



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL**

***“EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN DEL PERFIL INMUNOLÓGICO  
EN POTROS PURA SANGRE INGLÉS DEL NACIMIENTO HASTA  
DOS MESES POST-DESTETE”***

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**ELIZABETH MIRANDA HERNÁNDEZ**

**TUTOR:**

**DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. JORGE REYES ESPARZA**

**DR. ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ**



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.

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS: De nuevo gracias, por tu gran generosidad, por permitir que siga realizándome profesionalmente en el área que me gusta, a través de la especie equina. Sé, que siempre estuviste conmigo, en cada día y en cada momento de éste proceso, pero, sobre todo, en cada logro conseguido para avanzar y concluir ésta etapa de mi vida.

Al Dr. Andrés: Por aceptar ser mi tutor, por involucrarse en mi formación personal y académica; y, por todas sus aportaciones, ya que, fueron las herramientas fundamentales para poder realizar esta tesis.

Al Dr. Reyes y Dr. Sahagún: Agradezco infinitamente sus observaciones y sugerencias que resultaban de cada consulta o entrevista que realizaba con ustedes, en beneficio de éste proyecto. Gracias por su tiempo y atenciones.

A la Dra. Susy: Gracias, por que cuando la buscaba y estaba en sus manos ayudarme, recibía su apoyo, y finalmente, por sus valiosas opiniones al ser parte de mi jurado.

Al Dr. Estrada: Por el apoyo recibido de su parte, y, a las personas de su equipo de trabajo que colaboraron conmigo de alguna forma u otra para obtener resultados en el proceso del proyecto.

M.V.Z. Sergio Hayen: Por concederme un voto de confianza al consentir que hiciera uso de los caballos que están bajo su responsabilidad, permitir una estancia que se ajustó a mis necesidades en el Rancho Sayavedra, y, la entrada al Centro Ecuestre Santin; dando indicaciones para poder recibir el apoyo de los médicos, estudiantes y caballerangos que trabajan con usted; a cada uno de ellos les doy las gracias por su valiosa colaboración, en especial a Oyuki y Villa.

M.V.Z. Cert. Ana Ma. Ríos Mena: Gracias, por mantener su confianza en mí, por ser mi maestra, guía y consejera desde que inicié mi estancia en el módulo de equinos; sus enseñanzas son únicas e invaluable en el desarrollo de mi vida profesional y personal.

Compañeros y amigos del laboratorio 8: Agradezco inmensamente su apoyo, su paciencia y su disposición para ayudarme y enseñarme todo lo verdaderamente útil y necesario, para llevar a cabo éste trabajo. Gracias: Eric, Omar, Ana, Ernest, Sandra y Fer.

A mis padres y hermanos: Les agradezco, simplemente su presencia, ya que, el ser parte de ésta familia me da la seguridad y confianza que a veces necesitó para tomar ciertas decisiones.

A ti, Oswaldo: Gracias, porque en el tiempo que llevamos como pareja siempre has estado a mi lado, por tu amor y quererme tanto, por tu protección, por ser tú, porque con tus actos me animas a seguir creciendo en todos los aspectos. Deseo que en ese camino estés junto a mí, y alcanzar las metas que nos hemos propuesto.

A los caballos: A ellos, que por su anatomía, resistencia, nobleza y valor, han sido elegidos desde hace miles de años por el ser humano para trascender junto a él, en la historia de la humanidad. Y, que aún en la actualidad, con toda la tecnología existente, no deja de ser importante entre el hombre; ya que, para algunas personas aporta estatus social y para otras, las más humildes, el medio vital para obtener alimento.

A l módulo de equinos, al proyecto CIDTSE, a la FES-C, por ser la UNAM: conformando la "Máxima casa de estudios".

A todas las personas que participaron y me apoyaron de alguna forma u otra durante la realización de ésta trabajo.

PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO SE CONTÓ CON EL APOYO DE:

- ❖ Módulo de equinos del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM, Campo 4. Responsable: MVZ Cert. Ana Ma. Ríos Mena
- ❖ Proyecto Centro de Investigación, Docencia y Tecnología para la Salud Equina (CIDTSE), Módulo de Equinos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM, Campo 4. Coordinadora: MVZ Cert. Ana Ma. Ríos Mena
- ❖ Laboratorio de Biología Molecular, L – 8, Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM, Campo 1. Responsable: Dr. Andrés Romero Rojas
- ❖ Rancho Sayavedra, Boulevard Condado Sayavedra 138, Fraccionamiento Condado Sayavedra, Atizapán Zaragoza, Edo. de México. C.P. 52938. Responsable: MVZ Sergio Hayen
- ❖ Centro Internacional Ecuestre Santin, Av. Miguel Alemán No. 2, Cont. Boulevard Aeropuerto, Col. Sauces, Toluca, Edo. de México, C.P. 01250. Responsable: MVZ Sergio Hayen
- ❖ Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del instituto Politécnico Nacional (IPN). Responsable: Dr. Sergio Estrada Parra
- ❖ Laboratorio de Citometría de Flujo, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV). Responsable: M. en C. Víctor Rosales García

EL PROYECTO FUE FINANCIADO CON:

- ❖ BECA CONACyT, NO. 200400
  
- ❖ Proyecto "FACTOR DE TRANSFERENCIA" del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Responsable: Dr. Sergio Estrada Parra
  
- ❖ Cátedra "ESTUDIOS DE INMUNOFARMACOLOGÍA E INMUNOTOXICOLOGÍA", Laboratorio de Biología Molecular, L – 8, Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM, Campo 1. Responsable: Dr. Andrés Romero Rojas

## ÍNDICE GENERAL

Resumen .....	1
1 Introducción .....	2
1.1 Caballos Pura Sangre Inglés .....	3
1.1.1 Historia y Origen .....	3
1.1.2 Características de la raza .....	3
1.2 Inmunología del Feto Equino .....	4
1.2.1 Inmunoglobulinas .....	4
1.2.2 Linfocitos .....	4
1.2.3 Citocinas .....	4
1.3 Calostro .....	5
1.3.1 Producción y Componentes .....	5
1.3.2 Importancia Clínica .....	6
1.4 Sistema Inmune del Neonato Equino .....	8
1.4.1 Inmunidad Innata .....	8
1.4.1.1 Fagocitos .....	9
1.4.1.2 Sistema del Complemento .....	10
1.4.1.3 Células Asesinas Naturales (NK) .....	10
1.4.2 Inmunidad Adaptativa .....	10
1.4.2.1 Inmunidad Humoral .....	11

1.4.2.1.1	Inmunoglobulinas .....	11
1.4.2.2	Inmunidad Celular .....	13
1.4.2.2.1	Linfocitos T .....	13
1.4.2.2.2	Linfocitos B .....	14
1.4.3	Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) .....	15
1.4.3.1	Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase-I (MHC-I) .....	15
1.4.3.2	Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase-II (MHC-II) .....	15
1.4.4	Citocinas .....	16
1.5	Pruebas de Funcionalidad Celular .....	17
1.5.1	Fagocitosis .....	17
1.5.2	Estallido Respiratorio .....	17
1.6	Determinación de Subpoblaciones Linfocitarias a través de Expresión de Moléculas de Superficie .....	18
1.7	Ensayo de Inmunoadsorbencia Ligada a Enzimas (ELISA) .....	18
1.8	Citometría de Flujo .....	19
1.9	Justificación .....	20
1.10	Hipótesis .....	20
2	Objetivos .....	21
2.1	Objetivo General .....	21
2.2	Objetivos Particulares .....	21
3	Materiales y Métodos .....	22
3.1	Sujetos de Estudio .....	22



3.2	Sujetos de Referencia .....	22
3.3	Número de Animales Totales .....	22
3.4	Criterio de Inclusión .....	22
3.4.1	Potros Neonatales .....	22
3.4.2	Yeguas Madre y Yeguas No Gestantes .....	22
3.4.3	Evaluación clínica del potro .....	23
3.5	Diseño Experimental .....	24
3.6	Colección de Muestras .....	25
3.7	Conteo Leucocitario Total y Diferencial .....	25
3.8	Determinación de Proteínas Plasmáticas Totales .....	25
3.9	Fagocitosis y Estallido Respiratorio .....	26
3.9.1	Cultivo y Tinción de Staphylococcus Aureus (Sapi) .....	26
3.9.2	Fagocitosis y Estallido Respiratorio: Pruebas Simultáneas .....	26
3.10	Determinación de Subpoblaciones Linfocitarias .....	27
3.11	Cuantificación de Inmunoglobulinas por ELISA .....	27
4	Resultados .....	28
4.1	Parámetros Hematológicos .....	28
4.2	Fagocitosis y Estallido Respiratorio .....	29
4.3	Determinación de Subpoblaciones Linfocitarias .....	31
4.4	Cuantificación de Inmunoglobulinas .....	42
5	Discusión .....	45

5.1	Fagocitosis y Estallido Respiratorio .....	45
5.2	Determinación de Subpoblaciones Linfocitarias .....	46
5.3	Cuantificación de Inmunoglobulinas .....	50
6	Conclusiones .....	53
7	Anexos .....	55
7.1	Colección de Muestras .....	55
7.2	Parámetros Hemáticos .....	56
7.3	Rancho Sayavedra .....	61
7.3.1	Manejo de la Medicina Preventiva .....	61
7.3.1.1	Desparasitación .....	61
7.3.1.2	Vacunación .....	61
7.3.2	Manejo Zootécnico .....	61
7.3.2.1	Alimentación .....	61
7.3.2.2	Ubicación .....	62
7.3.2.3	Parto .....	62
8.	Bibliografía .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo.....	24
Figura 2. Histogramas y gráficas de dot plot representativos de fagocitosis y estallido respiratorio de cuatro individuos: yegua madre, yegua no gestante, potro recién nacido y potro de ocho meses de edad...	29
Figura 3. Porcentajes de células en sangre periférica con actividad fagocitaria y estallido respiratorio, de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	30
Figura 4. Histogramas y gráficas de dot plot representativos de subpoblaciones linfocitarias en un adulto (yegua madre).....	31
Figura 5a. Histogramas y gráficas de dot plot representativos de un potro recién nacido y uno de ocho meses de edad.....	32
Figura 5b. Histogramas y gráficas de dot plot representativos de un potro recién nacido y uno de ocho meses de edad.....	33
Figura 6. Porcentaje de linfocitos CD2+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	34
Figura 7. Porcentaje de linfocitos CD4+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	35
Figura 8. Porcentaje de linfocitos CD5+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	36
Figura 9. Porcentaje de linfocitos CD8+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	37
Figura 10. Porcentaje de linfocitos CD172+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	38
Figura 11. Porcentaje de linfocitos IgM+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	39
Figura 12. Porcentaje de linfocitos MHC-I+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	40

Figura 13. Porcentaje de linfocitos MHC-II+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad.....	41
Figura 14. Concentración de IgA en suero de potros y yeguas adultas, y, concentración de IgA contenida en calostro.....	42
Figura 15. Concentración de IgM en suero de potros y yeguas adultas, y, concentración de IgM contenida en calostro.....	43
Figura 16. Concentración de IgGb en suero de potros y yeguas adultas, y, concentración de IgGb contenida en calostro.....	44
Figura 17. Cuentas leucocitarias totales y concentración de proteínas plasmáticas totales (PPT) de 16 Yeguas Control Adulto: 10 Yeguas Madres y 6 Yeguas No Gestantes.....	56
Figura 18. Cuentas leucocitarias diferenciales de 16 Yeguas Control Adulto: 10 Yeguas Madres y 6 Yeguas No Gestantes.....	57
Figura 19. Conteo Leucocitario Total de 10 potros, del nacimiento hasta los 240 días de edad.....	59
Figura 20. Concentraciones de Proteínas Plasmáticas Totales de 10 potros, del nacimiento hasta los 240 días de edad.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de fagocitos con actividad fagocitaria y estallido respiratorio de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	30
Tabla 2. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD2+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	34
Tabla 3. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD4+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	35
Tabla 4. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD5+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	36
Tabla 5. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD8+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	37
Tabla 6. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD172+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	38
Tabla 7. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos IgM+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	39

Tabla 8. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos MHC-I+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	40
Tabla 9. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos MHC-II+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).....	41
Tabla 10. Medias, desviación estándar y medianas de las concentraciones de IgA en suero (mg/dl) de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6); así como, de IgA contenida en calostro.....	42
Tabla 11. Medias, desviación estándar y medianas de las concentraciones de IgM en suero (mg/dl) de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6); así como, de IgM contenida en calostro.....	43
Tabla 12. Medias, desviación estándar y medianas de las concentraciones de IgGb en suero (mg/dl) de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6); así como, de IgGb contenida en calostro.....	44
Tabla 13. Calendario de Muestreo en Potros.....	55
Tabla 14. Datos y Colección de Muestras de las Yeguas Madre.....	55
Tabla 15. Resultados de las Cuentas Leucocitarias Totales y de las Proteínas Plasmáticas Totales: Yeguas Madre Y Yeguas No Gestantes* .....	56
Tabla 16. Resultados de las cuentas leucocitarias diferenciales: Yeguas Madre Y Yeguas No Gestantes.....	57
Tabla 17a. Resultados de las cuenta leucocitarias totales y proteínas plasmáticas totales en 10 potros durante los primeros ocho meses de vida.....	58

Tabla 17b. Continuación de los resultados de las cuenta leucocitarias totales y proteínas plasmáticas totales en 10 potros durante los primeros ocho meses de vida.....	58
Tabla 18a. Resultados de las cuentas leucocitarias diferenciales de 10 potros en los primeros ocho meses de vida, desde su nacimiento.....	60
Tabla 18b. Resultados de las cuentas leucocitarias diferenciales de 10 potros en los primeros ocho meses de vida, desde su nacimiento.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

FTP = Falla de Transferencia Pasiva  
PSI = Pura Sangre Inglés  
IgM = Inmunoglobulina M  
IgG = Inmunoglobulina G  
IgA = Inmunoglobulina A  
IgE = Inmunoglobulina E  
IGF-II = Factor de Crecimiento Tipo Insulina II  
TGF- $\beta$ I = Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ I  
TNF- $\alpha$  = Factor de Necrosis Tumoral  
IL = Interleucina  
CD = Cluster de Diferenciación  
C3 = Complemento 3  
C4 = Complemento 4  
PRP = Péptido Rico en Prolina  
NK = Células Asesinas  
PBMC = Células Mononucleares Sanguíneas Periféricas  
LAK = Linfocinas Activadoras de Células Asesinas  
MHC-I = Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase-I  
MHC-II = Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase-II  
CPA = Células Presentadoras de Antígeno  
CDs = Células Dendríticas  
Tc2 = Linfocitos T Cooperadores 2  
Tc1 = Linfocitos T Cooperadores 1  
PHA = Fitohemaglutinina  
ConA = Concanavalina A  
IFN = Interferón  
DHR = Dihidrorhodamina  
RHO = Rhodamina  
ELISA = Ensayo de Inmunoadsorbencia Ligada a Enzimas  
*Sa* = *Staphylococcus aureus*  
HBSS = Solución Salina Balanceada de Hanks  
PBS = Solución Salina de Fosfatos  
PI = Ioduro de Propidio  
ANOVA = Análisis de Varianza  
PPT = Proteínas Plasmáticas Totales



## Resumen

Las grandes pérdidas económicas en la industria equina debidas a la alta mortalidad y morbilidad en equinos neonatos con inmunodeficiencia por falla de transferencia pasiva, han despertado gran interés por comprender mejor el sistema inmune del equino.

Los potros al nacer son inmunocompetentes, sin embargo, son altamente susceptibles a infecciones si se les priva de calostro, pues dependen de los anticuerpos para protegerse de manera inmediata de los patógenos. La maduración del sistema inmune va ocurriendo durante el período neonatal; sin embargo, en potros poco se sabe de los mecanismos de éste proceso de maduración. Este estudio, describe el comportamiento inmunológico de una población de 10 potros, asumiendo como control adulto a las 10 madres y 6 yeguas no gestantes ni en período de lactación.

Los objetivos consistieron en evaluar la actividad fagocitaria y estallido respiratorio en células fagocíticas, determinar la frecuencia de subpoblaciones linfocitarias a través de sus marcadores de superficie y las concentraciones de inmunoglobulinas séricas en potros recién nacidos y durante los primeros ocho meses de vida. Por citometría de flujo, se observó que, la capacidad de fagocitosis y del estallido respiratorio con *Staphylococcus aureus* estuvo presente desde el nacimiento, pero menor que la evaluada en adultos, hasta el cuarto mes de vida en que se alcanzaron los niveles maduros. De la misma manera, se analizaron las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica, obteniendo resultados que variaron con el desarrollo de los potros; ésta variación con la edad, también fue observada en los niveles de inmunoglobulinas, con el aumento de las concentraciones séricas de IgA, IgM e IgG4.

## 2 Introducción

El interés por el bienestar del caballo, desde la creación de la disciplina veterinaria, perdura hasta estos días, los adelantos científicos permiten la investigación en salud equina, además los caballos pueden actuar como modelos biológicos únicos de la respuesta inmune a enfermedades infecciosas, consecuentemente existe gran interés por desarrollar protocolos de investigación en esta especie.

Actualmente la inmunología equina es un campo de estudio activo e importante, la investigación para obtener conocimiento de los mecanismos inmunológicos permite el control de algunas enfermedades comunes y condiciones inmunopatológicas de interés. En potros, los procesos infecciosos son las causas principales de mortalidad y morbilidad neonatal; representando grandes pérdidas económicas en la industria equina (1). Los potros al nacimiento son inmunológicamente activos, pero, su función inmune humoral y celular es débil. El desorden inmunológico más común, clasificado como inmunodeficiencia secundaria es la "Falla de Transferencia Pasiva (FTP)" caracterizada por hipogammaglobulinemia que les mantienen en alto riesgo de sepsis (2); el potro, depende completamente de anticuerpos adquiridos pasivamente en el calostro materno para protección en los primeros meses de vida. Poco se sabe del proceso de maduración de su sistema inmune, que parece comprometerse al nacimiento en consecuencia de condiciones ambientales o extrínsecas (3); por lo anterior, el objetivo de este estudio es caracterizar la inmunidad en potros al nacimiento, desarrollo y 8 meses pos-destete en condiciones de criadero.

## 2.1 Caballos Pura Sangre Inglés (PSI)

### 2.1.1 Historia y Origen

El caballo Pura Sangre Inglés (PSI) desciende de tres sementales árabes: Darley Arabian, Godolphin Arabian y Byerly Turk.

El primer Stud Book se publicó en 1791, por James Weatherby, tras amplia investigación catalogó 387 yeguas, descendientes de los tres sementales árabes. Todo caballo o yegua requiere para ser admitido tener entre 8 ó 9 corrientes de sangre pura, remontadas en el pasado al menos un siglo y además descender de antepasados con presencia destacada en pruebas públicas (4, 5).

### 2.1.2 Características de la Raza

Los caballos PSI corporalmente están adaptados para correr largas distancias a gran velocidad; su alzada es algo mayor de 1.63 m, cabeza fina, cuello largo y delgado, cruz elevada, espaldas profundas, bien musculadas e inclinadas, patas largas y musculosas. Es capaz de recorrer 6 metros de un tranco, alcanza velocidades de hasta 60 km por hora; y sus movimientos son suaves y rítmicos.

Capas comunes: colorados, alazanes y prietos, son frecuentes las marcas blancas en cara (estrella, cordón, etc.), y la mayoría suelen ser calzados (6, 7).

## 2.2 Inmunología del Feto Equino

### 2.2.1 Inmunoglobulinas

En el feto equino inicia la producción de IgM e IgG1, durante el desarrollo intrauterino, estudios demuestran su producción en suero de fetos mayores de 185 días; lo que sugiere, inmunocompetencia al nacimiento. La concentración de IgM en suero de potros antes de amamantar es de 16 mg/dl, aproximadamente; mientras que la de IgG es de 0.2 a 17 mg/dl, éste bajo nivel, refleja probablemente el bajo grado de estimulación antigénica en útero (8, 9, 10).

### 2.2.2 Linfocitos

El timo del feto equino es el primer órgano linfoide en desarrollarse; los linfocitos T están presentes en la organización tímica corticomedular al día 80 de gestación, en sangre periférica por el día 120 y proliferan en respuesta a mitógenos al día 140.

En el bazo fetal están presentes capas linfocíticas periarteriolares bien pobladas, centros germinales bien desarrollados y respuesta significativa a mitógenos al día 200; los nódulos linfáticos periféricos y la lámina propia intestinal tienen Linfocitos B alrededor del día 90, y se detecta respuesta a mitógenos en el nódulo linfático mesentérico desde el día 200. En general, diversos estudios indican presencia de Linfocitos T y Linfocitos B funcionales al día 100 y 200 de gestación, respectivamente (8, 10).

### 2.2.3 Citocinas

Las citocinas juegan un papel importante en el sistema inmune equino, durante la gestación de la yegua se han identificado hormonas, enzimas, células inmunes y otros factores, como: el factor de crecimiento tipo insulina-II (IGF-II), el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-4 e IL-10, prostaglandina E2 y progesterona producida por placenta, etc. Cada una de éstas tiene una función y comprenden interacciones feto-maternas específicas de especie, fundamentalmente participan en: mantener el cuerpo lúteo, invasión del trofoblasto,

adhesión, implantación, diferenciación, crecimiento de la unidad placentofetal, y mecanismos inmunomodulatorios con el fin de evitar el rechazo inmunológico del feto (11, 12, 13).

## 2.3 Calostro

### 2.3.1 Producción y Componentes

El calostro es un fluido rico en nutrientes que producen las hembras gestantes y lo secretan después del parto, contiene factores inmunes, de crecimiento y reparación de tejidos. Las yeguas pueden producir entre 1.8 – 2.8 litros de calostro, durante las últimas dos o tres semanas de gestación, bajo influencia de estrógenos y progesterona.

El calostro contiene componentes solubles y celulares que juegan un papel importante en la inmunidad neonatal y madurez intestinal; los solubles incluyen, entre otros: inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, citocinas, lactoferrina, CD14, enzimas y cantidades significativas de elementos del complemento como C3, C4, lisozimas e interferón; y los componentes celulares son: linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células plasmáticas y epiteliales (10, 14).

Las inmunoglobulinas contenidas en el calostro son transferidas de la sangre de la yegua a través de receptores selectivos Fc $\gamma$ R presentes en la superficie de células epiteliales de la glándula mamaria; aunque en 1989, Kohn sugería producción local al no encontrar correlación en la concentración de inmunoglobulinas entre suero y calostro de las yeguas; Curadi en 2001 determina que existe correlación significativa entre las concentraciones de IgG calostrales e IgG sérica de la yegua (10).

La inmunoglobulina predominante es IgG, con menores cantidades de IgA e IgM; y es la IgGb (IgG4) la subclase de mayor presencia de las IgG, seguida por IgGa (IgG1) e IgG (T) (IgG3). La concentración de IgA disminuye rápidamente en las primeras ocho horas después del parto y apenas es detectable en 12 – 24 horas cuando la yegua es activamente succionada (9). También, se

demonstró que cantidades detectables de anticuerpos IgE maternos son transferidos inmediatamente por esta vía al recién nacido (15).

Al calostro se le considera inmunoestimulante y protector de amplio espectro contra bacterias y virus. La lactoferrina e IgG son las principales proteínas glicosiladas en preparaciones séricas de calostro. En 1993 se descubrió un péptido inmunomodulatorio en el calostro, conocido como polipéptido rico en prolina o PRP; éste, estimula timocitos inmaduros para convertirse en células T funcionalmente activas (14).

### 2.3.2 Importancia Clínica

El valor biológico del calostro, es asegurar la protección pasiva por medio de inmunoglobulinas y células inmunocompetentes que contiene (16), puesto que la transferencia de inmunoglobulinas maternas a feto equino no ocurre durante la gestación, por el tipo de placentación "epiteliocorial difusa", la cual es impermeable a macromoléculas, lo que explica la carencia de inmunoglobulinas en el potro antes de tomar calostro y en consecuencia la deficiente capacidad de protegerse contra patógenos ambientales al nacer (17, 18, 19).

Debido a que el potro recién nacido es incapaz de montar una respuesta anamnésica rápida (4); es necesaria la absorción de distintas clases y subclases de inmunoglobulinas calostrales a través de líneas celulares especializadas del intestino delgado, durante las primeras 18-24 horas después del nacimiento, pues pasado este momento ya no es posible su absorción; la IgG otorga inmunidad pasiva de 4 semanas que disminuye al quinto – sexto mes de edad (19, 20).

Cuando el potro consume calostro durante las primeras dos horas de vida, se registran IgG's séricas entre 12 y 18 horas después del nacimiento, con valores de 8 a 21 g/l; la absorción de macromoléculas tiene un pico muy corto después de nacer y disminuye rápidamente con una eficiencia aproximada del 22 % a las 3 horas y menor de 1% a 20 horas; sin embargo, los anticuerpos pasivamente obtenidos sufren degradación catabólica; este descenso natural se compensa por producción temprana de anticuerpos propios, como resultado a la respuesta de estímulos antigénicos ambientales (11, 21).

La privación de calostro ocasiona falla parcial o total de transferencia pasiva (FPT) de inmunoglobulinas, desorden reconocido como inmunodeficiencia; con una incidencia estimada de entre 2.9 y 25 %, aproximadamente en potros en Texas (1). De acuerdo a la concentración sérica de IgG's (mg/dl) transferidas al potro la transferencia pasiva se clasifica en:

- Transferencia pasiva adecuada:  $\geq 800$  mg/dl
- Falla de transferencia pasiva parcial: 200 - 400 mg/dl
- Falla de transferencia pasiva total:  $< 200$  mg/dl

(22).

Un estudio que compara frecuencias de infecciones neonatales con niveles de IgG en poblaciones de potros; señala que la incidencia de infección y muerte es significativamente más alta en potros con niveles de IgG séricos menores de 400 mg/dl (1). Por lo que, se consideran 400 mg/dl como nivel mínimo para proteger al potro de infecciones; sin embargo, también hay otros factores que claramente tienen influencia en el desarrollo de una infección, como: tipo de manejo, condiciones ambientales, virulencia del patógeno, continuo estrés y especificidad del anticuerpo. Bajas concentraciones de Ig's séricas en FPT predispone a problemas en potros menores de 2 semanas de edad (23); tal desorden, induce comúnmente a sepsis en las primeras cuatro semanas de vida, si no se detecta y trata oportunamente (19).

## 2.4 Sistema Inmune del Neonato Equino

Los potros están expuestos a microorganismos inmediatamente después del nacimiento, ante los cuales su sistema inmune no es capaz de responder adecuadamente, poco se conoce sobre su proceso de maduración; y los factores que contribuyen a la aparente susceptibilidad relacionada con la edad, no están bien definidos; sólo es capaz, de reaccionar a la estimulación antigénica con una respuesta inmune moderada y una formación limitada de anticuerpos (21, 24).

La causa principal de morbilidad y mortalidad en potros recién nacidos es la sepsis; en una revisión de estudios, que realizó Gigeré en el 2005, se documenta que existe estudios una correlación positiva entre FTP y sepsis; aunque también, los potros con FTP pueden permanecer saludables. En un estudio prospectivo, siete de ocho potros privados de calostro desarrollaron signos clínicos de infección y sepsis, confirmada por cultivos en cinco de éstos. Lo anterior, sugiere que una concentración baja de inmunoglobulinas, manejo inadecuado, estrés, enfermedades concurrentes y virulencia del patógeno pueden contribuir al desarrollo de sepsis (10).

Entender mejor el funcionamiento del sistema inmune de los potros es crucial, para comprender la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y proporcionar profilaxis o tratamientos adecuados contra la enfermedad (3).

### 2.4.1 Inmunidad Innata

En potros, la respuesta inmune innata juega un papel importante ante desafíos de patógenos hasta que la reacción inmune específica se produce. El sistema inmune innato se compone de células, factores humorales, y barreras de superficie, es una forma universal de protección del huésped. Se han reportado deficiencias en la inmunidad innata y adaptativa que perjudican las defensas neonatales del potro (12).



### 2.4.1.1 Fagocitos

Los macrófagos de potros, presentan alta capacidad fagocítica y liberación de peróxido de hidrógeno en la segunda semana de vida, que disminuye gradualmente, mostrando deficiencia funcional que predispone a infecciones tempranas en el primer mes; sin embargo, ésta actividad aumenta con la edad y es similar al adulto hasta los 5 meses. La población de macrófagos en lavados broncoalveolares es menor en potros que en adultos; aunque, se sugiere que el número y la maduración no dependen de la edad ya que estas células fueron competentes al nacimiento, con actividad fagocítica y estallido respiratorio similar a los fagocitos de caballos adultos (25, 26).

Los neutrófilos de potros menores de 7 días de edad tienen capacidad microbicida disminuida, en comparación a la de caballos adultos sanos; la actividad de estallido respiratorio es menor entre los 2 a 14 días de edad; adicionalmente, el ejercicio intenso disminuye la fagocitosis y estallido respiratorio; lo que, sugiere que esto contribuye a la alta susceptibilidad a infecciones bacterianas.

Colectivamente los estudios sugieren que las células fagocíticas del potro recién nacido son funcionalmente maduras pero en forma limitada posiblemente debido a la concentración reducida de opsoninas en el suero del potro; y que no difieren de las de los adultos a partir de las tres semanas de vida (10, 27, 28). También, en otras investigaciones se señala que los macrófagos y células dendríticas tienen disminuida la expresión de moléculas co-estimuladoras, pero aumentada la de citocinas inhibitorias como IL10 y TGF  $\beta$ (14, 29).

#### 2.4.1.2 Sistema del Complemento

La actividad del complemento en potros recién nacidos es del 13 %, al 64 % al primer mes de vida y del 85 % al quinto, con referencia a la de los adultos. (10). En un estudio, se observó que la estimulación antigénica postnatal en ausencia de inmunoglobulinas resulta en activación temprana del complemento por vía alterna, confirmando que la maduración de la actividad del complemento en potros neonatales es independiente de ingestión del calostro (30).

#### 2.4.1.3 Células Asesinas Naturales (NK)

Las células asesinas naturales (NK) exhiben la capacidad de lisar células blanco infectadas o transformadas sin exposición previa a antígeno, juegan un papel vital en la respuesta inmune innata, provienen de un progenitor común de linfocitos, pero no expresan receptores de antígeno de células T o inmunoglobulinas de superficie, representan una población pequeña de las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC); en otras especies están bien caracterizadas, mientras que, estudios en equinos son limitados. Estas células ayudan a proveer resistencia a infecciones por patógenos intracelulares como los virus y limitar potencialmente el crecimiento de tumores.

En 1999, Viveiros, identificó células NK en equinos por uso del anticuerpo monoclonal NK-5C6, y, observó que NK's de circulación periférica en caballos sanos tiene similitudes funcionales y fenotípicas a células NK de humanos y roedores. El estudio indica que NKs equinas lisan células negativas a MHC-I, esto, sugiere que su función puede regularse por mecanismos de reconocimiento de MHC-I y por eso pueden expresar potencialmente receptores inhibitorios específicos a MHC-I, como se reportó para NKs humanas y de roedores (31).

#### 2.4.2 Inmunidad Adaptativa

El inicio de la respuesta inmune específica requiere de la inmunidad innata para su inducción. Las células presentadoras de antígenos (CPA) más importantes son las células dendríticas (CDs), pero en el recién nacido tiene reducida su capacidad para expresar CD86 yCD40, y de igual modo

los ligandos correspondientes sobre los linfocitos. Estas moléculas de superficie son requeridas en las CPAs para dar señales de co-estimulación a las células T para expandir clonas antígeno-específicas (13). Sin embargo, aunque se sabe que la falla de transferencia pasiva de anticuerpos maternos influye en la inmunocompetencia neonatal, la dinámica de respuesta mediada por células T en potros permanece pobremente caracterizada (3).

El estrés mental y físico es un factor que ejerce influencia sobre las funciones inmunes del caballo; por ejemplo, el destete, evento que comprende: separación de la madre y cambio de alimentación; sobre todo, si es realizado de manera abrupta, implica severo estrés fisiológico que altera el comportamiento y disminuye la inmunidad celular del potro (28).

#### 2.4.2.1 Inmunidad Humoral

En el caballo, el principal campo de estudio a nivel inmunológico, habían sido los diversos isotipos y sub-isotipos de inmunoglobulinas, el enfoque es hacia la estructura y diversidad de éstas moléculas; en trabajos previos se investigaron el desarrollo de la inmunidad humoral, en especial, aquellos con enfoque a problemas de vacunación por presencia de anticuerpos maternos (32).

##### 2.4.2.1.1 Inmunoglobulinas

Las concentraciones de inmunoglobulinas séricas en recién nacidos post-lactados y caballos maduros reflejan la dependencia del potro a la transferencia pasiva de inmunoglobulinas maternas a esta edad. Concentraciones de IgG materna en potros tienen vida media aproximada de 18 días para IgG1, 32 días para IgG4 y 21 días IgG3/5 (33); en tanto que, Wilson (2001) reporta 27-29, 35-39 y 35 días, respectivamente (34). La vida media relativamente más larga de IgG4 se asocia a la gran cantidad transferida a través del calostro, y contribuye a la prolongada supresión de síntesis endógena. Las concentraciones de IgG materna son generalmente bajas a los seis meses de edad y las de IgA e IgM disminuyen rápidamente con vida promedio de 3-5 días, no detectables por la 3-4 semana de vida (10, 35).

La síntesis de IgG1, IgG3/5 e IgA endógenas se detectó entre las primeras cinco a ocho semanas de vida, en contraste, la producción endógena de IgG4 apareció con demora; y de 12 semanas a ocho meses de edad su concentración fue menor que los niveles de IgG1, IgG3/5 (9, 21). La concentración de IgG3/5 sérica, fue similar a individuos maduros; mientras que, IgG1 alcanzó concentraciones más altas, aunque ésta bajó gradualmente a los niveles en adultos por el resto del primer año.

Trabajos con potros privados de calostro o empleando calostro bovino, indican que la capacidad de producción de anticuerpos de novo esta presente, lo cual es coherente con inmunosupresión materna no específica observada en potros alimentados con calostro equino de manera normal.

Se ha observado que cuando las madres son menores de 15 años, el 70% de los potros tienen concentraciones de IgG séricas mayores de 800 mg/dl, en tanto que, el 45 % de aquellos con madres mayores de 15 años tuvieron concentraciones menores a los 800 mg/dl; por otra parte, los potros y yeguas de raza Árabe y Pura Sangre Inglés tienen una mayor concentración de IgG sérica e IgG calostrual (36, 37).

En caballos adultos la IgE se detecta en suero y leucocitos sanguíneos periféricos, su concentración total tiene rangos amplios de unos cuantos a cientos de  $\mu\text{g/ml}$ , dependiendo del individuo. Recientemente se detectó la transferencia de IgE materna vía calostrual; por unión de ésta sobre la superficie celular de un porcentaje pequeño de leucocitos sanguíneos periféricos a través de receptores  $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ , las poblaciones celulares IgE+ se componían de: basófilos 32%, monocitos y/o linfocitos grandes 53%, linfocitos pequeños 13% y eosinófilos 2%, aproximadamente.

En potros recién nacidos, antes de tomar calostro no se detectó IgE sérica o IgE unida a leucocitos periféricos, fue detectada entre el 2do y 5to día de edad; se observó que entre el quinto y séptimo mes de edad desaparecen los anticuerpos IgE de origen materno, y que la producción endógena inicia a los 9 – 11 meses de vida (15).

## 2.4.2.2 Inmunidad Celular

En los neonatos, la respuesta inmune celular, que provee defensa efectiva en contra de patógenos intracelulares, es deficiente provocando durante el período neonatal la vulnerabilidad del potro ante patógenos específicos tales como *Rhodococcus equi* y rotavirus (38).

Los potros nacen con conteo adecuado de linfocitos, que aumenta por el tercer mes de edad, principalmente las células CD8+ seguidas de las células B; lo que refleja la exposición a patógenos ambientales. (26).

### 2.4.2.2.1 Linfocitos T

El desarrollo postnatal se acompaña de un aumento en el tamaño del compartimiento de linfocitos y presencia de células primerizas. Un sistema inmune inmaduro implica inmunidad débil ejecutada por linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2); y los neonatos frecuentemente manifiestan vías inapropiadas para respuestas de células Th2 que inducen en células B la producción de IgG1 e IgE, evocando fuerte respuesta de anticuerpos a infecciones parasitarias, bacterias extracelulares y reacciones alérgicas. Las respuestas Th1 se favorecen en presencia de infecciones virales y bacterianas intracelulares, su función es: aumentar la citotoxicidad, reclutar células inflamatorias y producir anticuerpos selectos de clase IgG2, pero su expresión relativamente baja al nacimiento sugiere respuesta Th1 reducida.

Los potros neonatos tienen significativamente pocos linfocitos T expresando complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) sobre su superficie; tal expresión aumenta progresivamente y alcanza niveles de caballos adultos a los cuatro meses de edad; lo que sugiere que hay un desarrollo progresivo de linfocitos T antígeno-activados (3, 10, 39).

A nivel pulmonar los porcentajes de linfocitos aumentan en relación con la edad, excepto macrófagos que presentan porcentaje bajo. Aunque el desarrollo del sistema inmune respiratorio continua, los cambios en sangre periférica, la expansión, activación y migración celular ocurre a paso lento, con susceptibilidad a patógenos previo a la madurez óptima del sistema inmune (26).

Evaluar la inmunidad celular es más complicado en relación a la humoral, porque sólo algunos fenotipificadores de linfocitos que proveen información útil sobre el número y porcentaje de linfocitos T están disponibles comercialmente. Giguere (2005), señala que la única prueba de campo para inmunidad celular en la práctica clínica, es la respuesta a inyección intradérmica de fitohemaglutinina (PHA) que evalúa, respuestas del tipo de hipersensibilidad retardada por parte de linfocitos T. Existen pruebas in vitro que evalúan la función inmune mediada por células, pero requiere de un laboratorio de investigación donde realizarlas, por ejemplo: ensayos de proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos comúnmente empleados tales como concanavalina A (ConA) o PHA (linfocitos T) y lipopolisacáridos (linfocitos B) (10).

Smith (2002), inmunofenotipificó con distintos anticuerpos monoclonales las poblaciones celulares de potros raza Cuarto de Milla, y determinó que la concentración absoluta de los subgrupos de linfocitos y leucocitos totales se incrementan significativamente con la edad; aunque este incremento fue menor que el reportado en estudios previos. (40)

#### 2.4.2.2.2 Linfocitos B

El conteo absoluto y porcentaje de linfocitos B en sangre periférica es más alto en potros que en caballos adultos. Representa menos del 30% de los linfocitos sanguíneos, mientras que, en adultos es entre 10 – 20 % (10).

Las células B neonatales tienen una baja expresión de Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase II; la escasez de CD86 y su ligando sobre células T provoca falta de co-estimulación y entorpece la comunicación cruzada entre células B y T (14).

El porcentaje de células B es más alto en potros de dos a cuatro meses de edad que en caballos adultos; período que coincide con aumento de concentración sérica de IgM e IgG e indica activación de respuesta inmune humoral (26).

## 2.5 Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)

Los linfocitos T reconocen sólo antígenos procesados y presentados como fragmentos peptídicos asociados con moléculas del MHC sobre las superficies celulares. La presentación de antígenos endógenos a los linfocitos T CD8es vía MHC-I; mientras que la de los antígenos exógenos a los linfocitos CD4\_es vía MHC-II. Los linfocitos T CD4 y CD8 constituyen dos subpoblaciones con roles funcionales distintos; por lo que el tipo de respuesta de linfocito T al antígeno depende de la clase de MHC en que se utilice (39).

### 2.5.1 Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase-I (MHC-I)

Las moléculas MHC-I son glicoproteínas que se expresan sobre células nucleadas; son reconocidas por receptores de células T (TCR) sobre linfocitos T CD8+ iniciando una respuesta inmune específica, esto provee vigilancia inmunológica contra patógenos intracelulares. También, regulan la inmunidad innata por ligandos para receptores inhibitorios sobre células asesinas naturales (NK), causando una inhibición de efecto de actividad citolítica mediada por NK. Estudios previos indican presencia de al menos 16 y hasta 33 genes de MHC clase I en el genoma equino; los cuales se localizan en tres grupos: (A) en el extremo BTNL2 de la región de Clase II, (B) en la unión de regiones Clase III y Clase I, y, (C) entre regiones GNL1 y TRIM26 en la Clase I. (39, 41)

### 2.5.2 Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase-II (MHC-II)

La expresión de MHC-II está restringida a células presentadoras de antígenos (CPA), e interactúan sólo con linfocitos CD4+; sin embargo, una característica inusual del MHC-II equino es que se expresa también sobre linfocitos T circulantes. Un estudio demuestra que la falta de expresión de MHC-II sobre linfocitos T de potros de un día de edad puede indicar la ausencia de linfocitos T de memoria en la circulación periférica, esto, en conjunción con la falta de exposición previa a antígenos extraños, aumenta la susceptibilidad del potro a microorganismos patógenos. (39)

## 2.6 Citocinas

En equinos, al igual que en otras especies, se han detectado que la IL-12 promueve selectivamente la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes en células Th1 CD4<sup>+</sup> efectoras; su disminución puede vincularse a deficiencia de IFN $\gamma$  en recién nacidos, pues, junto con IL-23 bajo infección o estimulación directa con productos microbiales inducen producción de IFN $\gamma$  por parte de células NK; igual que, IL-18, conocido como factor inductor de IFN $\gamma$ , (4, 11, 13). Interleucina 4 (IL-4) tiene efectos inmunoregulatorios sobre células B y T, monocitos, dendríticas y endoteliales, e incluyen células no inmunes y fibroblastos (42).

IFN $\alpha$  equino tiene amplia actividad antiviral y también inhibe la proliferación de linfocitos, en tanto que IFN $\gamma$  muestra efectos inmunomodulatorios sobre monocitos y aumenta la expresión de MHC-II (31,36). Recientemente, se demostró que la capacidad de caballos adultos para eliminar infecciones con *R. equi* virulento depende de la producción de IFN $\gamma$  con generación alterna de respuesta de linfocitos T citotóxicos específica a *R. equi* sin restricción de MHC. La deficiencia de IFN $\gamma$  resulta en baja producción de citocinas Th1 por células T CD4<sup>+</sup> vírgenes; aunque, ahora se ha aceptado que bajo condiciones apropiadas de estimulación las células T neonatales pueden producir IFN $\gamma$ . Esto, sugiere que los neonatos son Th1 inmunocompetentes, pero con alto umbral para activar respuestas Th1. Su deficiencia es pronunciada en potros menores de tres meses de edad, lo que puede explicar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (32, 38, 43).



## 2.7 Pruebas de Funcionalidad Celular

### 2.7.1 Fagocitosis

La evaluación in vitro de fagocitosis es útil para evaluar la integridad funcional de los neutrófilos y macrófagos para adherir, ingerir y degradar partículas extrañas, que es el proceso por el cual llevan a cabo su papel protector en un organismo. Los ensayos de fagocitosis por citometría de flujo en equinos, se han usado en algunas investigaciones; pero su aplicación aún es limitada como prueba de diagnóstico clínico para evaluar la respuesta inmune a enfermedades infecciosas o inmunodeficiencias (10, 27, 44, 45, 47, 48, 49).

### 2.7.2 Estallido Respiratorio

El metabolismo oxidativo o estallido respiratorio, es evaluado generalmente como un indicador de muerte dependiente de oxígeno por fagocitos. La actividad de estallido respiratorio puede medirse por la conversión de componentes no fluorescentes como la dihidrorodamina 123 (DHR) a su producto oxidado rodamina123 (RHO) que emite fluorescencia verde; la reacción es provocada tras la formación de oxidantes como peróxido de hidrógeno previa estimulación de granulocitos y monocitos. La DHR pasa libremente a través de las membranas celulares en donde, como RHO tiende a acumularse en la mitocondria (26).

El ensayo por citometría de flujo se determina en base a la medición de reacciones oxidativas intracelulares; el principio básico es que las células sean cargadas con sustancias precursoras no fluorescentes que enseguida oxidan un producto fluorescente por los componentes del estallido respiratorio. En células estimuladas, la fluorescencia emitida por la conversión de DHR a RHO es proporcional al nivel de activación de fagocitos seguida de la ingestión de bacterias opsonizadas y no opsonizadas. (26, 27, 46, 47, 48)

## 2.8 Determinación de Subpoblaciones Linfocitarias a través de Expresión de Moléculas de Superficie

Actualmente se analizan células automáticamente, a detalle y con gran eficacia a través del citómetro de flujo mediante el uso de anticuerpos monoclonales marcados. Smith (2002) y Flaminio (2000) midieron la presencia de cambios de las principales subpoblaciones linfocitarias en potros durante períodos determinados a partir del nacimiento y en ambos proyectos se observó aumento lineal dependiente de la edad. A nivel clínico, éstas técnicas de inmunofluorescencia han sido aplicadas para determinar respuesta a infecciones microbiales y para diferenciar leucemia equina. Ahora un mayor número de anticuerpos de uso específico en equinos son disponibles comercialmente, por ejemplo: EqCD4, EqCD5, EqCD8, entre otros (26, 40, 45, 50).

## 2.9 Ensayos de Inmunoadsorbencia Ligada a Enzimas (ELISA)

Los ensayos cuantitativos de concentración de inmunoglobulinas, son importantes para evaluar la inmunidad humoral; como ya se ha mencionado, la sobrevivencia natural del potro depende completamente de los anticuerpos maternos pasivamente obtenidos del calostro; debido a esto, medir la concentración de Ig's, principalmente IgG, en suero y calostro es necesario para determinar su condición inmune. Por lo anterior, y por el uso de antisueros hiperinmunes equinos en terapias y profilaxis de enfermedades en humanos, el estudio de las inmunoglobulinas equinas había sido el principal enfoque en la investigación del sistema inmune equino. Hoy en día, existen pruebas disponibles comercialmente útiles para determinar rápidamente concentraciones séricas de IgG principalmente; también, se siguen estandarizando ensayos de ELISA para precisar nueva información de las inmunoglobulinas del caballo, como recientemente se hizo con la IgE, en Wagner (2006) (15, 21, 45, 50, 51).

## 2.10 Citometría de Flujo

La citometría de flujo se puede utilizar como método analítico para fenotipificar poblaciones celulares. Requiere de un instrumento especializado (citómetro de flujo) que mide la emisión de fluorescencia, determinando el número y el tipo celular; por la detección de moléculas características en su superficie mediante un anticuerpo específico marcado con un fluorocromo. Esta herramienta ha sido de gran importancia en la investigación biomédica, pues hace posible trabajar con células vivas. En la inmunología equina, ha sido utilizado principalmente para evaluar la actividad fagocitaria y del estallido respiratorio, también para la determinación de subpoblaciones linfocitarias, entre otras aplicaciones (10, 27, 52).

## 2.11 Justificación

El potro al nacer tiene completa dependencia de la transferencia inmunológica que la madre le confiere a través de las inmunoglobulinas y otros componentes presentes en el calostro; por lo que conocer la actividad inmunológica del potro desde su nacimiento al destete y dos meses después de éste, mediante la determinación de cantidad de células del sistema inmune y evaluación de su funcionalidad, favorece el diagnóstico y la elección terapéutica más apropiada de potros con problemas clínicos. También, permite identificar la etapa o etapas de mayor susceptibilidad al observar el momento en que empieza a declinar la inmunidad calostrada para establecer calendarios de vacunación y otras líneas de investigación que proporcionen alternativas de tratamiento o prevención.

## 2.12 Hipótesis

Si los potros sufren de respuesta inmunológica baja al nacimiento, que los hace completamente dependientes de la inmunidad pasiva, transferida por la madre a través de la ingestión de calostro en las primeras doce horas de nacido; entonces; su comportamiento inmunológico en los primeros ocho meses de vida, presentará una respuesta inmune deficiente y detectable en la concentración de inmunoglobulinas así como en el número y funcionalidad de las células del sistema inmune.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar si existen variaciones en el sistema inmune de los potros, a través de un perfil inmunológico; para identificar posibles etapas de susceptibilidad.

#### 3.2 Objetivos Particulares

- Evaluar la actividad fagocítica y estallido respiratorio en fagocitos sanguíneos provenientes de potros durante los primeros ocho meses de vida.
- Determinar la frecuencia de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica obtenida de potros recién nacidos por un período de ocho meses.
- Cuantificar inmunoglobulinas séricas: IgG4, IgM e IgA de muestras sanguíneas colectadas de potros por los primeros ocho meses de vida.
- Cuantificar inmunoglobulinas: IgG4, IgM e IgA de calostro.

## 4 Materiales y Métodos

### 4.1 Sujetos de Estudio

- 10 Potros neonatales

### 4.2 Sujetos de Referencia

- 10 Yeguas madres
- 6 Yeguas no gestantes

### 4.3 Número de Animales Totales

▪ Potros	10
▪ Yeguas madres	10
▪ Yeguas no gestantes	<u>6</u>
	26

### 4.4 Criterio de Inclusión

#### 4.4.1 Potros neonatales:

- Raza Pura Sangre Inglés
- Recién nacidos clínicamente sanos

#### 4.4.2 Yeguas madres y yeguas no gestantes:

- Raza Pura Sangre Inglés
- Sanas, de 5 – 15 años de edad
- Yeguas madres: que no presenten problemas durante el parto

#### 4.4.3 Evaluación clínica del potro:

- Examen físico al nacimiento, que contempla:

Frecuencia cardiaca	80 – 120 latidos / minuto
Frecuencia respiratoria	40 - 80 respiraciones / minuto
Color de mucosas	Rosas
Tiempo de llenado capilar	2 – 3 segundos
Temperatura	37.5 - 38.8 ° C

- Comportamiento neonatal normal, es decir: capacidad de levantarse, ingerir calostro y arrojar meconio, en parámetros marcados por la literatura. (23, 25)

Cada parto fue observado para evaluar al potro recién nacido con respecto a los criterios mencionados y tomar las muestras sanguíneas del potro y la madre, evitando manejos excesivos. En los muestreos posteriores se tomaron todas las medidas de seguridad para evitar riesgos por manejo. Los individuos de estudio se ubicaron en el Rancho Sayavedra (Boulevard Condado Sayavedra 138, Fraccionamiento Condado Sayavedra, Atizapán Zaragoza, Edo. de México, C.P. 52938) hasta los seis meses de edad y después del destete, fueron llevados al Centro Internacional Ecuestre Santin, Av. Miguel Alemán No. 2, Cont. Boulevard Aeropuerto, Col. Saucés, Toluca, Edo. de México, C.P. 01250.

## 4.5 Diseño Experimental

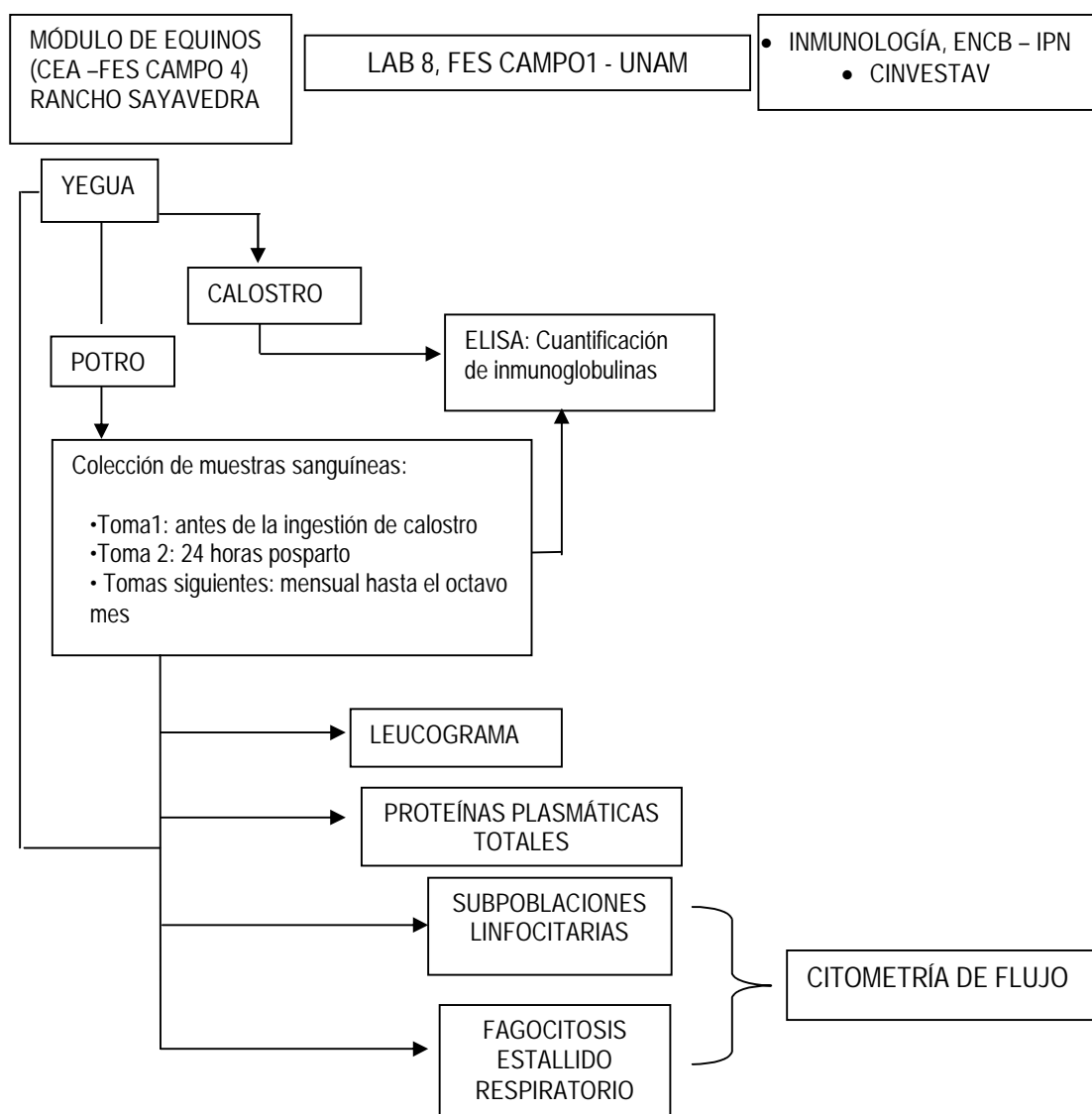


FIGURA 1. Diagrama de flujo. Se detallan: lugares de estancia de los equinos, tomas de muestras, su proceso y análisis de las mismas; los tiempos de colección de muestras y las pruebas que se realizaron.



#### 4.6 Colección de Muestras

- a) Las muestras sanguíneas se tomaron vía venopunción yugular externa.
- b) Se emplearon tubos con heparina para pruebas de funcionalidad: fagocitosis – estallido respiratorio, así como inmunofenotipificación; tubos con EDTA para conteo leucocitario total y diferencial; y tubos sin anticoagulante para colección de suero.
- c) La obtención de muestras se realizó al terminar el proceso del parto, tanto en la madre como al potro; en éste último se realizó antes de ingerir calostro; la segunda toma, 24 horas posparto y posteriormente se procedió mensualmente hasta el octavo mes (Tabla 1, ver anexo).
- d) Muestras de 30 ml de calostro se obtuvieron por ordeño, colectándolas en tubos de 50 ml.
- e) Las muestras se transportaron en termo con refrigerantes y almacenaron bajo refrigeración hasta su proceso.

#### 4.7 Conteo Leucocitario Total y Diferencial

La cuenta y diferenciación leucocitaria se obtuvo por técnicas básicas de laboratorio.

#### 4.8 Determinación de Proteínas Plasmáticas Totales

Las muestras de sangre colectadas en tubos con EDTA, se centrifugaron a 3000 rpm / 10 minutos y se depositó una gota del plasma separado en un refractómetro manual y se tomó la medición.

## 4.9 Fagocitosis y Estallido Respiratorio

### 4.9.1 Cultivo y tinción de Staphylococcus aureus (Sa)

Se sembró *Staphylococcus aureus* (Sa) (ATCC 6538P) en agar BHI y se incubó por 12 – 18 horas, después se cultivó una colonia en caldo BHI por 8 horas, que al terminar fue inactivado en baño maría a 70° C / 60 minutos. Se centrifugó a 2000x g /10 min / 4° C, y posteriormente se decantó, resuspendió y se hicieron tres lavados de la misma forma, con Solución Salina Balanceada Hanks (HBSS, no. Catálogo 14185-052, Gibco-Invitrogen) los dos primeros y con PBS estéril el tercero. Se determinó la concentración de bacterias por espectrofotometría a 540 nm, y, se ajustó la cantidad de bacterias a  $1 \times 10^9$ /ml. La tinción con yoduro de propidio (PI) fue a concentración de 100 µg/ml. A volúmenes iguales, se mezcló la solución de *Staphylococcus aureus* y de yoduro de propidio (Sa-PI) para incubar por 60 min / temperatura ambiente / en agitación; transcurrido el tiempo se lavaron tres veces, dos con PBS estéril y uno con RPMI 1640 centrifugando a 2000x g/10 min/4°C; finalmente el botón se resuspendió en RPMI 1640 con el volumen necesario para ajustar a  $2 \times 10^{10}$ /ml, la solución Sa-PI se mantuvo almacenada en congelación a – 70°C hasta su uso. (Técnica modificada de Smits, 1997)

### 4.9.2 Fagocitosis – Estallido Respiratorio

En un tubo de polipropileno se depositaron 5 µl de medio RPMI 1640, 5 µl de bacterias Sa-PI (excepto controles) y 15 µl sangre completa equina, se agitó suavemente e incubó por 10 minutos / 37°C, enseguida se agregaron 5 µl de DHR 123 a 10µM, de nuevo, se mezcló e incubó por 10 min / 37°C. Posteriormente, se añadieron 200 µl de solución de lisis, se agitó e incubó otros 10 min a 4°C; lo siguiente fue centrifugar a 400x g / 5 min, decantar y resuspender. Se realizaron dos lavados con 500 µl de PBS filtrado (pH 7.2), centrifugando a 400x g /5 min. La última resuspensión, fue con 200 µl de paraformaldehído 1%, almacenando en oscuridad a 4° C hasta el momento en que fueron analizadas en el citómetro de flujo. (Técnica modificada de Smits,1997)

#### 4.10 Determinación de Subpoblaciones Linfocitarias

La proporción de subpoblaciones linfocitarias se determinó por citometría de flujo a través de sus marcadores de superficie, empleando los siguientes anticuerpos monoclonales: EqCD2+ (clona HB88A), EqCD4+ (clona HB61A), EqCD5+ (clona HB19A), EqCD8+ (clona HT14A), EqCD172a+ o EqGM1+ (clona DH59B), EqIgM+ (clona 1.9/3.2), EqMHC-I+ (clona H58A) y EqMHC-II+ (clona H42A), todos de VMRD., Inc. A concentraciones de: 1:50, 1:2000, 1:8000, 1:8000, 1:3200, 1:50, 1:200, y 1:3200, respectivamente.

En tubos de poliestireno se depositaron 5  $\mu$ l del Abmo, a excepción de los controles, 10  $\mu$ l de sangre completa equina, se mezcló e incubó por 20 minutos / 4°C; a continuación se agregaron 100  $\mu$ l de solución de lisis, y se agitó e incubó por 10 min / 4°C. En seguida se centrifugó a 400x g / 5 min / 4° C, se decantó y resuspendió. Se realizó un lavado con 500  $\mu$ l de PBS filtrado, centrifugando a 400x g / 5 min, decantando y resuspendiendo para depositar 10  $\mu$ l de anticuerpo secundario de oveja anti-ratón conjugado con FITC (excepto control) e incubar 20 min / 4°C; luego, se dio otro lavado igual al anterior y se resuspendió con 200  $\mu$ l de paraformaldehído 1% para fijar y conservar a 4°C hasta su lectura. (Técnica modificada de Flaminio, 2000)

#### 4.11 Cuantificación de Inmunoglobulinas por ELISA

Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron centrifugadas a 3000x g por 10 minutos para separar el suero; éste, fue almacenado a -70° C hasta el momento de utilizarlo. Las muestras de calostro (30 ml) se centrifugaron a 3700x g por 15 minutos a 4° C para remover grasa y restos celulares, igual que el suero, se mantuvieron a -70° C.

Las concentraciones de IgG4, IgA e IgM en muestras séricas y de calostro fueron determinadas por ELISA con los kits comerciales: Horse IgGb ELISA Quantitation Kit, Horse IgM ELISA Quantitation Kit, Horse IgA ELISA Quantitation Kit, nos. de catálogo: E70-127, E70-114 y E70-116, respectivamente, Bethyl Laboratories, Inc., USA. El procedimiento del ensayo fue conducido de acuerdo a las instrucciones del laboratorio fabricante (20).

El análisis estadístico se realizó por comparación de medias a través de la prueba de Tuckey y Análisis de Varianza, con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ , los datos se analizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows.

## 5 Resultados

La población de potros del estudio cumplieron con los criterios de inclusión al nacimiento, (ver diagrama de flujo Figura 1); seis de los potros enfermaron en distintos momentos durante el trabajo, y fueron tratados con: antibióticos por 15 días; tres de ellos recibieron terapia de fluidos y otros fármacos de apoyo para aparato digestivo. Dos de los potros del estudio quedaron huérfanos al mes de vida, por lo que, su destete fue muy temprano, se les suministró leche y alimento peletizado comerciales. También se llevaron a cabo calendarios de desparasitación y vacunación en éste período, con los mismos fármacos en igualdad de dosis.

Los datos de las fechas de parto, de las yeguas madres, de las yeguas no gestantes y el calendario de muestreo en potros, pueden consultarlos en el anexo 7.

### 5.1 Parámetros Hematológicos

Los conteos leucocitarios totales y diferenciales, se realizaron de manera rutinaria, en cada toma de muestra; así como, la medición de proteínas plasmáticas totales. En el anexo 7, se muestran las tablas de resultados y gráficas representativas de éstos mismos.

## 5.2 Fagocitosis y Estallido Respiratorio

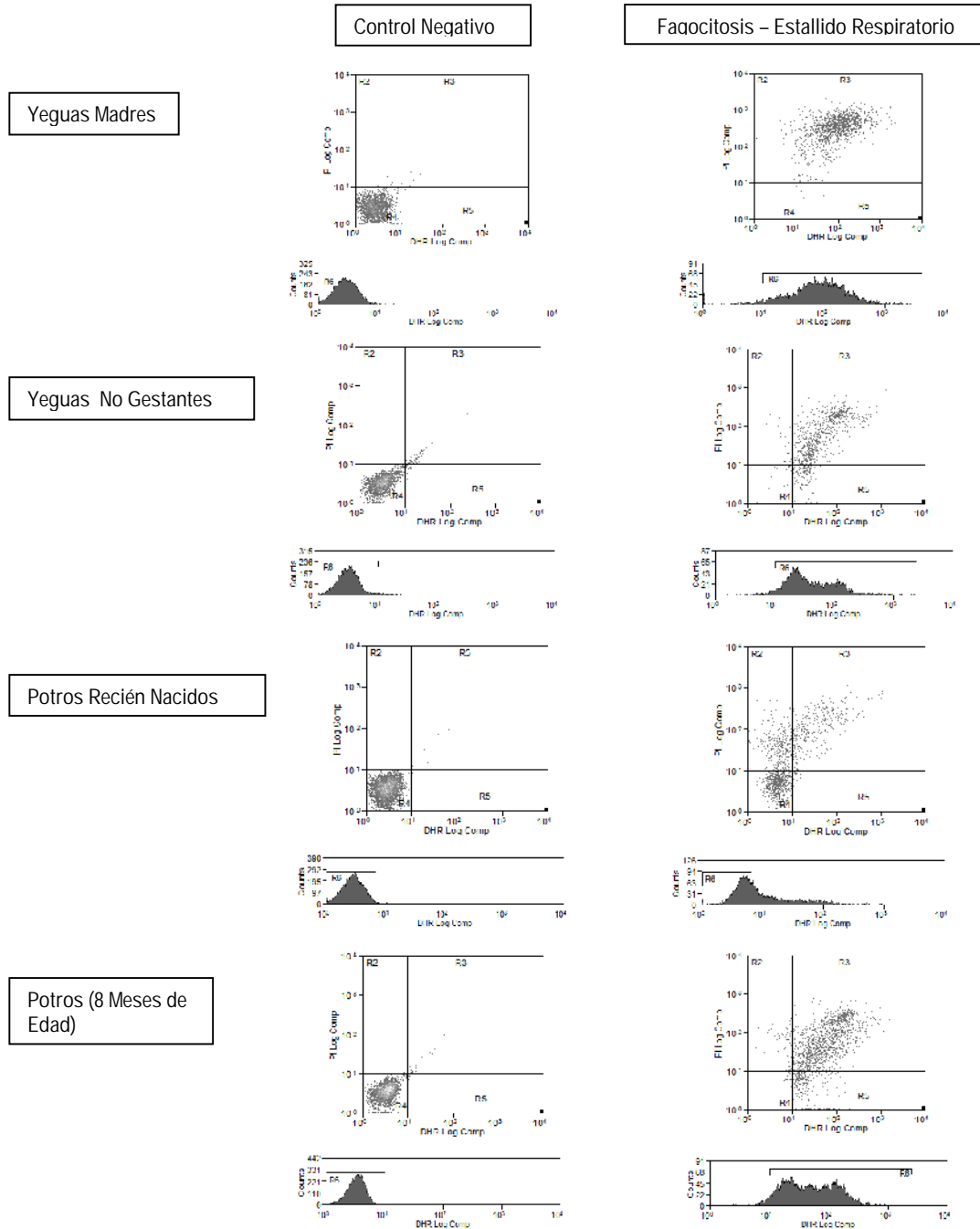


Figura 2. Histogramas y gráficas de dot plot representativos de fagocitosis y estallido respiratorio de cuatro individuos: yegua madre, yegua no gestante, potro recién nacido y potro de ocho meses de edad.

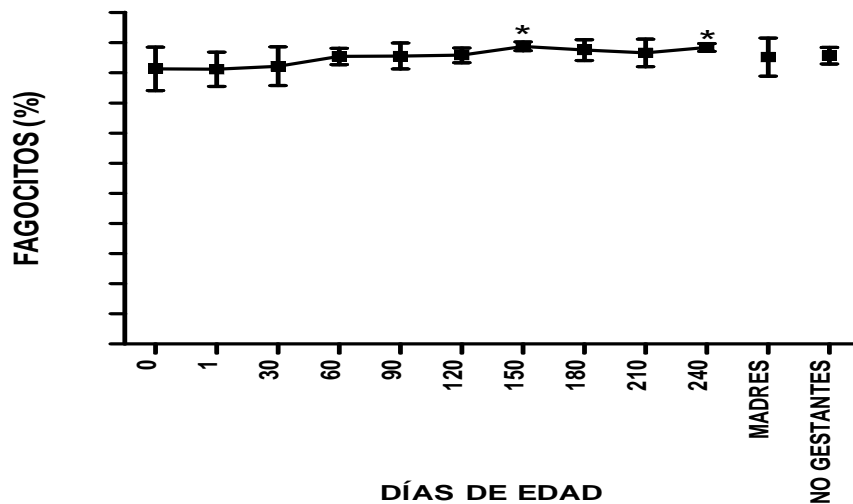


Figura 3. Porcentajes de células en sangre periférica con actividad fagocitaria y estallido respiratorio, de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad. El valor de  $P < 0.0001$ .

Se encontró que la actividad fagocítica y de estallido respiratorio de los potros recién nacidos (día 0) fue en promedio del 85.5%, siendo éste, el porcentaje más bajo de todos los grupos. La fagocitosis aumentó con la edad desde el día 1, observándose un porcentaje de 91.13%; entre el día 60 y el día 120, los resultados obtenidos fueron muy similares, presentando valores de 95.43% a 95.80%. En relación a la actividad fagocítica y de estallido respiratorio de los potros en el día 0, hubo diferencia estadísticamente significativa con respecto a los valores promedio de las madres, ya que, en los demás días, los potros presentaron un rango de 90.86% a 98.75%, quedando el porcentaje de las madres dentro de éste. (Fig.6)

Tabla 1. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de fagocitos con actividad fagocitaria y estallido respiratorio de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	91.31	91.13	92.17	95.44	95.59	95.8	98.76	97.57	96.54	98.4	95.18	95.67
Desv. Estandar	7.171	5.696	6.447	2.709	4.297	2.433	1.438	3.45	4.572	1.293	6.313	2.725
Mediana	94.77	91.99	89.27	95.84	97.01	96.27	99.11	98.86	98.5	98.81	98.1	95.87

### 5.3 Determinación de Subpoblaciones Linfocitarias

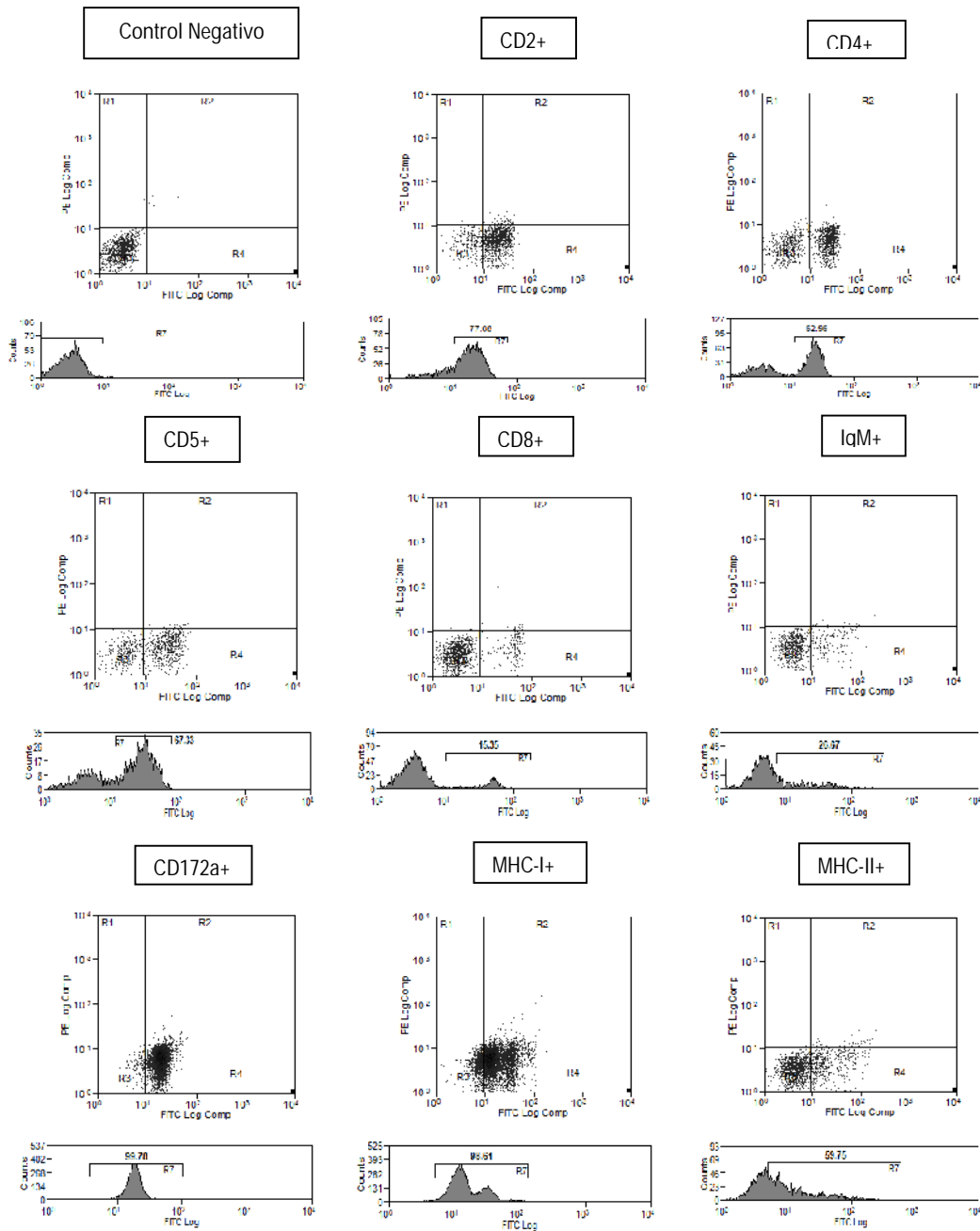


Figura 4. Histogramas y gráficas de dot plot representativos de subpoblaciones linfocitarias en un adulto (yegua madre). Se determinó por citometría de flujo los siguientes marcadores: CD2+, CD4+, CD5+, CD8+, IgM+, CD172+, MHC-I+ y MHC-II+.

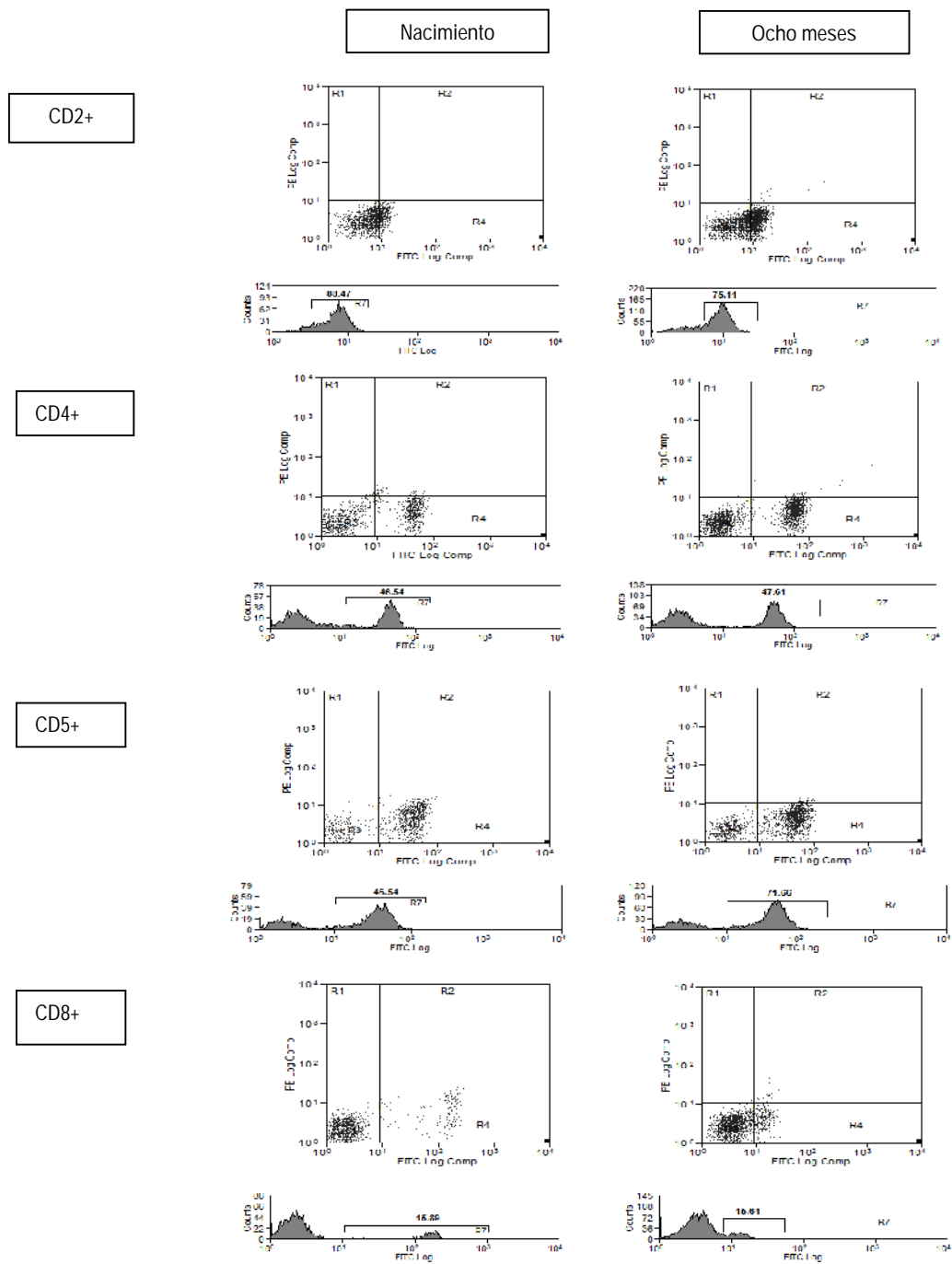


Figura 5a. Histogramas y gráficas de dot plot representativos de un potro recién nacido y uno de ocho meses de edad. En esta figura se muestran los siguientes fenotipos celulares analizados por citometría de flujo: CD2+, CD4+, CD5+, CD8+.



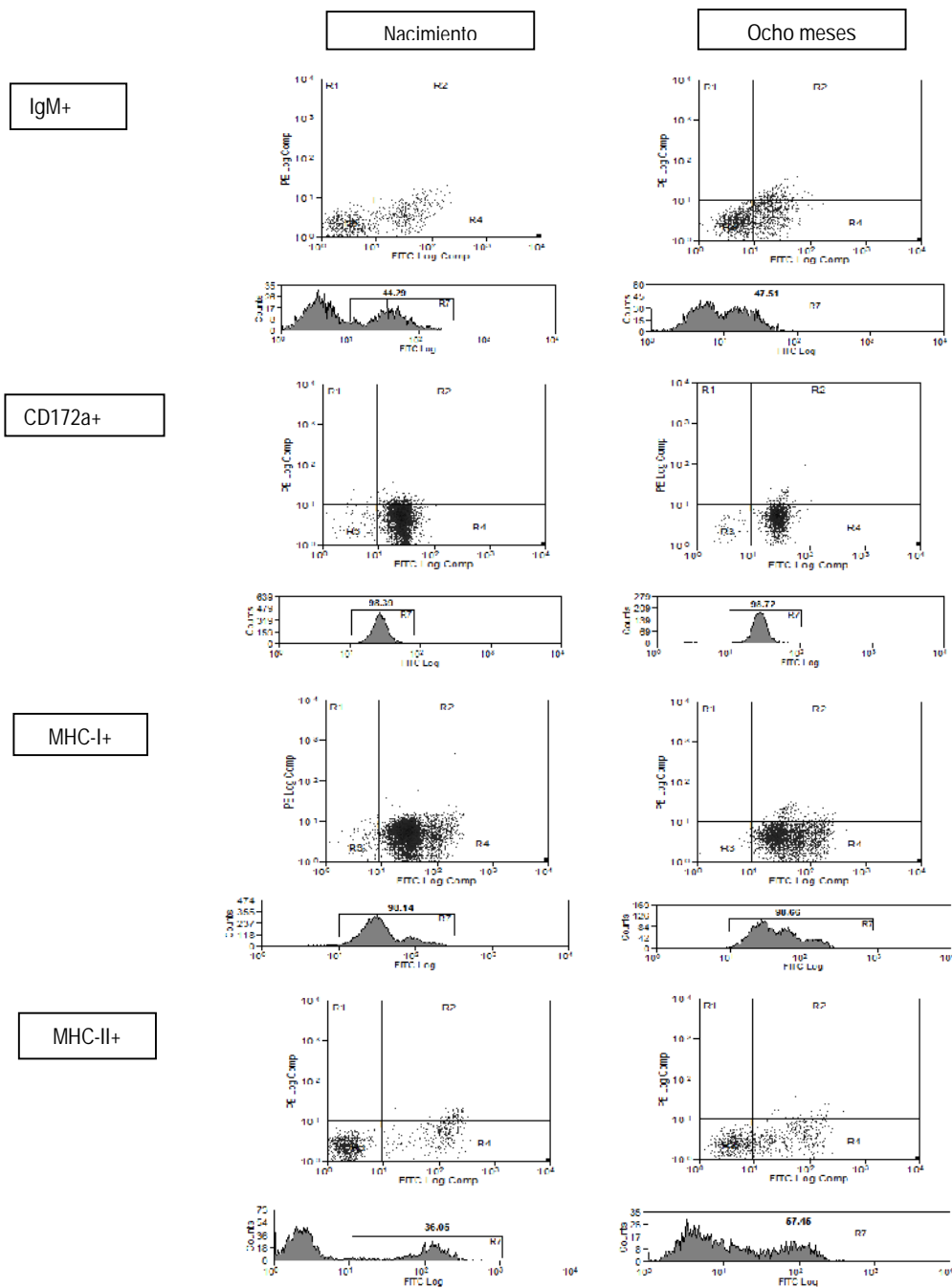


Figura 5b. Histogramas y gráficas de dot plot representativas de un potro recién nacido y uno de ocho meses de edad. En esta figura se muestran los siguientes fenotipos celulares analizados por citometría de flujo: IgM+, CD172a+, MHC-I+ y MHC-II+.

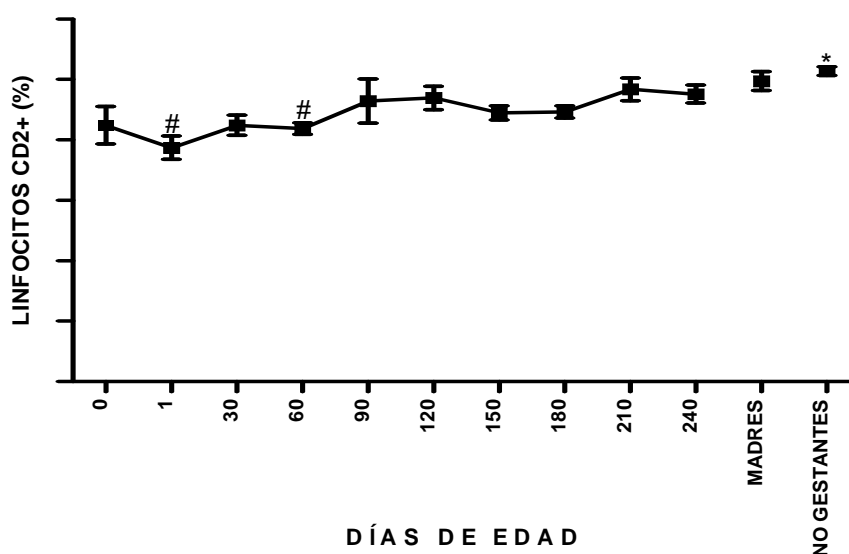


Figura 6. Porcentaje de linfocitos CD2+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad y el # = diferencia significativa en relación a las madres. El valor de  $P < 0.0001$ .

Se estudió el porcentaje de linfocitos CD2+ en 10 potros, durante sus primeros ocho meses de vida. Los potros al nacer iniciaron con una población de linfocitos CD2+ del 62.42%; mostrando diferencia significativa con relación al dato obtenido en las yeguas no gestantes. Los porcentajes de linfocitos CD2+ en el día 1 y en el día 60, tuvieron diferencia significativa con respecto a los valores conseguidos en las yeguas madres. (Tabla 2) En la figura 9, se observó que la población de linfocitos CD2+ en sangre periférica de potros, aumento con la edad, sin alcanzar los niveles de adultos. El análisis de ANOVA se realizó con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 2. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD2+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	62.42	58.74	62.45	61.87	66.44	66.95	64.47	64.62	68.38	67.6	69.73	71.41
Desv. Estandar	9.759	6.171	5.34	3.009	3.654	1.927	3.643	3.104	5.972	4.594	4.986	1.792
Mediana	65.9	56.58	64.08	62.3	67.22	67.29	64.83	65.08	68	67.84	69.68	71.63

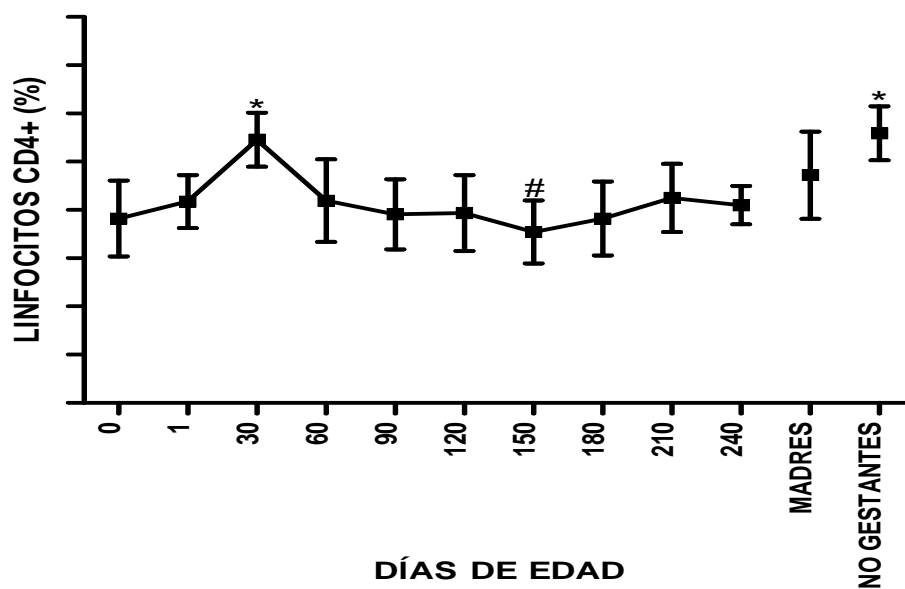


Figura 7. Porcentaje de linfocitos CD4+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad y el # = diferencia significativa en relación a las madres. El valor de  $P < 0.0001$ .

El porcentaje promedio de linfocitos CD4+ en potros recién nacidos fue de 37.03%; con respecto éste, se observó un aumento significativo de linfocitos CD4+ en el día 30, y, también presentó diferencia significativa con el resultado determinado en las yeguas no gestantes. El porcentaje de linfocitos T CD4+ más bajo se presentó en el día 150 de edad, con un 35.43%, el cual, mostró diferencia significativa con el dato obtenido en las yeguas madres. El ANOVA se llevó a cabo, con un 95% de significancia. (Fig. 10 y Tabla 3)

Tabla 3. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD4+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	38.25	41.74	54.6	41.93	39.13	39.38	35.43	38.21	42.51	41	47.22	55.9
Desv. Estandar	7.867	5.499	5.6	8.594	7.265	7.868	6.544	7.673	7.062	3.94	9.04	5.619
Mediana	34.32	42.51	54.93	45.03	37.56	38.22	35.71	40.66	41.44	41.19	46.63	56.78

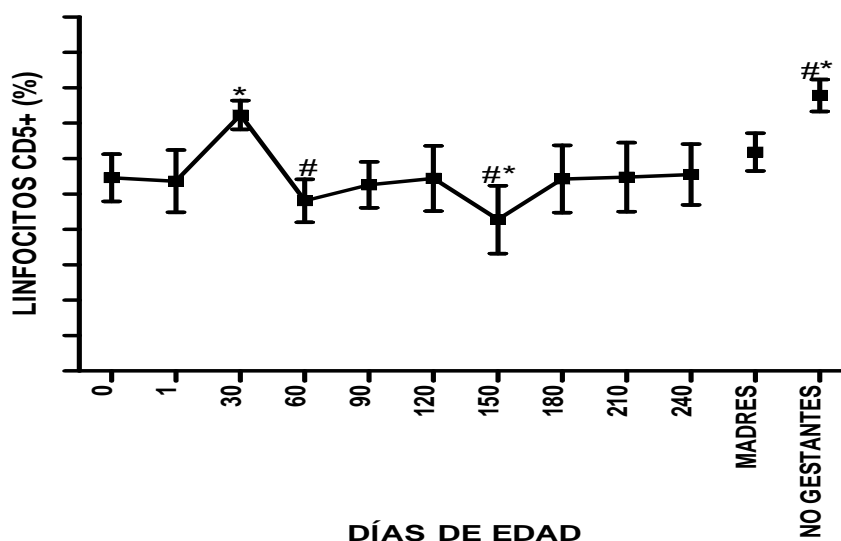


Figura 8. Porcentaje de linfocitos CD5+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad y el # = diferencia significativa en relación a las madres. El valor de  $P < 0.0001$ .

En los potros, se observó semejanza entre las poblaciones de linfocitos CD5+, desde el nacimiento hasta el día 240, salvo, los días 30 y 150, los cuales, presentaron diferencia significativa, con respecto al día 0. En relación a las yeguas madres, se encontró diferencia significativa con los potros en los días 60 y 150, en donde, se observaron datos del 46.64% y 41.46%, respectivamente. También, la figura 11, muestra que existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en potros recién nacidos y las yeguas madres. El ANOVA se realizó con un nivel de confianza del 95 %. (Tabla 4)

Tabla 4. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD5+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	54.64	53.66	72.38	48.14	52.62	54.45	42.82	54.32	54.82	55.54	61.87	77.88
Desv. Estandar	6.647	8.792	4.076	6.084	6.529	9.206	9.592	9.503	9.764	8.613	5.343	4.473
Mediana	55.03	55.95	72.37	46.4	51.71	54.59	45.87	56.52	55.06	54.66	61.21	77.01

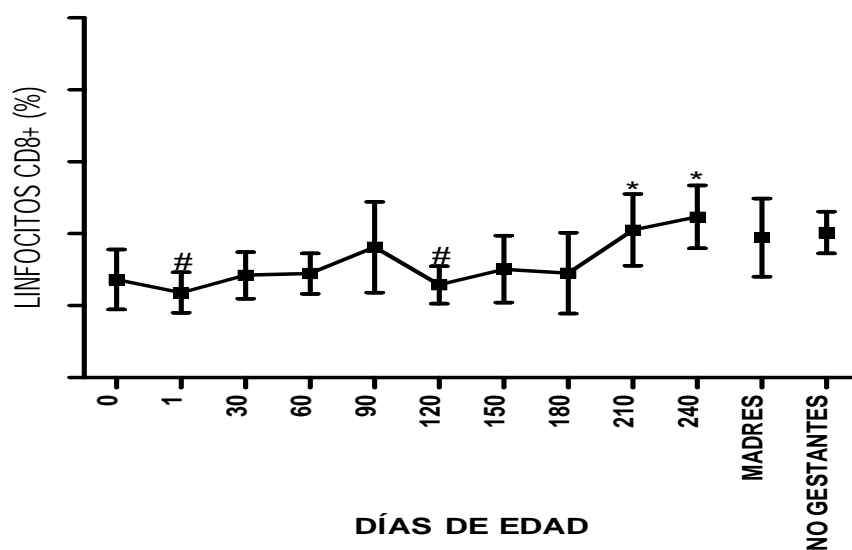


Figura 9. Porcentaje de linfocitos CD8+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad y el # = diferencia significativa en relación a las madres. El valor de  $P < 0.0001$ .

Se estudió en sangre periférica de potros y yeguas adultas, la subpoblación de linfocitos CD8+; y, se registró que los resultados obtenidos en los potros del día 0, tuvieron diferencia significativa con aquellos determinados en los dos últimos muestreos, correspondientes al día 210 y día 240, los cuales mostraron porcentajes de 13.65 %, 20.54 % y 22.36%, respectivamente. Con respecto a las yeguas madres, se observó, diferencia significativa con los porcentajes de linfocitos CD8+ de los potros en el primer día de edad y en el día 120. El nivel de significancia fue del 95 %. (Fig. 12 y Tabla 5)

Tabla 5. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD8+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	13.65	11.83	14.21	14.47	18.13	12.88	15.08	14.51	20.54	22.36	19.46	20.17
Desv. Estandar	4.177	2.799	3.236	2.82	6.31	2.602	4.652	5.622	4.972	4.386	5.449	2.901
Mediana	12.92	11.3	14.17	14.15	18.23	12.37	14.43	13.18	19.85	23.79	18.11	19.91

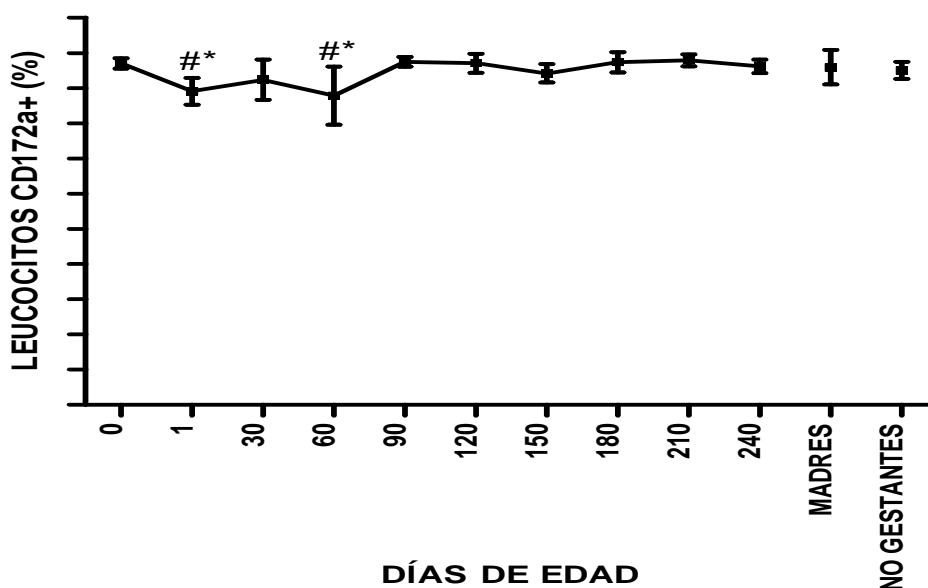


Figura 10. Porcentaje de leucocitos CD172+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad y el # = diferencia significativa en relación a las madres. El valor de  $P < 0.0001$ .

El porcentaje promedio de leucocitos CD172a+ en potros recién nacidos (día 0) fue de 97.06 %, el cual, fue significativamente mayor a los datos registrados en el día 1, con el 89.11 %, y el día 60, con el 87.89 %; éstos valores representaron los valores más bajos en el estudio. Estos mismos, mostraron diferencia significativa con aquellos obtenidos en las yeguas madres, que fue de 95.97 %. Los resultados que se obtuvieron entre los días 90 al 240 fueron homogéneos, con un nivel de significancia del 95 %. (Fig. 13 y Tabla 6)

Tabla 6. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos CD172a+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	97.06	89.11	92.4	87.89	97.48	97.09	94.21	97.37	97.9	96.18	95.97	95.04
Desv. Estandar	1.476	3.797	5.748	8.244	1.386	2.694	2.622	2.875	1.691	1.928	4.866	2.416
Mediana	97.12	90.07	92.12	90.29	98.13	98.09	94.45	98.39	98.49	96.26	98.7	95.68

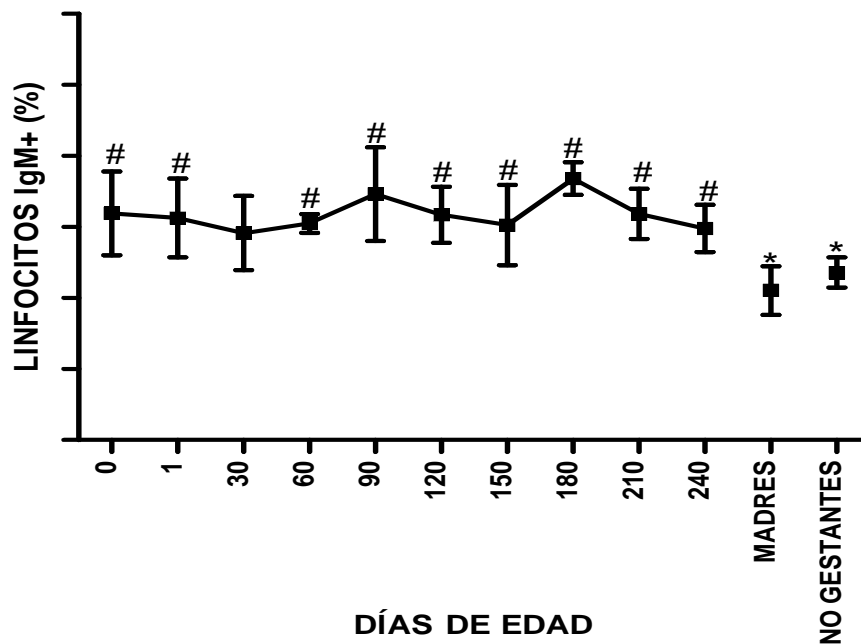


Figura 11. Porcentaje de linfocitos IgM+ en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El # = diferencia significativa en relación a las madres. El valor de  $P < 0.0001$ .

Se encontró, que las poblaciones de linfocitos IgM+ en potros, fueron similares durante el estudio; pero, con respecto al día 0, hubo diferencia significativa con los datos conseguidos en las yeguas madres y no gestantes. El porcentaje de linfocitos IgM+ más alto en potros, lo presentó el día 180, con un valor de 36.82 %; mientras que el más bajo, se observó en el día 60, con 29.14 %. El nivel de confianza fue del 95 %. (Fig. 14 y Tabla 7)

Tabla 7. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de linfocitos IgM+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	31.95	31.28	29.14	30.5	34.62	31.72	30.27	36.82	31.84	29.8	21.05	23.6
Desv. Estandar	5.899	5.539	5.227	1.337	6.604	3.948	5.669	2.298	3.526	3.308	3.415	2.129
Mediana	34.03	30.78	26.67	30.9	35.36	30.76	30.29	37.04	32.96	29.86	21.65	23.07

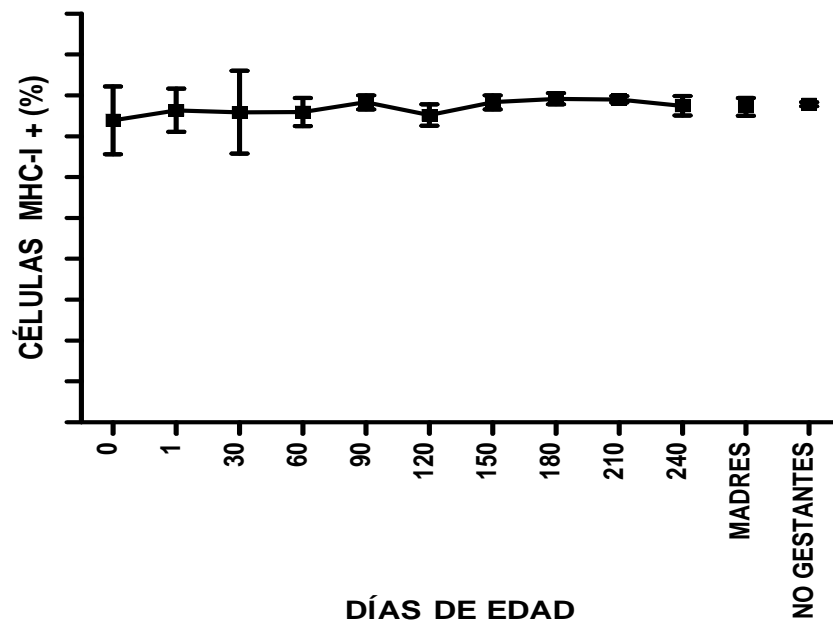


Figura 12. Porcentaje de células MHC-I + en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El valor de  $P < 0.0001$ .

Se observó que las poblaciones de células MHC-I+ en potros y yeguas adultas fueron semejantes, ya que, no existió diferencia significativa entre los resultados conseguidos. En potros, el rango de valores que se registró en el estudio fue de 93.94% a 99.25%; mientras que en las yeguas control, se determinaron porcentajes de 97.21% y 97.87%, correspondientes a las yeguas madres y yeguas no gestantes. El análisis de ANOVA se efectuó con un nivel de confianza del 95% (Fig. 15 y Tabla 8)

Tabla 8. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de células MHC-I+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	93.94	96.39	95.92	95.96	98.34	95.24	98.34	99.25	99.07	97.48	97.21	97.87
Desv. Estandar	8.278	5.291	10.16	3.429	1.745	2.595	1.702	1.35	0.8056	2.366	2.198	0.4689
Mediana	97.3	98.32	99.51	96.05	99.07	93.76	98.81	99.8	99.34	98.5	97.79	97.71



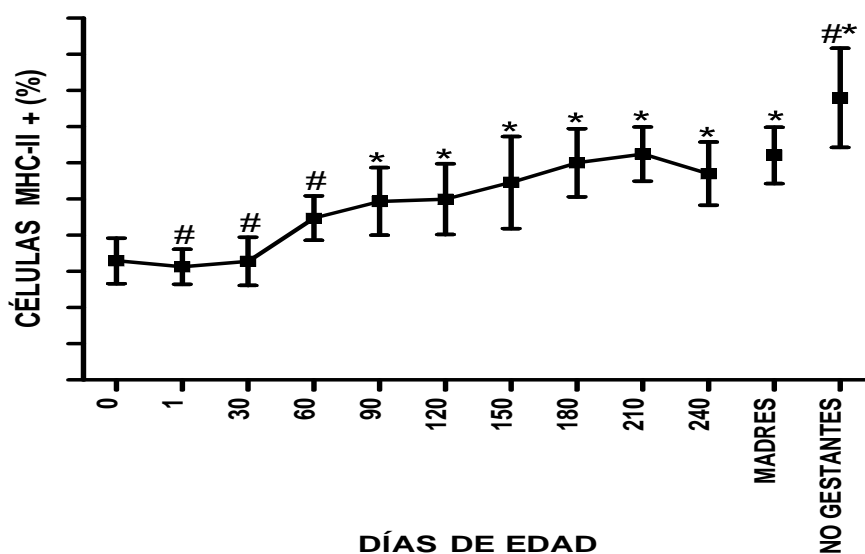


Figura 13. Porcentaje de células MHC-II + en sangre periférica de potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad. En la gráfica se presentan las medias y la desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros y de los grupos control: 10 yeguas madres de los potros y 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad y el # = diferencia significativa en relación a las madres. El valor de  $P < 0.0001$ .

Se observó en potros, que en el primer mes de vida los porcentajes de células MHC-II+ fueron bajos, mostrando valores que oscilaban entre el 32.93 % (día 0), 31.32 % (día 1) y 32.82 (día 30). Después del día 30 el porcentaje de células MHC-II+ comenzó a elevarse gradualmente con la edad, pero el aumento fue significativo a partir del día 90, en relación al día 0. La figura 16 muestra que con respecto a las yeguas madres, existió diferencia significativa con los datos conseguidos de los días 1, 30 y 60 en potros, así como, con los de las yeguas no gestantes, el análisis se realizó con un nivel de significancia del 95 %. (Tabla 9)

Tabla 9. Medias, desviación estándar y medianas de los porcentajes de células MHC-II+ en sangre periférica de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6).

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes
Promedio	32.93	31.32	32.82	44.75	49.38	49.97	54.59	60.07	62.44	57.02	62.1	77.98
Desv. Estandar	6.294	4.844	6.675	6.145	9.3	9.788	12.69	9.432	7.518	8.737	7.793	13.7
Mediana	33.44	30.64	32.74	44.07	50.31	52.43	59.06	62.06	61.56	57.7	63.46	80.18

## 5.4 Cuantificación de inmunoglobulinas

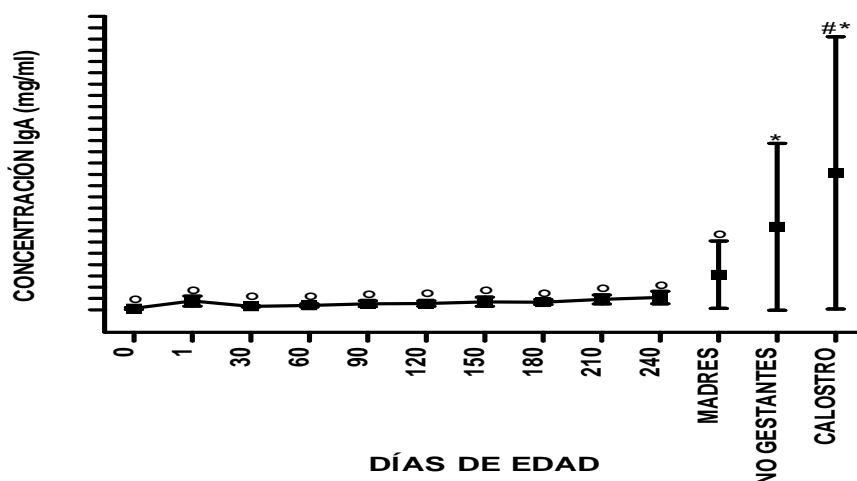


Figura 14. Concentración de IgA en suero de potros y yeguas adultas, y, concentración de IgA contenida en calostro. En la gráfica se presentan las medias y desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad, de las 10 yeguas madres, sus respectivos calostros, y, de 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad, el # = diferencia significativa en relación a las madres y el ° = diferencia significativa en relación al calostro. El valor de  $P < 0.0001$ .

Con respecto a los resultados obtenidos en los potros durante el estudio, se observó, que no hubo diferencia significativa en las concentraciones de IgA sérica; el nivel de IgA del día 0 con aquellos niveles determinados en yeguas no gestantes y calostro, si mostró diferencia significativa. Éste último, presentó niveles de IgA significativamente altos, con respecto a todos los datos conseguidos, salvo, los observados en las yeguas no gestantes. La significancia se obtuvo bajo un nivel de confianza del 95%. (Fig. 17 y Tabla 10)

Tabla 10. Medias, desviación estándar y medianas de las concentraciones de IgA en suero (mg/dl) de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6); así como, de IgA contenida en calostro.

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes	Calostro
Promedio	0.112	0.771	0.301	0.392	0.545	0.558	0.711	0.684	0.919	1.091	3.110	7.359	12.140
Desv. Estandar	0.090	0.444	0.070	0.152	0.256	0.249	0.417	0.219	0.396	0.554	3.002	7.395	12.070
Mediana	0.051	0.659	0.312	0.411	0.481	0.489	0.575	0.698	0.862	1.085	1.880	4.402	8.159

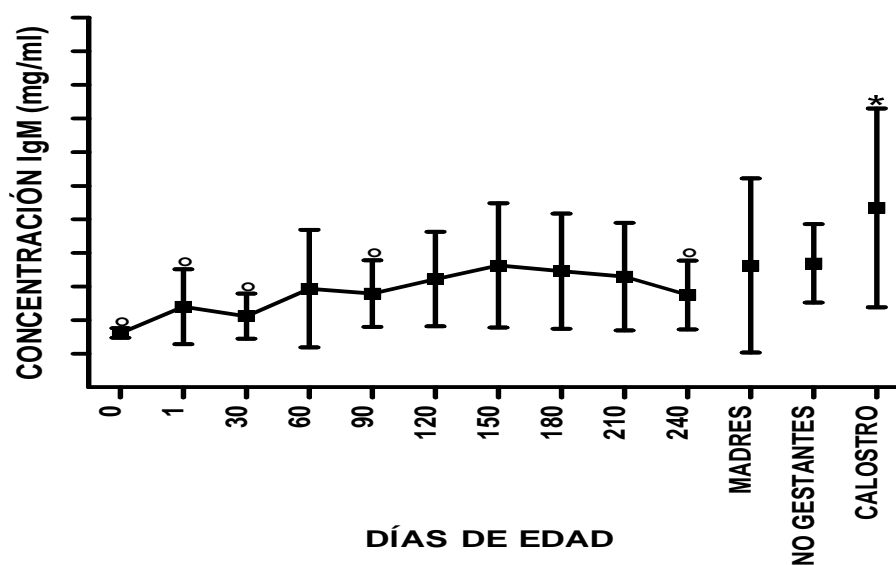


Figura 15. Concentración de IgM en suero de potros y yeguas adultas, y, concentración de IgM contenida en calostro. En la gráfica se presentan las medias y desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad, de las 10 yeguas madres, sus respectivos calostros, y, de 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad y el ° = diferencia significativa en relación al calostro. El valor de  $P < 0.0001$ .

Se observó, que al nacimiento, los potros tienen la concentración de IgM sérica más baja de 0.6173 mg/ml, el nivel de IgM en suero de potros aumento paulatinamente con la edad, alcanzando, en el día 150 con una concentración de 2.629 mg/dl, los niveles de las yeguas madres; éste disminuyo en las siguientes fechas hasta una medición de 1.75 mg/dl. En relación al calostro, se encontró diferencia significativa con los datos del día 0, 1, 30, 90 y 240. El ANOVA, se realizó con un nivel de confianza del 95%. (Fig. 18 y Tabla 11)

Tabla 11. Medias, desviación estándar y medianas de las concentraciones de IgM en suero (mg/dl) de 10 potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres (n=10) y de yeguas no gestantes (n=6); así como, de IgM contenida en calostro.

Edad	Día 0	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180	Día 210	Día 240	Madres	Yeguas no gestantes	Calostro
Promedio	0.6174	1.399	1.12	1.937	1.789	2.221	2.629	2.457	2.295	1.75	2.626	2.693	4.347
Desv. Estandar	0.1446	1.12	0.6723	1.75	0.9895	1.407	1.853	1.712	1.601	1.023	2.588	1.167	2.959
Mediana	0.6302	0.8765	0.8454	1.177	1.362	1.855	1.821	1.701	1.593	1.442	1.716	2.52	4.247

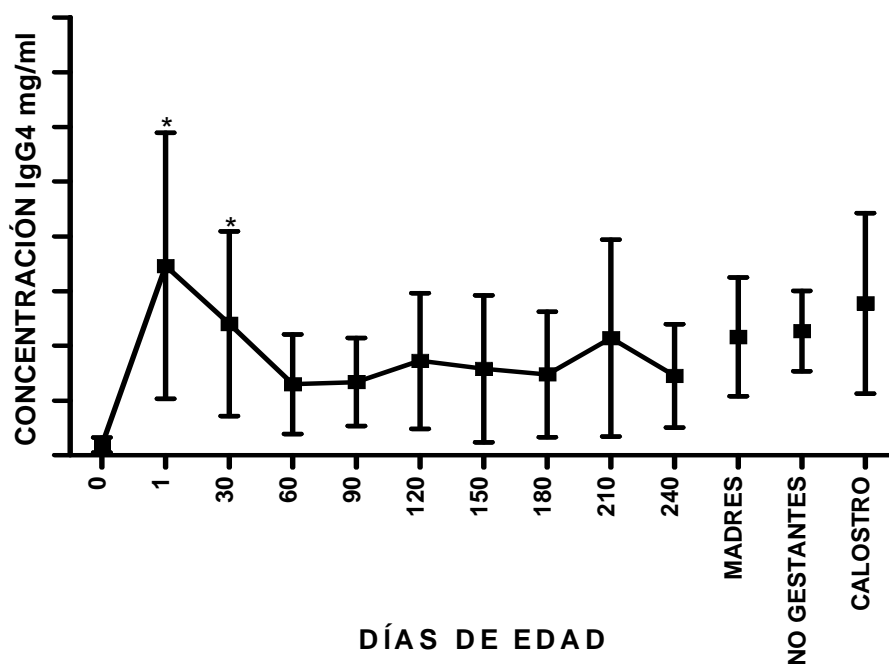


Figura 16. Concentración de IgG4 en suero de potros y yeguas adultas, y, concentración de IgG4 contenida en calostro. En la gráfica se presentan las medias y desviación estándar de los valores obtenidos a partir de 10 potros desde el nacimiento hasta 240 días de edad, de las 10 yeguas madres, sus respectivos calostros, y, de 6 yeguas no gestantes. El \* = diferencia significativa en relación al día 0 de edad. El valor de  $P < 0.0001$ .

Se observó, que igual a lo observado en IgA e IgM, la concentración de IgG4 en suero de potros recién nacidos (día 0), fue la más baja en el estudio; con respecto a éste, se observaron aumentos significativos en el día 1 y en el día 30. En el día 60, se registró el valor más bajo después del día 0, y, a partir de éste, los resultados obtenidos en potros, en las yeguas adultas y calostro, mostraron similitud. Los resultados se analizaron bajo un nivel de significancia del 95%. (Fig. 19 y Tabla 12)

Tabla 12. Medias, desviación estándar y medianas de las concentraciones de IgG4 en suero (mg/dl) de potros desde su nacimiento hasta los 240 días de edad, de sus yeguas madres y de yeguas no gestantes; así como, de IgG4 contenida en calostro.

Edad	Día 0 n=10	Día 1 n=6	Día 30 n=8	Día 60 n=8	Día 90 n=8	Día 120 n=8	Día 150 n=9	Día 180 n=8	Día 210 n=9	Día 240 n=6	Madres n=6	Yeguas no gestantes n=4	Calostro n=4
Promedio	1.885	34.59	24.04	13.01	13.39	17.27	15.81	14.77	21.41	14.51	21.65	22.68	27.76
Desv. Estandar	1.365	24.3	16.87	9.103	8.014	12.4	13.44	11.45	17.99	9.483	10.88	7.34	16.53
Mediana	1.004	29.68	21.31	12.38	12.28	15.41	15.92	9.958	16.86	16.25	23.12	22.49	31.91

## 6 Discusión

### 6.1 Fagocitosis y Estallido Respiratorio

La fagocitosis y el estallido respiratorio de neutrófilos y macrófagos, representan una secuencia de eventos esenciales para que se de la muerte de las bacterias intracelularmente, como parte de los mecanismos de respuesta de la inmunidad innata. (48, 53, 54) Este estudio muestra una medición simultánea de ambas pruebas en células fagocíticas, estimando la fluorescencia roja de los fagocitos que ingirieron al *S. aureus* teñido con PI, y, una fluorescencia verde provocada por la oxidación de la DHR 123, al partir de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) .

En este trabajo se observó (Fig. 6), que los fagocitos de potros al nacimiento, mostraron su capacidad funcional; sin embargo, el número de éstos, durante el primer mes de vida, no fue semejante a lo evaluado en yeguas adultas; lo que sugiere una deficiencia celular innata, en comparación con los adultos; pues aunque son células fagocíticas funcionalmente maduras para responder ante estímulos, su población en cuanto a número fue menor. Posteriormente, a partir del día 60 de edad de los potros, se registraron resultados comparables a aquellos obtenidos en las yeguas control adultas; lo que refleja una respuesta inmune contra patógenos presumiblemente, del medio ambiente. En el séptimo mes de edad de los potros, los resultados señalan que el porcentaje de fagocitos que responden a bacterias y el consecuente estallido respiratorio, disminuyó en relación a los meses anteriores; esto se atribuye al estrés fisiológico provocado por el destete de los potros y su traslado a otras instalaciones, ocasionando deficiencia en su sistema inmune, con predisposición al desarrollo de enfermedades sépticas (9, 26, 27, 28).

Este estudio, permitió medir la fagocitosis y el estallido respiratorio de leucocitos en un nivel fisiológico, al emplear sangre completa y con volúmenes de sangre pequeños, en relación con otras investigaciones, además de que el tiempo de proceso fue menor a una hora (53, 55, 56).

## 6.2 Determinación de subpoblaciones linfocitarias

Los anticuerpos monoclonales específicos para antígenos leucocitarios equinos, son una herramienta importante que ayuda a estudiar la biología de los leucocitos equinos y caracterizar inmunológicamente moléculas que permiten conocer y entender el comportamiento de las células inmunes en condiciones normales y durante enfrentamientos contra microorganismos que dañan la salud de los caballos. Lo anterior, hace que el uso de la inmunofenotipificación de leucocitos de sangre periférica por citometría de flujo, sea un instrumento más, para evaluar y apoyar en el establecimiento del estado inmunológico de un individuo.

En este trabajo, uno de los objetivos, fue determinar las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica de 10 potros durante ocho meses de vida, a partir de su nacimiento, para detectar cambios de frecuencia poblacional, y poder monitorear su comportamiento inmunológico, buscando identificar las etapas en que son inmunológicamente susceptibles.

Uno de los marcadores utilizados, fue CD2, que, en equinos, su expresión ha sido caracterizada como exclusiva para marcar linfocitos T; CD2, es una molécula de adhesión primaria que contribuye a potenciar la afinidad de unión del linfocito T a la APC, desempeñando un papel importante en la transducción de señales y activación de células T (56, 57). En el estudio se observó que en los potros al nacimiento, su población media de linfocitos T que expresaron CD2 fue menor, en relación al porcentaje de células CD2+ de las yeguas madres, esta diferencia, obedece al hecho que, la expresión de CD2 en superficie celular de los linfocitos T vírgenes es menor que en linfocitos T activados (59). También, se observaron porcentajes de células CD2+ bajos en los primeros dos meses de vida, esto, puede deberse a un retraso en la maduración de los linfocitos a causa de la inmunidad materna transferida pasivamente o la baja exposición a microorganismos del medio ambiente, por el poco tiempo de vida. (14) El aumento de las poblaciones de linfocitos T CD2+ en los potros a partir del tercer mes de edad, alcanzando valores de adultos; demuestra la activación de linfocitos T, en respuesta a los estímulos antigénicos provocados por el contacto con microorganismos (13, 26, 29, 59).

En general, los potros nacieron con poblaciones de linfocitos T disminuidas, con respecto a las yeguas; en el sistema inmune, los linfocitos T CD4+ son responsables de coordinar la respuesta inmune contra muchos patógenos intracelulares, al reconocer los determinantes antigénicos unidos al MHC-II (59, 60, 61). Los aumentos que se presentaron en la cantidad de linfocitos T CD4+, a las 24 horas de haber nacido y al primer mes de edad; sugiere la expansión de la población linfocitaria en sangre periférica, como parte de una expresión de desarrollo de la producción de médula ósea y maduración tímica de células T que indica un comportamiento antigénico independiente en los linfocitos T. La población de linfocitos T CD4+, fue constante el resto del estudio, a partir del segundo mes de vida. Estas mediciones fueron afines con lo encontrado en Smith (2002) (40), y en Flaminio (2000), pero, con una subpoblación linfocitaria más baja, de lo reportado en éste último (26). El porcentaje significativamente bajo que se presentó en el día 150, puede sugerir la presencia de alteraciones en las moléculas co-estimuladoras que complementan las señales de activación de los linfocitos CD4+, explicando la susceptibilidad de los potros a algunos patógenos, como se mencionó en Horohov (2005) (29).

CD5, es una molécula de adhesión presente en la superficie de células T, y, de una subpoblación de linfocitos B: linfocitos B-1, derivados de sangre periférica, en los que la molécula CD5 está altamente expresada; su función básica es permitir la comunicación entre los linfocitos T y los linfocitos B, así como, entre los tipos de subpoblaciones de linfocitos B, mediante la unión con su ligando CD72 (59, 62, 63). En general, la población de linfocitos CD5+ en potros fue semejante, salvo el día 30, y los días 60 y 150 en los que presentaron valores significativamente bajos en comparación a los obtenidos en las yeguas. Tal vez, debido a una baja expresión de ésta molécula en linfocitos maduros localizados en circulación sanguínea o por una regulación negativa del receptor de linfocitos T, sobre la superficie celular, a partir de CD5. (63) El aumento significativo que se observó en el primer mes de edad; sugiere una activación de los linfocitos T, en respuesta a los variados estímulos presentes en el medio ambiente, posiblemente, como parte de la iniciación de la respuesta inmune adaptativa; ya que en este momento comienza a declinar la inmunidad pasiva transferida por la madre, la cual, representa un obstáculo para la inducción de la inmunidad activa (10, 13, 25, 33).

Los linfocitos T CD8+ que reconocen péptidos antigénicos unido a las moléculas MHC-I, están especializados para matar cualquier célula que exhiba un péptido extraño y así librar al cuerpo de células infectadas con virus u otros patógenos citosólicos; adquiriendo actividad citotóxica (59, 63). La subpoblación de linfocitos T CD8+, en potros al nacer fue baja en relación al número de linfocitos T CD8+ determinados en las yeguas, pero, significativamente menor con el resultado conseguido a las 24 hrs de edad; quizá, porque los potros al nacer, carecen de especificidad antigénica a causa del poco tiempo de vida que han experimentado. Los aumentos en la población de células CD8+ comenzaron a partir del primer mes de edad; sin embargo, se observó una disminución significativa alrededor del día 120, con respecto a las yeguas; que sugiere una actividad co-estimuladora débil, incapaz de estimular a los linfocitos T CD8+. En relación, a las poblaciones de células T CD8+ que se elevaron en los dos últimos meses, pueden explicarse por el constante estímulo antigénico que sufrieron los potros en estas fechas, debido a un estrés fisiológico que inició a partir del destete, que implicó, la adaptación a un nuevo ambiente, otra alimentación, y a las condiciones climáticas de la temporada; induciendo, una adecuada señalización que desencadenó la activación de los linfocitos T CD8+.

Los linfocitos B son células especializadas que poseen receptores con distribución clonal que tras interactuar con el antígeno se activan, proliferan y se diferencian a células plasmáticas y células memoria. La determinación de linfocitos B fue a través de la expresión de IgM sobre su superficie celular, porque, ésta, es la primera inmunoglobulina en aparecer en gran cantidad sobre la membrana de las células B (59, 64). La población de linfocitos B IgM+ en los potros fue más alta que los valores obtenidos en las yeguas; tal como se había observado en Flaminio (2000) (26); demostrando actividad del sistema inmune humoral; así es que, las variaciones obedecen a un proceso de activación y proliferación con la consiguiente expansión clonal, provocado por el encuentro entre los linfocitos B con un antígeno. Los encuentros antigénicos que sufrieron los potros en éstas fechas, concuerdan con la presencia clínica de la mayoría de los potros que enfermaron y con los manejos de medicina preventiva realizados. Así mismo, éste período coincide con el aumento de las concentraciones de IgM.



La población de granulocitos y monocitos se identificó, detectando la expresión celular de CD172a+ la cual, es una proteína reguladora de señales, pertenece a la super familia de las inmunoglobulinas; y, en interacción con su ligando CD47, libera una señal inhibitoria, para controlar las funciones efectoras de la inmunidad innata: como la fagocitosis, la adhesión de leucocitos y el reconocimiento de macrófagos. (65,66) En el estudio, se observó que el número de leucocitos CD172a+ en potros de un día y de 90 días de edad, tuvieron diferencia significativa con lo determinado en las yeguas madres. Tal hecho, puede relacionarse a un control negativo, a partir de la molécula CD172a, sobre la función de los granulocitos y monocitos, como efecto de una estimulación exagerada de éstas células al entrar en contacto con los agentes extraños presentes en el medio ambiente, en la temprana vida de los potros. (13)

La principal función biológica de las moléculas MHC es unir péptidos antigénicos para formar un complejo que los linfocitos T puedan reconocer. Las moléculas MHC clase I participan en la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8, contra células infectadas por virus; los linfocitos T CD8 reconocen éste complejo MHC-I:péptido viral y lisan a la célula antes de que el virus pueda replicarse, deteniendo la infección. (58). Los resultados obtenidos en esta investigación, no mostraron diferencia significativa en cuanto al número de células que expresaron MHC clase I, tanto en potros como en yeguas control. Esto, indica, una expresión adecuada de MHC-I en la superficie celular de los linfocitos que expone una apropiada capacidad en presentar los antígenos a los linfocitos T CD8+ para su activación. (41)

El papel de las moléculas MHC clase II es presentar determinantes antigénicos generados en vesículas intracelulares de células B, macrófagos y otras APC a linfocitos T CD4, (59). La población de células que expresaron moléculas MHC-II en los potros, en relación a las yeguas madres, fue significativamente baja en los dos primeros meses de vida, esto, puede relacionarse a la virginidad de los linfocitos T CD4+ en ese ambiente neonatal, sugiriendo, que aún no son capaces de procesar una respuesta antígeno específica. Mientras que, el aumento gradual que se presentó con la edad, alcanzando niveles de adultos, manifiesta un desarrollo de memoria inmunológica por parte de los linfocitos T. Estos hallazgos, coinciden con aquellos observados en otras investigaciones. (26, 39, 60)

### 6.3 Cuantificación de inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glucoproteínas sintetizadas por los linfocitos B que tienen la propiedad de unirse de forma específica a antígenos. En este estudio, IgA, IgM e IgG4 fueron cuantificadas llevando a cabo ensayos de ELISA tipo sándwich o de captura; las concentraciones fueron determinadas en el suero de potros y yeguas, así como, en el calostro colectado de las yeguas madres; el objeto de esta evaluación, fue observar el comportamiento de IgA, IgM e IgG4 durante el crecimiento del potro, desde su nacimiento hasta los ocho meses de vida; la cuantificación de inmunoglobulinas en las yeguas se realizaron para tener puntos de referencia adulto; pero, en el calostro, la importancia radica, en que su ingestión y absorción es vital para que los potros puedan asegurar protección pasiva, principalmente, por medio de las inmunoglobulinas que éste contiene; ya que, la placenta de la yegua no permite la transferencia de inmunoglobulinas al feto equino, y, consecuentemente, los potros recién nacidos carecen de éstas; por eso, fue importante no dejar pasar la medición de inmunoglobulinas en los potros, previo el consumo de calostro. También, cabe señalar que en este estudio, ninguno de los potros presentó FPT, todos tuvieron niveles adecuados de IgG, las concentraciones a las 24 horas fue mayor a 800 mg/dl u 8 mg/ml que fue como se presentaron los resultados de inmunoglobulinas.

La inmunoglobulina A (IgA), es el principal isotipo producido por el tejido linfoide asociado a las mucosas y está presente en las secreciones externas, como: el calostro, saliva, bilis, flujo vaginal, etc.; actúa como primera línea de defensa contra agentes infecciosos que intentan penetrar las membranas mucosas, bloqueando la adhesión de éstos sobre las superficies epiteliales (15, 59, 63). En el trabajo, los niveles promedio de IgA estudiados en potros no mostraron diferencias significativas entre ellos; pero, si fue notable el bajo nivel de IgA en el suero de potros recién nacidos previa ingestión de calostro, con lo observado en potros de 24 horas de vida, momento para el cual ya habían consumido el calostro materno; aunque éste hecho, hace evidente la absorción de IgA calostrual, su permeabilidad es limitada debido a que su función primaria es proteger el tracto digestivo del potro neonatal, lo que explica el contenido significativamente bajo con respecto al calostro (21). Después del primer día, la concentración de IgA disminuyó relativamente, sufriendo variaciones hasta el final del estudio, observando que en los últimos dos meses se presentaron los niveles más altos de IgA sérica en los potros; sin llegar a niveles de adultos. La pequeña cantidad de

IgA en suero de potros, obedece sin duda, a que el suero no es el lugar donde se encuentra principalmente la IgA, sino, en los epitelios de mucosas, como ya se menciono previamente; esto, también indica la desequilibrada proporción con el contenido de IgA en el calostro, como secreción que es. De igual modo, lo anterior, justifica la diferencia significativa que presentó el calostro con la concentración sérica de IgA en las yeguas.

La primera inmunoglobulina de superficie completa sobre células B inmaduras es la IgM, de forma monomérica; después de la estimulación antigénica, las células B se diferencian en células plasmáticas produciendo la IgM secretada de forma pentamérica, que por su elevado peso molecular es confinada a la sangre. IgM, es el anticuerpo más eficiente para promover la fagocitosis y bacteriólisis a través de la activación de la vía clásica del complemento (15, 59, 63). Igual que, en IgA, la concentración de IgM sérica en potros recién nacidos antes de absorber calostro, fue el valor más bajo que se observó en el estudio; después, a las 24 horas el nivel de IgM comenzó a elevarse con la edad de manera gradual, logrando valores de adultos desde el cuarto mes de edad, tal hallazgo, no es distinto a lo reportado previamente en Flaminio (2000) (29). El incremento, corresponde al hecho que es un anticuerpo predominante en la respuesta primaria de inmunoglobulinas, ya que, como isotipo de forma pentamérica tiene múltiples sitios de unión que le concede gran eficacia como anticuerpo aglutinante de las partículas portadoras del antígeno (21, 59, 63). Lo anterior, en respuesta al sostenido contacto con agentes extraños presentes en su nuevo ambiente; y en lo observado, a partir del cuarto mes, coincide con los procesos infecciosos que presentaron el grupo de potros que enfermo, con los calendarios de de medicina preventiva que se aplicaron, con el destete de los potros y el traslado a otro rancho. El contenido de IgM en calostro, que se observó en este estudio, fue mayor a lo reportado en Wagner (2005) y Giguere (2005) (9, 10).

Los anticuerpos juegan un papel importante en la resistencia a infecciones bacterianas; y, en el calostro, las inmunoglobulinas son un componente importante de éste, para conferir protección pasiva al individuo recién nacido, hasta que su propio sistema inmune sea capaz de montar una respuesta específica. Por lo tanto, la vitalidad neonatal frecuentemente manifiesta una correlación positiva con el grado de inmunización pasiva e inmunoglobulinas circulantes; principalmente la IgG,

que constituye un elemento clave en la defensa general del huésped contra antígenos ambientales (35, 67, 68). La IgG predomina en el suero y el espacio extravascular, es la inmunoglobulina que impera en la respuesta secundaria de anticuerpos; su función biológica, es activar el complemento por la vía clásica, estimular la quimiotaxis, y actúa como opsonina para facilitar la fagocitosis (59, 63). La principal subclase de IgG en el calostro, es la IgG4; por lo que, es la más abundante en suero de potros después de la ingestión de calostro, se ha demostrado, que también la de mayor presencia en equinos adultos (35,69). Los resultados conseguidos de las concentraciones de IgG4, no coinciden con lo mencionado en Holznagel (2003) (35), en el presente trabajo, resultaron ser mayores. Se encontró, diferencia significativa entre los niveles de IgG4 en suero de potros recién nacidos con los obtenidos a las 24 horas de edad, confirmando lo señalado anteriormente en el texto; así como, el comportamiento observado, ya que, después del día 1, se muestra un descenso progresivo de la concentración de IgG4, alcanzando su nivel más bajo en el segundo mes de vida, justamente, cuando inicia la síntesis de otros subisotipos de IgG; y, posteriormente, el pausado incremento que sufre hasta el día 210 de vida, en el que, logra niveles adultos.

## 7 Conclusiones.

- a) La intensidad de la actividad fagocitaria y de estallido respiratorio de las células fagocíticas de los potros, fue disminuida al nacer y durante el primer mes de vida; y, demostró ser óptima desde el segundo mes de edad, comparada con las yeguas.
- b) La determinación de los linfocitos CD2+ mostró un aumento progresivo con la edad, indicando, una actividad potente de señalización para la activación de los linfocitos T.
- c) La baja población de linfocitos T CD4+ en potros, señala que hay una limitada respuesta inmune mediada por células; salvo, la expansión observada alrededor del primer mes de edad, aprovechando, el comienzo de la disminución de la inmunidad materna pasiva.
- d) El porcentaje de linfocitos CD5+ significativamente menor en los potros con 60 y 150 días de edad, revela un escaso desarrollo en la producción de linfocitos, que compromete la salud de los potros.
- e) Los valores bajos de los linfocitos T CD8 en sangre de los potros a las 24 horas de vida y del cuarto mes de edad, manifiestan incapacidad de respuesta inmune celular antígeno – específica.
- f) La evaluación de la cantidad de granulocitos y monocitos bajo la expresión de la molécula CD172a, hace evidente en el primer día de vida y en el segundo mes de edad, cierta vulnerabilidad en los potros, que los pone en peligro de desarrollar procesos infecciosos.
- g) La abundante población de linfocitos B IgM+ en los potros, indica la existencia de una cantidad de linfocitos potenciales, para otorgar protección inmune humoral y celular, contra agentes extraños.
- h) La expresión uniforme de la molécula MHC clase I sobre la superficie celular de linfocitos T, manifiesta una habilidad adecuada de unirse a un péptido antigénico para que éste sea reconocido por los linfocitos T CD8+.

- i) La expresión de la molécula MHC clase II en linfocitos, subió paulatinamente con la edad de los potros hasta el final del estudio, mostrando el proceso continuo de memoria inmunológica.
- j) La ingestión y absorción de calostro eleva los niveles séricos de IgA, IgM e IgG4, en los potros recién nacidos, a las 24 horas de vida; y, los valores obtenidos confirmaron una adecuada inmunización pasiva, también que fueron hipogamaglobulinémicos al nacer.
- k) Las altas concentraciones de IgA, IgM e IgG4 en el calostro aseguraron protección inmune pasiva.
- l) El comportamiento de IgM sérica en los primeros tres meses de vida de los potros, los coloca en un estado de riesgo que favorece la invasión de microorganismos patógenos.
- m) La conducta de IgG4 sérica en los potros durante el estudio, es tal como se menciona en Holznagel (2003) y Sheoran (2000); por lo que, con respecto a éste subisotipo de IgG, su disminuida expresión entre el segundo y sexto mes de edad, es un factor predisponente para sufrir un aumento en la susceptibilidad de los potros.
- n) Las variaciones observadas en la fagocitosis, estallido respiratorio, en los porcentajes de las subpoblaciones leucocitarias y en las concentraciones de inmunoglobulinas, indican que no hay relación directa con el crecimiento de los potros.
- o) Los potros, son susceptibles en los primeros dos meses de edad, en el sexto mes de edad que es cuando son destetados y sufren estrés por el proceso de adaptación a su nuevo ambiente.

## 8 Anexos

### 8.1 Colección de muestras

Tabla 13. Calendario de Muestreo en Potros

Potro	Nombre de la madre	Fecha 0 hrs pp M1	Fecha 24 hrs pp M2	Fecha 1er mes M3	Fecha 2do mes M4	Fecha 3er mes M5	Fecha 4to mes M6	Fecha 5to mes M7	Fecha 6to mes M8	Fecha 7mo mes M9	Fecha 8vo mes M10
P1	MISTY	25/04/07	26/04/07	29/05/07	26/06/07	01/08/07	25/08/07	25/09/07	28/10/07	27/11/07	08/01/08
P2	BEOKA'S RACE	28/04/07	29/04/07	29/05/07	26/06/07	01/08/07	25/08/07	25/09/07	28/10/07	27/11/07	08/01/08
P3	BLACKLEATHERLANCE	02/05/07	03/05/07	02/06/07	02/07/07	03/08/07	04/09/07	02/10/07	06/11/07	04/12/07	09/01/08
P4	WIN NOT PLACE	03/05/07	04/05/07	02/06/07	02/07/07	03/08/07	04/09/07	02/10/07	06/11/07	04/12/07	09/01/08
P5	NAROMÉS	07/05/07	08/05/07	02/06/07	03/07/07	07/08/07	05/09/07	03/10/07	07/11/07	05/12/07	11/01/08
P6	CIRENE	10/05/07	11/05/07	13/06/07	03/07/07	14/08/07	12/09/07	16/10/07	14/11/07	11/12/07	15/01/08
P7	MODISTA	17/05/07	18/05/07	13/06/07	03/07/07	14/08/07	12/09/07	16/10/07	14/11/07	11/12/07	15/01/08
P8	SHIRLEY BIRD	26/05/07	13/06/07	27/06/07	30/07/07	26/08/07	26/09/07	30/10/07	28/11/07	13/12/07	30/01/08
P9	MARLUSIVE	28/05/07	29/05/07	27/06/07	30/07/07	26/08/07	26/09/07	30/10/07	28/11/07	13/12/07	30/01/08
P10	AWESOME WILL	03/06/07	04/06/07	03/07/07	07/08/07	05/09/07	03/10/07	07/11/07	05/12/07	11/01/08	30/01/08

Tabla 14. Datos y Colección de Muestras de las Yeguas Madre

Nombre de la yegua	Fecha del parto	Edad (años)	MUESTRA CALOSTRO	MUESTRA SANGRE	Observaciones del parto
MISTY	25 - ABRIL - 2007	9	30 ML	OK	NORMAL
BEOKA'S RACE	28 - ABRIL - 2007	10	30 ML	OK	NORMAL
BLACKLEATHERLANCE	02 - MAYO - 2007	11	45 ML	OK	NORMAL
WIN NOT PLACE	03 - MAYO - 2007	10	30 ML	OK	NORMAL
NAROMÉS	07 - MAYO - 2007	7	45 ML	OK	NORMAL
CIRENE	10 - MAYO - 2007	13	30 ML	OK	NORMAL
MODISTA	17 - MAYO - 2007	10	30 ML	OK	NORMAL
SHIRLEY BIRD	26 - MAYO - 2007	5	30 ML	OK	NORMAL
MARLUSIVE	28 - MAYO - 2007	17	40 ML	OK	NORMAL
AWESOME WILL	03 - JUNIO - 2007	6	30 ML	OK	NORMAL

## 8.2 Parámetros hematológicos

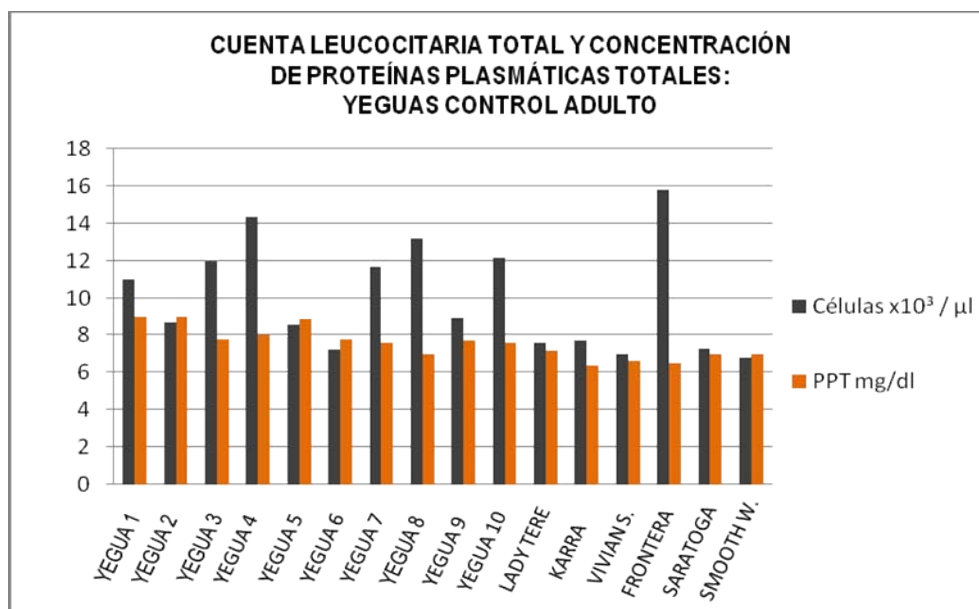


FIGURA 17. Cuentas leucocitarias totales y concentración de proteínas plasmáticas totales (PPT) de 16 Yeguas Control Adulto: 10 Yeguas Madres y 6 Yeguas No Gestantes.

Tabla 15. Resultados de las Cuentas Leucocitarias Totales y de las Proteínas Plasmáticas Totales: Yeguas Madre Y Yeguas No Gestantes\*

YEGUA	NOMBRE	CÉLULAS / µL	PPT (mg / dL)
1	MISTY	11 x 10 <sup>3</sup>	9
2	BEOKA'S RACE	8.7 x 10 <sup>3</sup>	9
3	BLACKLEATHERLANCE	12 x 10 <sup>3</sup>	7.8
4	WIN NOT PLACE	14.35 x 10 <sup>3</sup>	8
5	NAROMÉS	8.55 x 10 <sup>3</sup>	8.9
6	CIRENE	7.25 x 10 <sup>3</sup>	7.8
7	MODISTA	11.65 x 10 <sup>3</sup>	7.6
8	SHIRLEY BIRD	13.2 x 10 <sup>3</sup>	7
9	MARLUSIVE	8.95 x 10 <sup>3</sup>	7.7
10	AWESOME WILL	12.15 x 10 <sup>3</sup>	7.6
11	LADY TERE *	7.6 x 10 <sup>3</sup>	7.2
12	KARRA *	7.7 x 10 <sup>3</sup>	6.4
13	VIVIAN SECRET *	7 x 10 <sup>3</sup>	6.6
14	FRONTERA *	15.8 x 10 <sup>3</sup>	6.5
15	SARATOGA *	7.3 x 10 <sup>3</sup>	7
16	SMOOTH WINE *	6.8 x 10 <sup>3</sup>	7



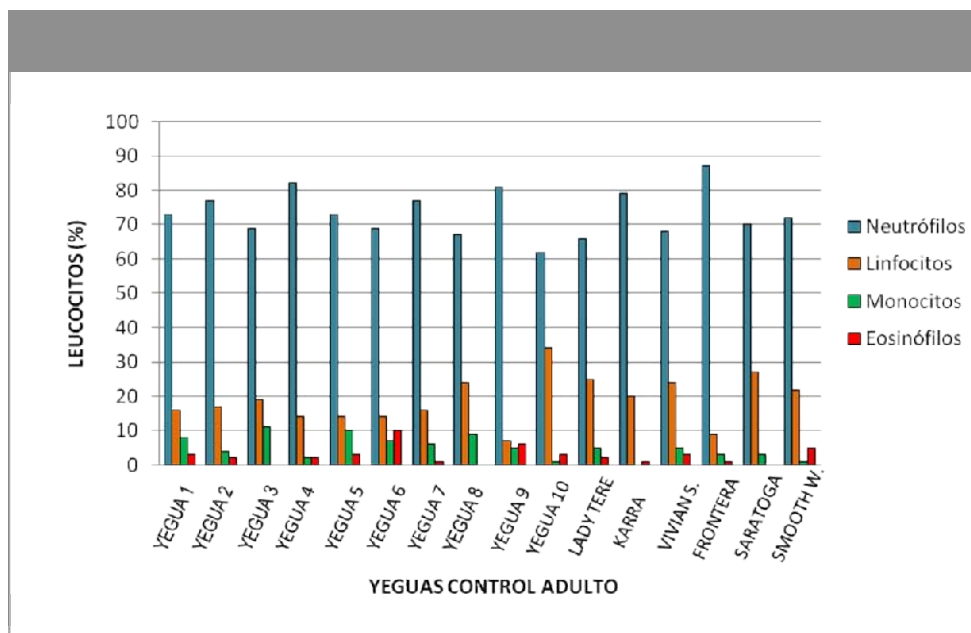


FIGURA 18. Cuentas leucocitarias diferenciales de 16 Yeguas Control Adulto: 10 Yeguas Madres y 6 Yeguas No Gestantes. En la figura, se representan los porcentajes de los poblaciones de leucocitos, obtenidas de muestras de sangre de 16 yeguas.

Tabla 16. Resultados de las cuentas leucocitarias diferenciales: Yeguas Madre Y Yeguas No Gestantes

YEGUA	NOMBRE	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)
1	MISTY	73	16	8	3
2	BEOKA'S RACE	77	17	4	2
3	BLACKLEATHERLANE	69	19	11	0
4	WIN NOT PLACE	82	14	2	2
5	NAROMÉS	73	14	10	3
6	CIRENE	69	14	7	10
7	MODISTA	77	16	6	1
8	SHIRLEY BIRD	67	24	9	0
9	MARLUSIVE	81	7	5	6
10	AWESOME WILL	62	34	1	3
11	LADY TERE	66	25	5	2
12	KARRA	79	20	0	1
13	VIVIAN SECRET	68	24	5	3
14	FRONTERA	87	9	3	1
15	SARATOGA	79	27	3	0
16	SMOOTH WINE	72	22	1	5

Tabla 17a. Resultados de las cuenta leucocitarias totales y proteínas plasmáticas totales en 10 potros durante los primeros ocho meses de vida. Se observan, el conteo absoluto de leucocitos sanguíneos y las concentraciones de proteínas plasmáticas en suero de los potros.

POTRO	M1 (0 hrs)		M2 (24 hrs)		M3 (Mes 1)		M4 (Mes 2)		M5 (Mes 3)	
	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)
P1	13.55	5.4	6.8	5.8	11.45	5.8	8.25	5.6	11.1	5.8
P2	9.4	5.6	7.7	5.8	9.65	5.7	19.85	5.7	13.95	6
P3	9.05	6.7	8.85	7	11.05	6.1	14.45	6.2	18.9	6.7
P4	13.05	5	7.95	6	14	6	11.35	7	18.8	6.9
P5	5.755	5.2	11.6	6.7	11.75	6	16.05	6	14.25	6.1
P6	12.15	4.5	13.85	5.4	7.95	5.8	11.35	6	14.1	6.4
P7	11.5	5.3	12.5	6.2	15.9	5.7	11.35	6.4	7.1	7.2
P8	7.65	4.7	12.95	6.2	9.8	5.7	15.25	6.5	10.95	6.3
P9	5.35	4.9	7.55	5.6	10.2	5.9	15	6.3	16.45	6.4
P10	8.45	5.1	10.25	6	7.35	6.3	15.1	6	15.25	6.4

Tabla 17b. Continuación de los resultados de las cuenta leucocitarias totales y proteínas plasmáticas totales en 10 potros durante los primeros ocho meses de vida. Se observan, el conteo absoluto de leucocitos sanguíneos y las concentraciones de proteínas plasmáticas en suero de los potros.

POTRO	M6 (Mes 4)		M7 (Mes 5)		M8 (Mes 6)		M9 (Mes 7)		M10 (Mes 8)	
	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)	CÉLULAS ( $\times 10^3$ ) / $\mu$ L	PPT (mg / dL)
P1	8.55	5.7	11.45	7.1	7.2	6.5	7.6	6.4	6.5	6.4
P2	11	6	15.6	5.8	12.1	5.8	9.4	6	7.3	6.6
P3	13.95	7	18.45	6.6	13.4	6.3	9.6	6.2	12.2	6.6
P4	14	6.4	15.85	6.2	8.6	7	14.5	6.4	12	6.9
P5	16.75	6.9	16.2	7	11.1	7.1	11.55	6.6	8.8	6.6
P6	11.9	6	13.9	5.8	10.6	6	11.8	6	11.2	6.4
P7	7.5	7	10.65	6.8	5.95	6.5	7.4	6.2	8	6.8
P8	12.7	6.3	10.1	6.6	10.1	6.6	9.2	6.6	8.1	6.6
P9	18.4	6.4	10.3	6.4	10.7	6.4	8.4	6.6	10.85	6.6
P10	17.4	6.1	10.2	6.9	15.5	4.5	7	6	8.5	6

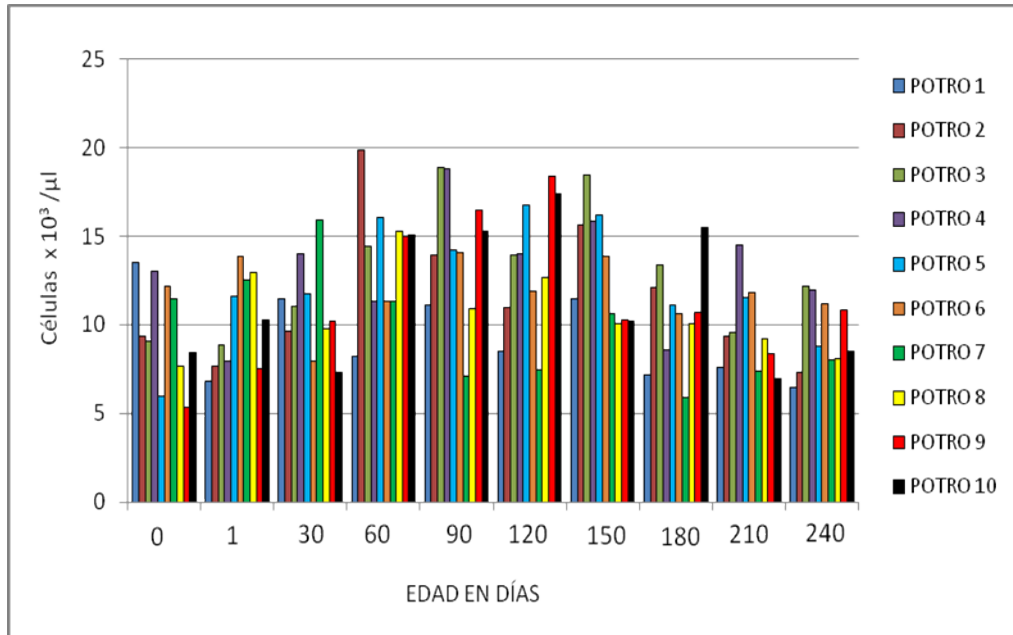


FIGURA 19. Conteo Leucocitario Total de 10 potros, del nacimiento hasta los 240 días de edad. Los resultados representan valores absolutos (Células  $\times 10^3$  /  $\mu$ l).

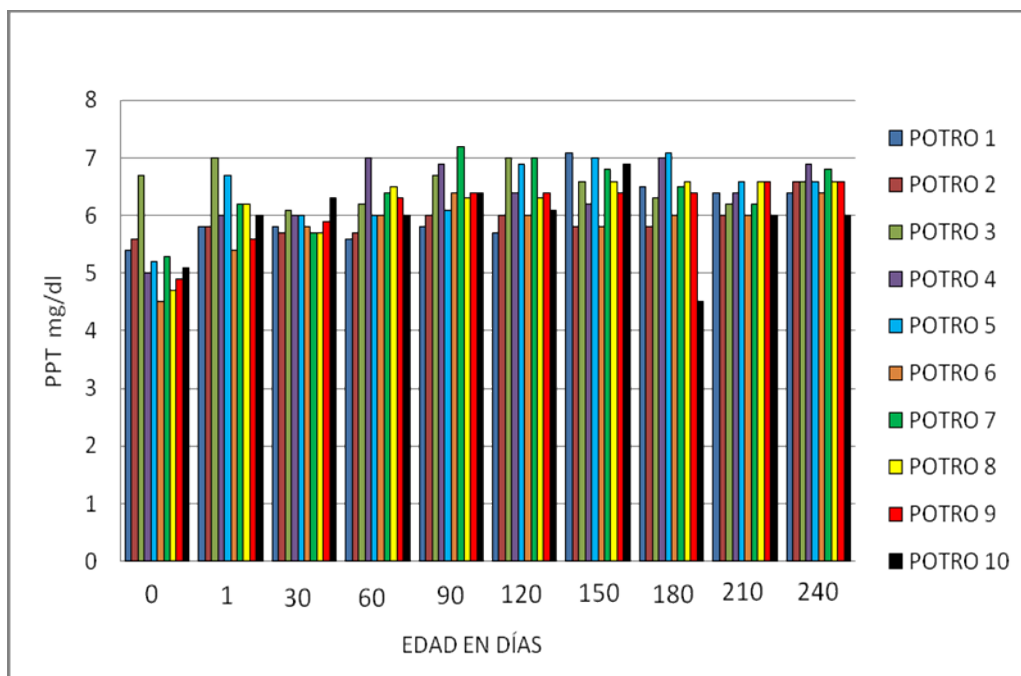


FIGURA 20. Concentraciones de Proteínas Plasmáticas Totales de 10 potros, del nacimiento hasta los 240 días de edad. Los resultados están representados en mg/dl.

Tabla 18a. Resultados de las cuentas leucocitarias diferenciales de 10 potros en los primeros ocho meses de vida, desde su nacimiento.

POTRO	M1 (0 hrs)				M2 (24 hrs)				M3 (mes 1)				M4 (mes 2)				M5 (mes 3)			
	N %	L %	M %	E %	N %	L %	M %	E %	N %	L %	M %	E %	N %	L %	M %	E %	N %	L %	M %	E %
P1	70	21	9	0	51	42	7	0	75	23	2	0	69	29	2	0	67	29	3	1
P2	56	38	6	0	55	40	5	0	40	55	3	2	53	41	2	4	37	49	14	0
P3	71	25	7	0	73	24	2	1	67	29	3	1	51	41	4	4	64	33	1	2
P4	80	10	10	0	78	21	1	0	82	14	3	1	55	39	3	5	65	31	3	1
P5	73	17	10	0	70	23	6	1	70	26	2	2	63	34	3	8	45	52	2	1
P6	73	21	6	0	74	23	2	1	66	32	1	1	75	21	3	1	58	36	6	0
P7	57	47	6	0	85	10	4	1	84	12	2	2	76	18	6	0	48	48	3	1
P8	53	41	6	0	66	30	4	0	52	47	0	1	57	39	3	1	61	34	5	0
P9	67	30	3	0	73	21	6	0	54	39	3	2	51	40	6	3	38	58	2	2
P10	63	32	5	0	78	18	4	0	53	46	0	1	69	25	4	1	52	46	1	1

Tabla 18a. Resultados de las cuentas leucocitarias diferenciales de 10 potros en los primeros ocho meses de vida, desde su nacimiento.

POTRO	M6 (mes 4)				M7 (mes 5)				M8 (mes 6)				M9 (mes 7)				M10 (mes 862)				
	N %	L %	M %	E %	N %	L %	M %	E %	N %	L %	M %	E %	N %	L %	M %	E %	N %	L %	M %	E %	
P1	62	34	4	0	56	41	2	2	31	62	6	3	59	32	7	2	56	34	4	6	
P2	56	37	3	3	56	37	5	2	42	50	8	0	31	63	5	1	51	45	3	1	
P3	44	52	1	3	54	43	1	2	65	30	4	1	40	40	5	5	65	27	5	0	2(B)
P4	55	37	4	4	45	46	3	6	46	50	1	3	45	54	1	0	37	54	3	4	2(B)
P5	41	54	3	2	46	48	4	2	23	68	4	5	64	34	1	1	53	43	3	1	
P6	45	53	2	0	62	35	3	0	14	52	7	1	34	63	2	1	55	44	1	0	
P7	60	40	0	0	58	40	1	1	35	57	8	0	56	39	1	2	77	20	2	1	
P8	52	44	2	2	44	49	5	2	37	55	4	4	36	56	7	0	51	45	3	0	1(B)
P9	53	45	1	1	42	53	4	1	64	43	3	0	36	57	3	4	57	38	2	1	2(B)
P10	64	32	4	0	40	58	1	1	52	36	2	2	64	32	2	1	1(B)	57	37	3	2

N = NEUTRÓFILOS  
E = EOSINÓFILOS

L = LINFOCITOS  
B = BASÓFILOS

M = MONOCITOS

## 8.3 Rancho Sayavedra

### 8.3.1 Manejo de medicina preventiva

#### 8.3.1.1 Desparasitación

En las yeguas gestantes, la desparasitación se realizó cada dos meses, alternando el desparasitante para evitar resistencia, la última medicación fue con Ivermectinas + Febendazol administrada a la dosis indicada de acuerdo al peso de los animales. Mientras que, los potros se desparasitaron al cuarto mes de edad y después se incorporaron al calendario general.

#### 8.3.1.2 Vacunación

- Los días 120, 180, 240 y 300 de gestación se aplicó vacuna contra Rhinoneumonitis, "Neumoabort".
- En el día 300, fueron aplicadas vacunas contra Tétanos (Toxoide tetánico), Streptococcus equi e Influenza.
- Con respecto a los potros, éstos, se vacunaron contra Influenza, Tétanos, Streptococcus equi y Rhinoneumonitis.

### 8.3.2 Manejo zootécnico

#### 8.3.2.1 Alimentación

La dieta de las yeguas gestantes, se constituyo de un concentrado comercial preparado bajo especificaciones requeridas; y cuyos componentes básicos eran: cebada, avena, maíz quebrado, pasta de soya, vitaminas, minerales y melaza, aporta aproximadamente 13 % de proteína. La fibra se obtiene a través de avena en greña y pasto kikuyo en pradera. Agua ad libitum.

El potro se alimentó de leche materna, en pradera pastoreaba con la madre y se le ofrecía concentrado Triple Corona (™) a los tres meses de edad, con aporte aproximado del 16 % de proteína.

#### 8.3.2.2 Ubicación

Durante toda la gestación, las yeguas permanecieron en pradera, al acercarse el parto eran llevadas a un corral cercano a caballerizas, y 15 días previos a la fecha estimada entraron a caballerizas y no salieron hasta después de que éste ocurre, que de manera normal fue al tercer día posparto. En el área de parideros fueron colocados tapetes sanitarios, al igual que en cada entrada de caballerizas, y éstas se preparaban con camas de paja.

Después del parto, la yegua y su cría se mantuvieron por tres días en caballerizas para su observación, al terminó, salieron a pradera y permanecieron juntos hasta el destete, el cual fue a los seis meses de edad del potro. Concluido tal período, los potros son separados y trasladados al Centro Internacional Ecuéstre Santín, ubicado en Toluca, Estado de México.

#### 8.3.2.3 Parto

A todas las yeguas con diagnóstico positivo a gestación se les realiza un Caslick, y cuando se acerca el parto éste es retirado y reciben un baño con shampoo – clorhexidina, y se desinfectan las ubres de éstas para contar con condiciones lo más higiénicas posible en el proceso del parto.

El parto fue observado desde el inicio para monitorear su proceso e intervenir si así, hubiera sido necesario; posteriormente, se inspeccionó la placenta para detectar alteraciones como: si está o no completa, si presenta abultamientos, cambios de color, olor fétido, su peso, el que debía ser del 11 % en relación al peso del potro.

El calostro debió cubrir rasgos físicos de color y espesor; y de este modo, determinar que era adecuado, cuando resultaba apropiado, se recolectaban aproximadamente 250 ml para almacenar en su banco de calostro.

Al nacer el potro y cortarse el cordón umbilical, se desinfectaba la parte que queda en el potro; también, se monitoreaba el comportamiento del recién nacido, con respecto a levantarse, tomar calostro y arrojar el meconio durante las primeras horas de vida. Se realizó una inspección física para determinar su estado clínico, evaluando frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, color de mucosas, tiempo de llenado capilar, presencia de petequias, debilidad, entre otros.

Además, independiente de la hora del parto, se tomaba una muestra de sangre a la mañana siguiente, y remitida al laboratorio clínico para obtener biometría hemática.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. Raidal S.L. Immunity in Foals. Rural Industries Research and Development Corporation. 2000
2. Sellon D.C., Secondary immunodeficiencies of horses. *Veterinary Clinical North America Equine Practice*. 2000; 16 (1) :117-130.
3. Boyd N.K., Cohen N.D., Lim W.S., Martens R.J., Chaffin M.K., Ball J.M. Temporal Changes in cytokine expression of foals during the first month of life. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003; 92:75-85.
4. Langlois B. Heritability of racing ability in thoroughbreds. *Livestock Production Science* 1980; 7(6): 591-605.
5. Willet P. A history of the general Stud Book. An introduction to the General Stud Book. 1991; Vol. 2; Weatherby's, U.S.
6. Willet P. The classic racehorse. The University Press of Kentucky. 1981; U.S.
7. Willet P. Makers of the modern thoroughbreds. The University Press of Kentucky. 1986; U.S.
8. Perryman L.E., McGuire T.C., Torberck R.L. Ontogeny of lymphocyte function in the equine fetus. *American Journal Veterinary Research*. 1980; 41: 1197 – 1200.
9. Wagner B., Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Developmental & Comparative Immunology* 2005; 1-10.
10. Giguère S., Polkes A.C. Immunologic disorders in neonatal foals. *Veterinary Clinical Equine Practice*, 2005; 21:241-272.
11. Schäfer-Somi S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Animal Reproduction Science*. 2003; 75: 73-94.
12. Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clinical Immunology*, 2006; 118:137-144.



13. Morein B., Abusugra I., Blomqvist G. Immunity in neonates. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2002; 87: 207 – 213.
14. Uruakpa F.O., Ismond M.A.H., Akobundu E.N.T. Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research*. 2002; 22: 755 – 767.
15. Wagner B., -Flaminio J.B.F., Hillegas J., Leibold W., Erb H.N., Antczak D.F. Occurrence of IgE in foals: Evidence for transfer of maternal IgE by the colostrum and late onset of endogenous IgE production in the horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006; 110: 269 – 278.
16. Krakowski L., Krzyzanowski J., Wrona Z., Siwicki A. The effect of nonspecific immunostimulation of pregnant mares with 1,3/1,6 glucan and levamisole on the immunoglobulins levels in colostrums, selected indices of nonspecific cellular and humoral immunity in foals in neonatal and postnatal period. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1999; 68:1 – 11.
17. Collins M.H. Placentas and Foetal Health. *Equine Vet J Suppl* 1993; 14: 8 – 11.
18. Ginther J.O. Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and Conceptus. Milne Lecture: Equine Pregnancy, AAEP Proceedings 1998; 44: 73 – 104.
19. Curadi M.C., Minori D., Demi S., Orlandi M. Immunotransfer in the foal. Reporte de investigación. *Annali – Faculta di Medicina Veterinaria Pisa*. 2001; 54: 127-140.
20. McClure J.T., DeLuca J.L., Lunn D.P., Miller J. Evaluation of IgG concentration and IgG subisotypes in foals with complete or partial failure of passive transfer after administration of intravenous serum or plasma. *Equine Veterinary Journal*. 1999; 33: 681-686.
21. Sedlinska M., Krejčí J., Viskočil M., Kudláčková H. Postnatal development of blood serum concentrations of immunoglobulin IgG, IgA and IgM Isotypes in suckling foals. *Acta Veterinary Brno*, 2006; 75: 175 – 182.
22. Hofsaess F.R. Time of antibody absorption in neonatal foals. *Journal Equine Veterinary Science* 2001; 21 (4): 158 – 159.

23. Robinson E.N. Current Therapy in Equine Medicine 4. Section 13: The Foal. 4th ed. U.S.A.: W. B. Saunders Company, 1997
24. Chappuis G. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. 1998.
25. Koterba A.M., Drummon W.H., Kosch P.C. Equine Clinical Neonatology. Section 4: Immunology and infection. 1st ed. U.S.A. Lea & Febiger, 1990.
26. Flaminio M.J.B., Rush B.R., Davis E.G., Hennesy K., Shuman W., Wilkerson M.J. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2000; 73: 267 – 285.
27. McTaggart C., Yovich J.V., Penhale J., Raidal S.L. A comparison of foal and adult horse neutrophil function using flow cytometric technique. *Research Veterinary Science*, 2001; 71: 73 – 79.
28. Demmers S., Johannison A., Grøndal G., Jensen-Waern M. Neutrophil functions and serum IgG in growing foals. *Equine Veterinary Journal*, 2001; 33(7): 676 – 680.
29. Horohov D, Gluck MH. Maturation of the Neonate's Immune Response. *Changing Times. Journal Equine Veterinary Science*. 2005
30. Bernoco M.M., Liu I.K.M., Willits N.H. Hemolytic complement activity and concentrations of its third component during maturation of the immune response in colostrum deprived foals. *American Journal Veterinary Research*, 1994; 55 (7): 928 – 932.
31. Viveiros M.M., Antczak D.F. Characterization of equine natural killer and IL-2 stimulated lymphokine activated killer cell populations. *Developmental Comparative Immunology*, 1999; 23: 521 – 532.
32. Marti E., Horohov D.W., Antzak D.F., Lazary S., Lunn D.P. Advances in equine immunology: Havemeyer workshop reports from Santa Fe, New Mexico, and Hortobagy, Hungary. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003; 91: 233 – 243.
33. Sheoran A.S., Timoney J.F., Holmes M.A., Karsenski S.S., Chrisman M.V. Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal transfer and distribution in horses. *American Journal Veterinary Research*, 2000; 61: 1099 – 1105.

34. Wilson W.D., Mihalyi J.E., Hussey S., Lunn D.P. Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Veterinary Journal*, 2001; 33: 644 – 650.
35. Holznagel D.L., Hussey S., Mihalyi J.E., Wilson W.D., Lunn D.P. Onset of immunoglobulin production in foals. *Equine Veterinary Journal*. 2003; 35 (6): 620 – 622.
36. Le Blanc M.M., Tran T., Baldwin J.L., Pritchard L. Factors that influence passive transfer of immunoglobulin in foals. Reports of original studies. *Journal American Veterinary Medical Association*. 1992; 200 (2): 179 - 183.
37. Kohn CW, Knight D, Hueston W, et al. Colostral and serum IgG, IgA, and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition. *Journal American Veterinary Medical Association*. 1999; 195 (1): 64 – 68.
38. Breathnach C.C., Sturgill-Wright T., Stiltner J.L., Adams A.A., Lunn D.P., Horohov D.W. Foals are interferon gamma-deficient at birth. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006; 112(3 - 4):199 – 209.
39. Lunn D.P., Holmes M.A., Duffus P.H. Equine T-lymphocyte MHC II expresión: variation with age and subset. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1993; 35: 225 – 238.
40. Smith R., Chaffin K., Cohen N.D., Martens R.J. Age-related changes in lymphocyte subsets of Quarter Horse foals. *American Journal Veterinary Research*. 2002; 63(4): 531 – 537.
41. Tallmadge R.L., Lear T.L., Antczak D.F. Genomic characterization of MHC class I genes of the horse. *Immunogenetics*. 2005; 57: 763 – 774.
42. Wagner B., Villegas J.M., Antczak D. A monoclonal antibody to equine interleukine-4. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006; 110: 363 – 367.
43. Gutmann S., Zawatzky R., Müller M. Characterisation and quantification of equine interferon gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2005; 104: 105 – 115.
44. Raidal S.L., Bailey D., Love D.N. The Flow Cytometric Evaluation of Phagocytosis by Equine Peripheral Blood Neutrophils and Pulmonary Alveolar Macrophages. *The Veterinary Journal*. 1998; 156: 107 – 116.

45. Young K.M., Lunn D.P. Immunodiagnostic Testing in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2001; 16 (1): 87 – 97.
46. Raidal S.L., Bailey D., Love D.N. Flow Cytometric Determination of Oxidative Burst Activity of Equine Peripheral Blood and Bronchoalveolar Lavage – Derived Leucocytes. *The Veterinary Journal*. 1998; 156: 117 – 126.
47. Flaminio M.J.B.F., Rush B.R., Davis E.G., Hennesy K., Shuman W., Wilkerson M.J. Simultaneous flow cytometric analysis of phagocytosis and oxidative burst activity in equine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2002; 26: 85 – 92.
48. Smits E., Burvenich C., Heyneman R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1997; 56: 259 – 269.
49. Gröndahl G., Johannisson A., Demmers S., Waern M.J. Influence of age and plasma treatment on neutrophil phagocytosis and CD18 expression in foals. *Veterinary Microbiology*. 1999; 65: 241 – 254.
50. Soutullo A, Verwimp V, Riveros M, Pauli R, Tonarelli G. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Veterinary Microbiology*. 2001; 79: 111 – 121.
51. Lunn D.P., Holmes M.A., Schram B., Duffus P.H. Monoclonal antibodies specific for equine IgG sub-isotypes including an antibody which recognizes B lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1995; 47: 239 – 251.
52. Flaminio M.J.B.F., Rush B.R., Shuman W. Immunologic function in horses after non-specific immunostimulant administration. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1998; 63: 303 – 315.
53. Emmendörffer A., Hecht M., Lohmann-Matthes M.L., Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *Journal of Immunological Methods*. 1990; 131: 269 – 275.
54. Massoco C., Palermo-Neto J., Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2003; 95: 11 – 19.

55. Richardson M.P., Ayliffe M.J., Helbert M.J., Davies E.G. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *Journal of Immunological Methods*. 1998; 219: 187 – 193.
56. Hasui M., Hirabayashi Y., Kobayashi Y., Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *Journal of Immunological Methods*. 1989; 117: 53 – 58.
57. Shimojima M., Nishimura Y., Miyazawa Y., Kato K., Nakamura K., Izumiya Y., Akashi H., Tohya Y. A feline CD2 homologue interacts with human red blood cells. *Immunology*. 2002; 105: 360 – 366.
58. Hines M.T., Palmer G.H., Byrne K.M., Brassfield A.L., McGuire T.C. Quantitative characterization of lymphocyte populations in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of normal adult Arabian horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1996; 51: 29 – 37.
59. Janeway C.A., Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 6<sup>th</sup> edition; Garland Science Publishing, 2005; Ohio, U.S.A.
60. Balson G.A., Smith G.D., Yager J.A., Immunophenotypic analysis of foal bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Veterinary Microbiology*. 1997; 56: 237 – 246.
61. López A.M., Hines M.T., Palmer G.H., Alperin D.C., Hines S.A., Identification of pulmonary T- lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002; 9(6): 1270 – 1276.
62. Blanchard-Channel M., Moore P.F., Stott J.L. Characterization of monoclonal antibodies specific for equine homologues of CD3 and CD5. *Immunology*. 1994; 82: 548 – 554.
63. Cruse J.M., Lewis R.E. *Atlas of immunology*. 2<sup>nd</sup> edition; CRC Press, 2004; Boca Raton, Florida, U.S.A.
64. Lunn D.P., Holmes M.A., Schram B., Duffus W.P.H. Monoclonal antibodies specific for equine IgG sub-isotypes including an antibody which recognizes B lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1995; 46: 239 – 251.
65. Ibrahim S., Saunders K., Kydd J.H., Lunn D.P. Steinbach F. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007; 119: 63 – 80.
66. Van Beek E.M., Cochrane F., Barclay A.N., van den Berg T.K. Signal regulatory proteins in the immune system. *The Journal of Immunology*. 2005; 175 (12): 7781 – 7787.

67. Aldridge B.M., McGuirk S.M., Lunn D.P. Effect of colostrum ingestion on immunoglobulin – positive cells in calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1998; 62: 51 – 64.
68. Sangild P.T., Uptake of colostrum immunoglobulins by the compromised newborn farm animal. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2003; 98: 105 – 122.
69. Lopez A.M., Hines M.T., Palmer G.H., Alperin D.C., Hines S.A. Identification of pulmonary T- lymphocytes and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002; 9 (6): 1270 – 1276.