvo relacionada con la edad del animal (Figura 4).

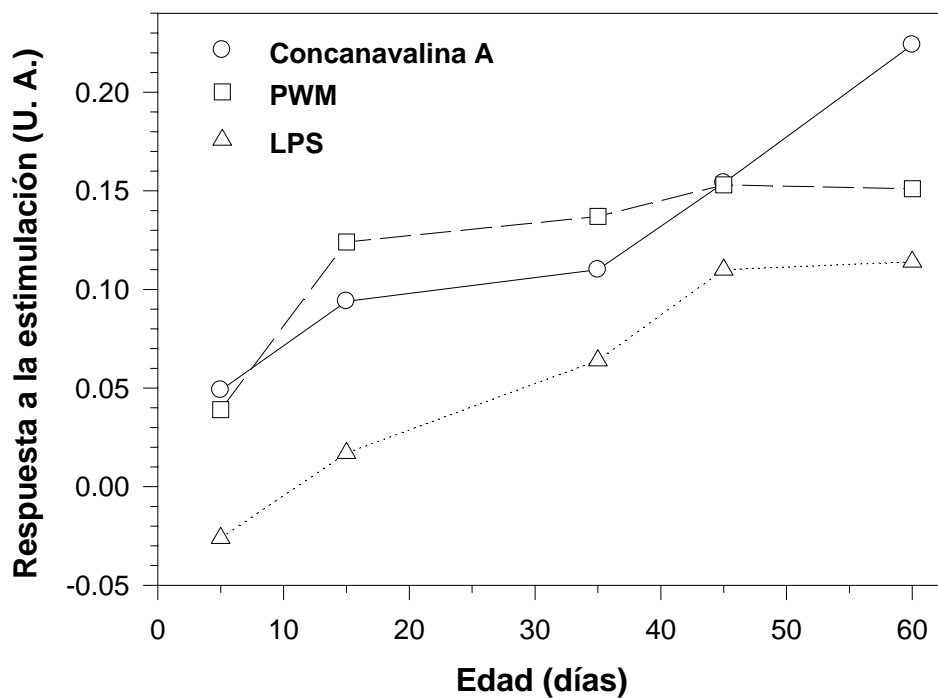


Figura 4. Respuesta obtenida en linfocitos periféricos de cerdos de diferentes edades a la estimulación con mitógenos inespecíficos.

III. Respuesta de los linfocitos T a la estimulación con anticuerpo anti-CD3

Los resultados obtenidos en la estandarización de la concentración del anticuerpo anti-CD3 (Tabla 4) muestran que la mejor respuesta se obtiene con la concentración de 50 µg/ml, de tal manera que fue la concentración utilizada en el resto de los ensayos.

Cerdo	Concentración del anticuerpo (µg/ml)			
	10	50	100	500
15	0.246	0.327	0.253	0.68
16	0.186	0.416	0.332	0.336
Promedio	0.216	0.372	0.293	0.508

Tabla 4. Determinación de la concentración de anticuerpo anti-CD3 de porcino capaz de inducir una respuesta en los linfocitos T.

Los valores obtenidos como respuesta a la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 de porcino están recopilados en la Tabla 5 y con ellos se elaboró la Figura 5. Es importante señalar que se pudo obtener respuesta en cada uno de los rangos de edad explorados. Sin embargo, si bien los valores obtenidos siguieron un orden ascendente como para la Con A, la diferencia de los valores obtenidos entre los grupos de edad evaluados fueron mínimos, esto es, en ningún momento encontramos grandes aumentos como con los mitógenos inespecíficos. Así, la capacidad de proliferación aumentó sólo 1.7 veces y la diferencia más grande se obtuvo entre los cerdos de 35 y 45 días de edad (0.012 UA). A pesar de los bajos valores, el comportamiento de la respuesta indica que también en este caso la edad está relacionada con la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos, aunque la diferencia encontrada entre la media del grupo I y la del grupo V no resultó estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$).

Edad de los lechones (días)	CD3
2 – 5	0.047
15	0.054
35	0.063
45	0.075
60	0.080

Tabla 5. Respuesta de los linfocitos periféricos a la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 de porcino.

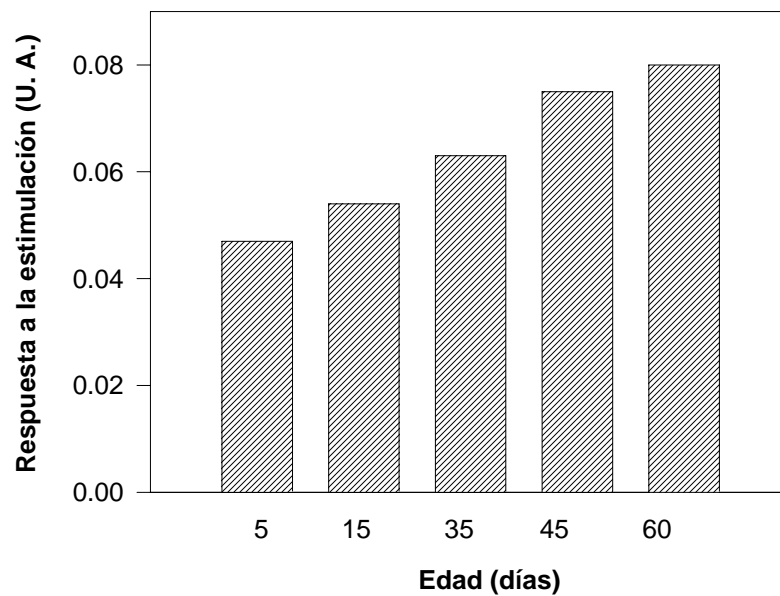


Figura 5. Respuesta a la estimulación con anticuerpo anti-CD3 de porcino.

DISCUSIÓN

Los animales involucrados en este estudio forman parte de una granja comercial ubicada en la comunidad de “El Águila”, municipio Villa del Carbón, Edo. de México, estos animales fueron escogidos al azar de 10 camadas diferentes y con las muestras obtenidas se buscó evaluar la capacidad de respuesta de los linfocitos periféricos a la estimulación con mitógenos inespecíficos y determinar la influencia de la edad sobre la capacidad inmunológica de los animales.

Todos los componentes del sistema inmune innato y adquirido se desarrollan en el útero y son funcionales al nacimiento. Sin embargo, generalmente son menos eficientes que en el adulto (Straw 2000, Morein y col. 2002, Borghetti y col. 2006), parte de esta inmunodeficiencia ha sido atribuida a la inmadurez de los compartimentos linfocíticos del sistema linfoide (Murgita y Wigzell 1981).

En trabajos similares se han evaluado animales de 1 a 30 días de edad (Becker y Misfeldt 1993), en otro más utilizaron linfocitos provenientes de cerdos de 2 horas, 2 días y 4 semanas de edad (Valpotic y col. 1989); mientras que Hoskinson y col. (1990) exploraron cerdos de 0.5 a 6 semanas de edad, como se puede apreciar en ninguno de ellos se hace una exploración más allá de los 30 días de edad. En este trabajo decidimos abarcar de los 2 a los 60 días de edad y los animales involucrados fueron divididos en 5 grupos (2 a 5, 15, 35, 45 y 60 días de edad); con esto no sólo se abarca el periodo estudiado por la mayoría de los autores sino que se amplía con el fin de evaluar más allá de la edad a la cual se ha mencionado que el sistema inmune alcanza su madurez (Chu RM y col. 1979, McCauley y Hartman 1984, Murgita y Wigzell 1981).

Se realizaron ensayos previos de estandarización, para lo cual se utilizaron dos diferentes concentraciones de linfocitos (1 y 2×10^6 cel/ml) y cuatro concentraciones de cada uno de los mitógenos (80, 40, 20 y 10 $\mu\text{g/ml}$). En base a los resultados obtenidos, se decidió trabajar con una concentración de 2×10^6 cel/ml y de 10 $\mu\text{g/ml}$ para cada uno de los mitógenos empleados. Los ensayos de proliferación fueron desarrollados de acuerdo con lo reportado en la literatura (Valpotic y col. 1989, Hoskinson y col. 1990, Becker y Misfeldt 1993, Whary y col. 1995, Borghetti y col. 2006).

Con el fin de evaluar a las dos diferentes poblaciones de linfocitos se decidió utilizar a la Concanavalina A (Con A), la cual estimula a los linfocitos T, los Lipopolisacáridos (LPS) que estimulan a los linfocitos B y el Mitogeno de *Phytolacca americana* (PWM), el cual estimula a ambas poblaciones linfocitarias (Coligan y col. 2005).

Varios autores señalan que los linfocitos T son la población linfocítica circulante que predomina y puede llegar a representar hasta el 80% de los linfocitos en sangre periférica, y solo una pequeña fracción de los linfocitos sanguíneos son linfocitos B (Morilla 1989, Tizard 2004, Borghetti y col. 2006). Esto puede explicar porque la Con A fue el mitogeno con el cual obtuvimos la mejor respuesta, mientras que con LPS encontramos la respuesta de menor magnitud.

Existen datos contradictorios con respecto a la capacidad de respuesta de los linfocitos periféricos en animales recién nacidos. Así, varios autores reportan respuestas bajas en lechones menores a las 4 semanas de edad (Valpotic y col. 1989, Tuchscherer y col. 2000, Becker y Misfeldt 1993), mientras que Hoskinson y col. (1995) reportan respuestas evidentes en cerdos de 0.5 a 6 semanas de edad. Lo importante, en todos los casos, es que fueron capaces de obtener una respuesta, esto indica que cerdos de menos de 20 días de edad poseen la capacidad de responder a la estimulación, lo cual coincide con los resultados reportados en este trabajo.

Al observar los resultados obtenidos a la estimulación de linfocitos de lechones con Con A, a los 60 días de edad, la curva parece mantener aún la tendencia ascendente. Mientras que el punto máximo de la curva en PWM está en los 45 días de edad y para LPS no existe una gran diferencia entre la respuesta obtenida a los 45 y a los 60 días, lo cual nos dice que la maduración de los linfocitos periféricos no parece alcanzarse totalmente sino más allá de los 45 días de edad, tal y como lo señalan Borghetti y col. (2006).

Adicionalmente se decidió trabajar con un anticuerpo anti-CD3 de porcino que al igual que Con A es específico de linfocitos T. De la misma manera que con los otros mitogenos se realizó una prueba de estandarización para determinar la concentración del anticuerpo con la cual se obtiene la mejor respuesta, de acuerdo con los resultados obtenidos se determinó utilizar el anticuerpo anti-CD3 a la concentración de 50 µg/ml.

Los resultados obtenidos con la estimulación del anticuerpo anti-CD3 muestran una tendencia ascendente. Sin embargo, los valores obtenidos en los diferentes grupos de edad,

mostraron una diferencia muy pequeña. Esto puede ser atribuido a la ausencia de moléculas coestimuladoras adicionales al receptor de las células T (TCR), como son; el ligando de CD40 (CD40L, que se expresa en el linfocito T después de que el TCR ha sido activado por un antígeno), CD28, CD80 y CD86 (Tizard 2004). Así se puede asumir que la respuesta obtenida no tuvo valores superiores debido a que la estimulación fue incompleta por la ausencia de moléculas coestimuladoras.

El MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma) es un compuesto que al ser metabolizado por las células produce un precipitado de formazán, el cual es diluido en Dimetil sulfoxido (DMSO) y cuantificado en un lector de ELISA (Mossman 1983, Maciel y col. 2004). Este método detecta no tanto la proliferación sino la presencia de células vivas, lo cual significa que a mayor número de células vivas se obtendrá una lectura de mayor valor (unidades de absorbancia), lo que, en nuestro trabajo, puede traducirse como un efecto directo de la proliferación de linfocitos. Esta forma de evaluar hace que este método sea poco sensible, sin embargo, se considera un método adecuado y por la facilidad para realizarlo es ampliamente utilizado en ensayos de proliferación de linfocitos (Wu y col. 2004) y de toxicidad (Maciel y col. 2004, Goyarts y col. 2006). Otro método disponible y muy utilizado, es la adición de timidina tritiada, la cual es incorporada al DNA por las células que se están dividiendo, finalmente se mide la radioactividad del cultivo de linfocitos usando un lector de centelleo y los datos son expresados en cuentas por minuto. Si bien este método es más sensible, tiene la desventaja de utilizar una radiación peligrosa para el personal del laboratorio y para el ambiente (Rotter y Oh 1996), por lo que se decidió usar al MTT como método de detección.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se evidencia el hecho de que los lechones al nacer son, por diversas razones, inmunológicamente inmaduros (Tuchscherer y col. 2000, Morein y col. 2002). Adicionalmente, se muestra la relación que existe entre la edad de los animales y la capacidad de respuesta, ya que ésta aumenta con la edad, alcanzando su nivel máximo después de los 45 días de edad, tal y como lo señalan algunos autores (Vega-López y col. 1995, Borghetti y col. 2006), a diferencia de los 30 días marcados en otros artículos (Chu RM y col. 1979, McCauley y Hartman 1984).

CONCLUSIONES

- La respuesta obtenida a Con A fue evidente y con mas fuerte tendencia ascendente, mientras que LPS fue el mitogeno que indujo la respuesta más baja en todos los grupos de edad evaluados.
- Para Con A, LPS y el anticuerpo anti-CD3 la mayor respuesta ocurre en cerdos de 60 días de edad, mientras que para PWM ocurre a los 45 días de edad.
- LPS no fue capaz de inducir respuesta en los cerdos del grupo I, de tal manera que la respuesta al estímulo se presentó hasta los 15 días de edad.
- Para Con A la capacidad de proliferación aumentó 4.6 veces, para PWM aumentó 3.9 veces, para LPS aumentó 6.7 veces y para el anticuerpo anti-CD3 aumentó 1.7 veces.
- Para todos los mitogenos los lechones del primer grupo (2-5 días de edad) fueron los animales que tuvieron la respuesta más baja.
- La capacidad de respuesta de los linfocitos perifericos del cerdo alcanza su valor máximo hasta después de los 45 días de edad.
- En todos los casos la edad está relacionada con la capacidad de respuesta de los linfocitos periféricos del cerdo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Litchman AH. Inmunología celular y molecular. 5ª edición. México: McGraw Hill-Interamericana, 1999.
- Allende LM, Corell A, Pacheco A, Regueiro JR, Arnaiz-Villena A. Capítulo 07: Receptor de células T. 2003, <http://www.inmunologiaonline.com/>
- Becker BA, Misfeldt ML. Evaluation of the mitogen-induced proliferation and cell surface differentiation antigens of lymphocytes from pigs 1 to 30 days of age. *Journal of Animal Science* 1993; 71:2073-2078.
- Borghetti P, De Angelis E, Saleri R, Cavalli V, Cacchioli A, Corradi A, Mocchegiani E, Martelli P. Peripheral T lymphocytes changes in neonatal piglets: Relationship with growth hormona (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes. *Vet Immunol Immunopath* 2006; 110:17-25.
- Chu R M, Glock R D, Ross R F, Cox D E. Lymphoid tissues of the small intestine of swine from birth to one month of age. *American Journal of Veterinary Research* 1979; 40:1713-1719.
- Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, editors. Short protocols in immunology. 1st edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.
- Cordero HM. Determinación de linfocitos B y T en órganos linfoides de cerdos recién nacidos. 2004 Tesis de Licenciatura, FES Cuautitlán, UNAM.
- Goyarts T, Dänicke S, Tiemann U, Rothkötter HJ. Effect of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes. *Toxicology in vitro* 2006; 20:858-867.
- Hoskinson CD, Chew BP, Wong TS. Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in the piglet. *J Anim Sci* 1990; 68:2471-2478.
- Maciel EVM, Araújo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes YM, Coelho LCB, Correia MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 2004; 32: 57-60.

- Marshall-Clarke S, Owen G, Tasker L. Ligation of CD40 with soluble CD40 ligand reverses anti-immunoglobulin-mediated negative signalling in murine B Lymphoma cell lines but not in immature B cells from neonatal mice. *Immunology* 1996; 87:624-632.
- McCauley I, Hartmann P E. Changes in piglet leucocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. *Research in Veterinary Science* 1984; 37:234-241.
- Morein B, Abusugra I, Blomqvist G. Immunity in neonates. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87:207-213.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983 65: 55-63.
- Murgita RA, Wigzell H. Regulation of immune functions in the fetus and newborn. *Progress in Allergy* 1981; 29:54-133.
- Morilla GA. *Inmunología Veterinaria*, Editorial Diana, México D.F., 1989.
- Norvell A, Mandik L, Monroe JG. Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *Journal of Immunology* 1995; 154:4404-4413.
- Roth JA. The immune system. En; Straw BE, D'Allaire DS, Mengeling WL, Taylor BJ (eds.) *Diseases of swine*. 8th edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1999.
- Rotter BA, Oh YN. MTS/PMS colorimetric assay is unsuitable for measuring mitogenic responses in porcine blood lymphocytes. *J Immunol Methods* 1996; 199: 205-209.
- Straw E B, D'Allaire S *Enfermedades del cerdo*. 8^a edición, Editorial Intermédica, Buenos Aires, Argentina, 2000.
- Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. 6^a edición. México: McGraw-Hill Interamericana. Healthcare Group, 2002.
- Tizard I. *immunology: An Introduction*, 7^a edition, Elsevier Philadelphia, USA, 2004.
- Tuchscherer M, Puppe B, Tuchscherer A, Tiemann U. Early identification of neonates at risk: traits of newborn piglets with respect to survival. *Elsevier Science* 2000; 54: 371-388.
- Valpotic I, Gerencer M, Basic I. In vitro modulating effects of porcine immunoglobulin G on mitogen-induced lymphocyte response in precolostral, suckling and weaned piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 22:113-122.

- Vega Lopez M A, Bailey M, Telemo E, Stokes C R. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1995; 44:319-327.
- Whary MT, Zarkower A, Confer FL, Ferguson FG. Age-related differences in subset composition and activation responses of intestinal intraepithelial and mesenteric lymph node lymphocytes from neonatal swine. *Cellular Immunology* 1995; 163:215-221.
- Wilson MR. Immunologic development of the neonatal pig. *Journal of Animal Science* 1974 38:1018-1021.
- Wu M, Gao R, Meng M, Li J, Tan M, Shen Y, Wang L, Yin X, Wu X, Xie H. Regulating effects of porcine interleukin-6 gene and CpG motifs on immune responses to porcine trivalent vaccines in mice. *Res Vet Sci* 2004; 77:49-57.
- Zhang Y, Liu J, Jia W, Zhao A, Li T. Distinct immunosuppressive effect by *Isodon serra* extracts. *International Immunopharmacology* 2005; 5:1957-1965.